مقایسه ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری (*Neogobius caspius* Eichwald, 1831) در غرب و شرق سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از روش ریزماهواره

سهراب رضوانی گیل کلائی[(۱)]*؛ الهه قطب رزمجو[(۲)]؛ فرامرز لالوئی[(۳)]؛
محمد جواد تقوی[(٤)] و مهرنوش نوروزی[(٥)]
rezvani@ifro.ir
۱- مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱٤۱٥٥
۲- واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۷۷٥-۱٤٥۱٥
۳ و ٤- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱
٥- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن صندوق پستی: ۱۶۱۶

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

گاو ماهی خزری، ماهی کفزی کوچکی می‌باشد که بومی دریای خزر است. این ماهی نقش مهمی در چرخه غذایی دریای خزر ایفا می‌کند و منبع غذایی ماهیان خاویاری می‌باشد. ساختار ژنتیک جمعیت گاو ماهی خزری با استفاده از روش ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۱۵ نمونه از گاو ماهی خزری از دو منطقه در طول ساحل حوضه جنوبی دریای خزر (بندرانزلی و بندر ترکمن) جمع‌آوری شد. **DNA** استخراج شده با استفاده از ۱۲ آغازگر ریزماهواره‌ایی در دستگاه ترموسایکلر مورد بررسی قرار گرفت. باندهای **DNA** حاصل از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید با استفاده از نرم‌افزارهای **UVdoct** محاسبه و مستندسازی شد و با نرم‌افزار **GenAlex** مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از ۱۲ آغازگر مورد استفاده ۹ آغازگر پلی‌مورفسیم، ۲ آغازگر مونومورف و در یک پرایمر باند ظاهر نگردید. متوسط چند شکلی مشاهده شده و مورد انتظار بترتیب ۰/۷٤۹ و ۰/۶۳۸ بدست آمد. با توجه به اعداد بدست آمده از **Rst** و **Fst** میان دو منطقه مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P \leq 0.01$). انحراف از تعادل هاردی وینبرگ در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، در سواحل جنوب دریای خزر حداقل ۲ جمعیت مجزا از گاو ماهی خزری وجود دارد.

لغات کلیدی: پلی‌مورفیسم، نشانگر مولکولی، گاو ماهی خزری، دریای خزر، ایران

*نویسندهٔ مسئول

مقدمه

تکنولوژی نشانگرهای مولکولی منجر به تغییرات اساسی در تحقیقات ژنتیکی آبزیان شده است (Ward, 2000). از آنجایی که بسیاری از ذخایر ماهیان بصورت ترکیب با یکدیگر هستند، بنابراین از ابزارهای مختلف برای شناسایی افراد در این ذخایر استفاده می‌شود. ماهیان بیش از سایر گونه‌های جانوری دارای تنوع در تاریخچه زندگی و خصوصیات ریخت‌شناسی می‌باشند (Allendorf *et al.*, 1987). بررسی ساختار ذخایر نه فقط با یک روش بلکه باید از روشهای مختلفی انجام شود زیرا شرایط مختلفی در ساختار ذخایر وجود دارد و روشهای مختلف جنبه‌های متفاوت از وضعیت موجود را نشان می‌دهد. تعدادی از این نشانگرهای ذکر شده در گذشته در تحقیقات ژنتیک آبزیان متداول شده بودند که شامل نشانگرهای آلوزیم‌ها و mtDNA می‌باشد و در سالهای اخیر تکنیکهای جدید جهت مطالعه ساختار ذخایر تهیه شده است که یکی از این تکنیکهای جدید ریز ماهواره‌ها (SSRs) می‌باشد. ریز ماهواره‌ها به فراوانی در طول ژنوم پراکنده شده‌اند و سطح‌های بالایی از تنوع آللها را توصیف می‌کنند. آنها نشانگرهای همبارز با اندازه نسبتاً کوچکی می‌باشند که به آسانی توسط واکنش زنجیرهایی پلیمراز تکثیر می‌شوند (Chistiakov *et al.*, 2006). ویژگی مهم SSRs، نشانگرهای ژنتیکی با قابلیت تغییرپذیری و موتاسیون بالا در گونه‌ها و جمعیت‌ها هستند. تمام موجودات زنده در معرض جهش ناشی از عملکرد یاخته‌های طبیعی یا کنشهای محیطی می‌باشند که منجر به تنوع ژنتیکی می‌شود (Liu, 2004). پلی مورفیسم ریز ماهواره‌ها مبتنی بر تفاوت اندازه واحدهای متنوع تکراری نگهداری شده از طریق آللهای مشخص شده در جایگاه ژنی می‌باشد (Chistiakov *et al.*, 2006).

گاو ماهیان گروه بسیار بزرگی از ماهیان آبهای ساحلی می‌باشند. این ماهیان با داشتن ۱۲ جنس و ۱۸۷۵ گونه، بزرگترین خانواده ماهیان دریایی بشمار می‌آیند. این خانواده، ماهیان کفزی کوچکی می‌باشند که در نهرها و جوی‌ها از سیبری تا جویبارها در کوهها در ارتفاع ۲۰۰۰ متری از جزایر و تا اعماق ۸۰۰ متری در اقیانوسها یافت می‌شوند. همچنین به تعداد زیاد در آبسنگهای مرجانی در شکافها و سوراخها یا در میان مرجانها، آب شیرین و شور، تا علفهای دریایی زیست می‌کنند. گاو ماهیان تقریباً در هر اکوسیستمی که آنها زیست می‌کنند بسیار مهم می‌باشند و به خاطر تعداد زیادشان قسمتی از چرخه غذایی در مناطق زیستشان می‌باشند و تاثیر فوق‌العاده‌ایی را بر محیط کف آب می‌گذارند و همچنین ممکن است بعنوان گونه‌هایی که نقش عمده‌ایی (غالب در چرخه غذایی) در آبهای شیرین تا جزایر کوچک اقیانوسی داشته باشند (Jonna, 2004). ۱۹ گونه گاو ماهی متعلق به ۵ جنس در دریای خزر یافت می‌شود که بیشتر گونه‌ها از جنس *Neogobius* هستند (رحیم‌اف، ۱۹۹۱). این گونه معمولاً در عمق ۲۰ تا ۱۰۰ متری یا اعماق بیشتر از ۲۰۰ تا ۳۰۰ متری و بندرت تا عمق ۵۰۰ متر در مناطق مختلف دریای خزر زندگی می‌کند، پراکنش این ماهی عموماً در خزر میانی و جنوبی می‌باشد. این ماهی روی شن یا زیر ریگ و گاهی روی سنگها و به بندرت روی گل نرم یافت می‌شوند. آنها در فصل گرم در ساحل می‌مانند و در زمستان با پایین رفتن درجه حرارت هوا به اعماق مهاجرت می‌کنند، اگر چه در تابستان نیز با بالا رفتن درجه حرارت هوا ممکن است برای یک دوره کوتاهی به آبهای عمیق‌تر و سردتر مهاجرت کنند. این گونه همانند سایر افراد خانواده‌اش نقش مهمی را در چرخه غذایی دریای خزر ایفا می‌کند. گاو ماهی خزری منبع غذایی مهمی برای ماهیان بزرگ می‌باشد (Cod, 2003). دریای خزر منبع بسیار مهمی از ماهیان تجاری و پرارزشی چون ماهیان خاویاری می‌باشد که *N. caspius* غذای عمده این ماهیان را تشکیل می‌دهد. از بین ماهیان خاویاری، فیلماهی و تاسماهی بیشتر از سایر گونه‌ها از این ماهی تغذیه می‌کنند، همچنین تخمهای این ماهی منبع غذایی مهمی برای پرندگان مهاجر، خرچنگها و انواع ماهیان می‌باشد. به دلیل اهمیت این گونه ساختار ژنتیک آن با استفاده از روش ریز ماهواره‌ایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

۱۱۵ نمونه گاو ماهی خزری صید شده طی بهار ۱۳۸۶ تا تابستان ۱۳۸۷ از سواحل جنوبی دریای خزر در استانهای گلستان (بندر ترکمن ۵۰ نمونه) و گیلان (بندر انزلی ۶۵ نمونه) (شکل ۱)، بوسیله دو روش که شامل تور پره و تور ترال بود جمع‌آوری و سپس نمونه‌ها جهت انجام

مراحـل آزمـایش در الکـل اتانـل ۹۶ درصـد قـرار داده شـدند و بـه آزمایشـگاه بیوتکنولـوژی پژوهشـکده اکولـوژی خـزر واقـع در ساری منتقل گردیدند.

شکل ۱: مکانهای نمونه‌برداری در دریای خزر

در این بررسی، برای استخراج DNA از روش فنل – کلروفروم استفاده گردید (Hillis & Moritz, 1990). در این روش بافت باله‌ها در بافر استاندارد STE (سدیم دو دسیل سولفات) به همراه پروتئناز K به مدت ۲۴ ساعت هضم و خالص‌سازی با استفاده از فنل و کلروفرم انجام گرفت و سپس رسوب DNA با الکل شستشو شد و در آب مقطر حل گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراجی به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز افقی ژل آگارز تعیین گردید.

DNA هسته بـا اسـتفاده از ۱۲ جفـت آغـازگر ریزمـاهواره ایـی کـه از گونـه‌هـای *N. kessleri* (Vyskocllova *et al.*, 2007) و *N. melanostomus* (Dufour *et al.*, 2007) طراحـی شـده بـود تکثیـر شـد (جـدول ۱) و شـرایط واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز بـرای هـر آغـازگر در حجـم ۲۵ میکرولیتـر در دسـتگاه ترموسـایکلر Qntabiotec، مـدل (Ato-q-Server) در چرخـه‌هـای دمـایی، ۹۴ درجـه بـرای ۵ دقیقـه (واسرشـته‌شـدن اولیـه)، ۹۴ درجـه بـرای ۴۵ ثانیـه (واسرشته شـدن)، ۶۳-۵۰ درجـه بـرای ۴۵ ثانیـه (الحـاق)، ۷۲ درجـه بـرای ۴۵ ثانیـه بـا تعـداد ۳۰ چرخـه (بسـط) و یـک بسـط نهـایی ۷۲ درجـه بـرای ۵ دقیقـه بـرای گونـه گاو ماهی خزری انجـام گرفـت. شـرایط آزمایشـگاهی اسـتفاده شـده شـامل $MgCl_2$ بـا غلظـت مصـرفی (۱/۶ میکرومتـر)، $dNTP_S$، (۲۰۰ میکرومتـر)، ۲ واحـد *Taq*، DNA پلیمـراز، غلظـت هـر آغـازگر (۱PM) و میـزان غلظـت DNA نمونـه ۱۰۰ نـانوگرم بـود. قطعـات تکثیـر شـده در واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز روی ژل پلی‌اکریل آمیـد ۸ درصـد (۲۹:۱ اکریـل آمیـد. بـیس ـ اکریـل آمیـد و بـافر TBE TX) غیـر دنـاتوره در الکتروفـورز عمـودی بـارگیری و سـپس ژل آمـاده شـده بـا اسـتفاده از نیتـرات نقـره رنـگ‌آمیـزی گردیـد. ژل در ولتـاژ ۱۴۵ و بـه مـدت حـدود ۴ سـاعت بـارگیری شـد. تصـویر ژل مـورد نظـر بـا اسـتفاده از دسـتگاه مسـتند سـاز ژل (مـد HOEFER- UVIF20) تهیـه و انـدازه قطعـات بـا اسـتفاده از نرم‌افزار UVdoct محاسبه گردید.

فاکتورهـای فراوانـی آللـی، چندشـکلی مشـاهده شـده و مـورد انتظـار، فاصـله ژنتیکـی (Nei, 1978) شـباهت ژنتیکـی (Nei, 1978) بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار GenAlex بدسـت آمـد (Peakall & Smouse, 2005). مقـادیر F_{st}، R_{st} و تعـادل هـاردی- واینبـرگ و آنـالیز واریـانس مولکـولی (AMOVA) نیز محاسبه گردید.

جدول ۱: جایگاه‌ها، کد دستیابی، توالی آغازگرهای مورد استفاده، توالی تکراری (موتیف) و منبع آغازگر در آنالیز ریزماهواره گاو ماهی خزری

تعداد	جایگاه ژن	توالی آغازگر	کد دستیابی در بانک ژن	توالی تکراری	منبع آغازگر
1	Nme7	AATGGATGGGTCAATTGCAT AAGGTTGAGCTGCCACTGAG	DQ999982	$(AGAC)_5$	Dufour *et al.*, 2007
2	NMe8	ATGGAGTTTCTGGGCAGTTG CTCCGTCGATTGTGTTCTGA	DQ999983	$(TG)_8$	
3	NG70	CGATTCTGTCACGGTGTTAT CACAACAAGCCATGTCCAAA	EF029937	$(TG)_{12}$	Vyskocilova *et al.*, 2007
4	NG71	GAAGCCATTCTGCCTTTCTG GTGTCGCATGAGTTGAATGG	EF029938	$(GC)_4$	
5	NG111	GTGTGGATCGGTGCCTAACT ACTCGGCTTTCTCTGCTCTG	EF029924	$(GA)_8$	
6	NG115	CACTTCCCTGTGGTGTGATG CCTTGTCTGTCTCCAACTGC	EF029925	$(AG)_4$	
7	NG117	TCAGACTCAGTGGTGGTAGC AATCGGCCATAGGAATGTTG	EF029926	$(CA)_9$	
8	NG135	CCTATACGACTCAAGCCCAA CCTCTCACTCCAGCCTCTTG	EF029928	$(AG)_9$	
9	NG184	ATATCAAAGCCTCGATGCAAA CCACTGCCTGTCAGGAAGC	EF029931	$(GA)_{13}$	
10	NG215	GCACAATGCCACACTTTAGG CGGTAACACACTCTGGCTCA	EF029933	$(CT)_5$	
11	NG28	ATTCTGCCACGGAGTGATCT CGGTAGTTGCCGAAGTTTCT	EF029935	$(CT)_6$	
12	NG92	AAGCAACTCACGCCAAAGTC AGTGCTGCCATGTCAATCTG	EF029939	$(CGCA)_5$	

نتایج

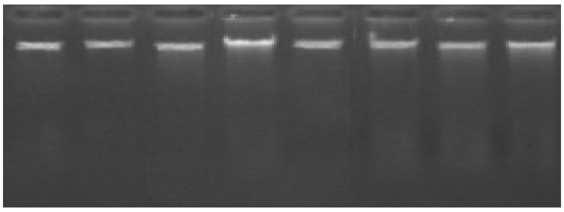
پس از استخراج DNA و بررسی مقادیر کمی و کیفی آن مشخص گردید که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مناسب بودند (شکل ۲). از بین ۱۲ جفت آغازگر استفاده شده در این بررسی، ۹ جفت بصورت چند شکلی (پلی مورف) که شامل: NG215, NG70, NG184, NG115, NG111, NG71, NMe8, NMe7 NG92 بودند، ۲ جفت آن تک شکل (مونومورف) (NG117, NG135) و یک جفت نیز واکنشی نشان نداد (NG29). اشکال ۳، ۴و ۵ الگوهای محصول PCR و باند DNA پرایمرهای NG92,

NG111 و NG115 را بترتیب نشان می‌دهند. نتایج تعداد آلل واقعی، چندشکلی مشاهده شده و مورد انتظار در واکنش زنجیره‌ای پلیمر در تکثیر جایگاههای ریزماهواره‌ایی مورد بررسی در جداول ۳ و ۴ آمده است. متوسط آللهای مشاهده شده در هر لوکوس ۶/۴ می‌باشد که اندازه متوسط آن در بندرانزلی ۶/۸ و بندر ترکمن ۵/۸ بوده است.

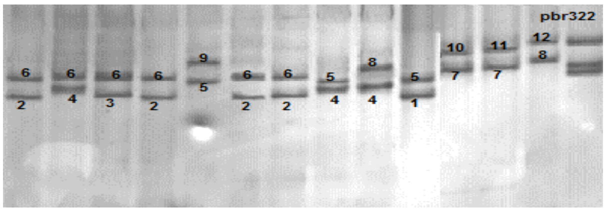
از ۶۷ آلل مشاهده شده در لوکس NG115 بیشترین تعداد آلل (۱۷) و در لوکوس NMe8 کمترین تعداد آلل (۲) مشاهده شد. تعداد ۱۱ آلل اختصاصی در سطح جمعیت بندر ترکمن و بندر انزلی بطور یکسان مشاهده شد (جدول ۴).

متوسط چندشکلی مشاهده شده و مورد انتظار برای همه لوکوسها بترتیب ۰/۷۴۶ و ۰/۶۳۸ می‌باشد که متوسط میزان آن در منطقه بندر انزلی ۰/۸ و ۰/۶۵۳ و در منطقه بندر ترکمن ۰/۶۸۷ و ۰/۶۲۰ می‌باشد ($P\leq0.01$) (جدول ۵).

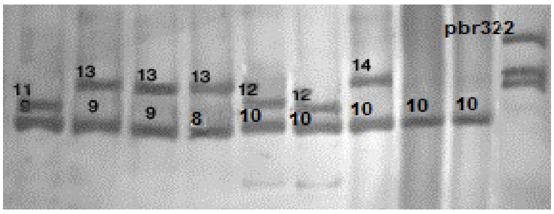
انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی واینبرگ در تمام نمونه‌ها و در تمام لوکوسها مشاهده شد، بجز در لوکوس NMe7، برای نمونه‌های دو جمعیت بندر انزلی و بندر ترکمن و لوکوس NMe8 برای نمونه‌های جمعیت بندر ترکمن انحراف از تعادل هاردی واینبرگ معنی‌دار نبود ($P\leq 0.01$) .



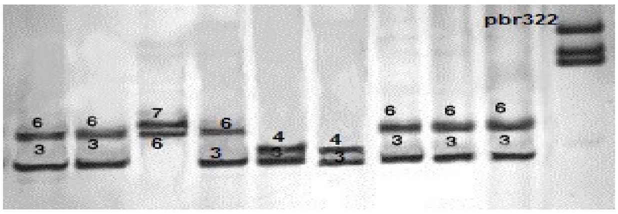
شکل۲: نمونه‌ای از DNA استخراج شده به روش فنل-کلروفرم روی ژل آگارز ۱ درصد



شکل۳: محصول PCR و آرایش باند DNA گاو ماهی خزری دریای خزر با استفاده از پرایمر NG115 روی ژل اکریل آمید پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره (اعداد معرف آللها)



شکل٤: محصول PCR و آرایش باند DNA گاو ماهی خزری دریای خزر با استفاده از پرایمر NG111 روی ژل اکریل آمید پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره (اعداد معرف آللها)



شکل٥: محصول PCR و آرایش باند DNA گاو ماهی خزری دریای خزر با استفاده از پرایمر NG92 روی ژل اکریل آمید پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره (اعداد معرف آللها)

جدول ۲: جایگاه ژن، اندازه آلل‌ها (bp)، دمای اتصال و میزان مواد مصرفی در آنالیز ریزماهواره‌ایی گاو ماهی خزری

جایگاه ژن	اندازه حقیقی (bp)	غلظت مواد مصرفی	دمای اتصال
Nme7	۱۶۲-۱۶۸	1.6 mM $MgCl_2$	$[63°C]^{30}$
Nme8	۲۸۰-۲۸۲	1.6 mM $MgCl_2$	$[61°C]^{30}$
NG70	۱۸۰-۲۰۰	1.6 mM $MgCl_2$	$[50°C]^{30}$
NG71	۲۱۰-۲۱۴	1.6 mM $MgCl_2$	$[58°C]^{30}$
NG111	۲۰۰-۲۲۸	1.6 mM $MgCl_2$	$[57°C]^{30}$
NG115	۲۰۰-۲۸۴	1.6 mM $MgCl_2$	$[50°C]^{30}$
NG117	۴۰۰	1.6 mM $MgCl_2$	$[57°C]^{30}$
NG135	۱۷۲	1.6 mM $MgCl_2$	$[57°C]^{30}$
NG184	۹۶-۱۰۲	1.6 mM $MgCl_2$	$[55°C]^{30}$
NG215	۱۸۶-۲۰۰	1.6 mM $MgCl_2$	$[50°C]^{30}$
NG28	----	1.6 mM $MgCl_2$	$[54°C]^{30}$
NG92	۱۵۰-۱۸۰	1.6 mM $MgCl_2$	$[57°C]^{30}$

2U/Taq ، هر پرایمر 200 µM dNTP ,1PM

جدول ۳: تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر لوکوس در مناطق مورد بررسی با استفاده از ۹ پرایمر ریزماهواره‌ایی

لوکوس	منطقه ۱ (بندر انزلی)	منطقه ۲ (بندر ترکمن)	N
NG115	۱۷	۱۰	۱۳/۵
NG111	۱۲	۱۰	۱۱/۵
NG92	۷	۹	۸
NG215	۸	۷	۷/۵
NG70	۱۰	۹	۹/۵
NG71	۲	۲	۲
NG184	۲	۲	۲
NMe8	۲	۲	۲
NMe7	۲	۲	۲
کل	۶۲	۵۳	
متوسط	۶/۸	۵/۸	۶/۴

جدول ٤: تعداد آلل‌های اختصاصی در نه جایگاه ژنی ریزماهواره‌ایی در دو جمعیت حوضه جنوبی دریای خزر

جمعیت	جایگاه ژنی								
	NMe7	NMe8	NG184	NG71	NG70	NG215	NG92	NG115	NG111
بندر ترکمن	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۲	٤	۱
بندر انزلی	۱	۰	۱	۱	۱	۲	۰	٤	۱

میزان F_{st} با مقدار ۰/۱۴۷ از لحاظ سنجش جفتی بطور معنی‌داری بزرگتر از ۰/۰۱ می‌باشد (P≤0.01) که این نشان‌دهندهٔ تباین جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. همچنین R_{st} نیز معنی‌دار بودن اختلاف جمعیت‌های بندر انزلی و بندر ترکمن را در سطح ۹۵ درصد و ۹۹ درصد نشان داد. میزان فاصله و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۳۹ و ۰/۶۸ و جریان ژنی ۲/۲۶ می‌باشد (Nei, 1978).

جدول ۵ : چندشکلی مشاهده شده HO و مورد انتظار (He)، ۹ لوکوس در ۲ منطقه نمونه‌برداری

	لوکوس	منطقه ۱ (بندر انزلی)	منطقه ۲ (بندر ترکمن)	میانگین
HO (He)	NG115	۰/۷۸۵(۰/۸۹۰)	۰/۳٦۰(۰/۸۰٦)	۰/۵۷۲(۰/۸٤۸)
	NG111	۰/۷۲۳(۰/۸۱٦)	۰/٤٤۰(۰/۸۲٤)	۰/۵۸۱(۰/۸۲۰)
	NG92	۰/۷٦۹(۰/۷۹٤)	۰/۹٦۰(۰/۸٤۹)	۰/۸٦٤(۰/۸۲۱)
	NG215	۰/۹۳۸(۰/۸۲۳)	۰/۸۲۰(۰/۷٦۸)	۰/۸۷۹(۰/۷۹۵)
	NG70	۰/۹٦۹(۰/۸٤٦)	۰/۹۸۰(۰/۸۲۵)	۰/۹۷٤(۰/۸۳۵)
	NG71	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)
	NG184	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)	۱/۰۰۰(۰/۵۰۰)
	NMe8	۰/۷۲۳(۰/٤٦۲)	۰/۲۰۰(۰/۱۸۰)	۰/٤٦۱(۰/۳۲۱)
	NMe7	۰/۲۹۲(۰/۲۵۰)	۰/٤۲۰(۰/۳۳۲)	۰/۳۵٦(۰/۲۹۱)
	متوسط	۰/۸۰۰(۰/٦۵۳)	۰/٦۸۷(۰/٦۲۰)	۰/۷٤٦(۰/٦۳۸)

بحث

گاو ماهی خزری در چرخه غذایی دریای خزر نقش بسیار مهمی دارد ولی اطلاعات کمی درباره ژنتیک مولکولی و ساختار ژنتیک جمعیت این گونه موجود می‌باشد. از آنجایی که بسیاری از ذخایر ماهیان بصورت ترکیب با یکدیگر هستند، بنابراین از ابزارهای مختلف برای شناسایی افراد در این ذخایر استفاده می‌شود. ماهیان بیش از سایر گونه‌های جانوری دارای تنوع در تاریخچه زندگی و خصوصیات ریخت‌شناسی هستند (Allendorf *et al.*, 1987). بررسی ساختار ذخایر نه فقط با یک روش بلکه باید از روشهای مختلفی انجام شود زیرا شرایط مختلفی در ساختار ذخایر وجود دارد و روشهای مختلف جنبه‌های متفاوت از وضعیت موجود را نشان می‌دهد. وجود تفاوت بین روشها بطور عمده ناشی از فقدان همزمانی بین خصوصیات قابل آنالیز در اختلاف توارث در بین ذخایر است. عدم یافتن مدارکی مبتنی بر وجود ذخایر متعدد با یک روش کافی نبوده و باید از روشهای مختلفی استفاده شود (Utter *et al.*,1992). با توجه به اینکه DNA میتوکندریایی از مادر و DNA ریزماهواره‌ایی از هر دو والد، به ارث می‌رسد، جریان ژنی برآورد شده بوسیله ریزماهواره در مقایسه با mtDNA بالاتر است. بدست نیامدن تنوع بین دو جمعیت بوسیله mtDNA نسبت به ریزماهواره بعلت سرعت بالای جهش در لوکوسهای ریزماهواره در مقایسه با منطقه کنترل ژنوم میتوکندریایی است (Wirigin *et al.*, 2002). در این بررسی از ۱۲ لوکوس مورد بررسی، ۹ پلی مورف، ۲ مونومورف و در یکی از لوکوسها باندی ظاهر نگردید. تکثیر موفق حاکی از حفاظت شدگی جایگاههای ریزماهواره‌ایی می‌باشد. استفاده از ریزماهواره‌ها در گونه‌هایی که با هم خویشاوندی بسیار نزدیک یا کمی نزدیک دارند، متداول است و معمولاً موفقیت‌آمیز اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری ریزماهواره‌هاست که محل باند شدن با آغازگرها می‌باشد. سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه و در جمعیت‌های مختلف آن گونه که در هر مناطق مختلف می‌باشند متفاوت است. میزان چندشکلی مشاهده شده (۰/۷۵) می‌باشد، با توجه به اینکه گاو ماهی خزری ساکن آب لب شور است (وارد آب شیرین نمی‌شود)، اعداد بدست آمده نشان می‌دهد که میزان چند شکلی تقریباً مشابه نتایج بدست آمده از تحقیق بالا برای ماهیان آب شور می‌باشد. تنوع زیاد گاو ماهی خزری در مناطق مورد بررسی ممکن است به این دلیل باشد که این گونه در زمان بلوغ و بزرگسالی مهاجرتی ندارد ولی در هنگام لاروی بصورت

پلانکتونی بوده و ممکن است توسط جریانهای موجود در خزر به مناطق دیگر انتقال داده شود. همچنین اگر چه این ماهی در زمان بزرگسالی هیچگونه مهاجرتی نداشته و تولید مثل تنها بین افراد بالغ یک جمعیت در یک منطقه صورت می‌گیرد و همچنین بدلیل عدم صید، جمعیت این گونه در مناطق مختلف فراوان می‌باشد. نتایج حاصل از طراحی ۱۲ جفت پرایمرهای ریز ماهواره‌ایی از ژنوم *N. kessleri* (گاو ماهی سرگنده)(که ۱۰ جفت از آنها نیز جهت بررسی جمعیت گاو ماهی خزری در تحقیق حاضر بکار برده شد) و استفاده از این پرایمرها جهت بررسی ساختار ژنتیکی گونهٔ *N. kessleri* و ۴ گونه نزدیک به آن شامل: *N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. gymnotrachelus* و *Proterorhinus marmoratus* (Vyskocilova *et al.*, 2007)، نشان داد که تنوع ژنتیکی در دو گونهٔ *N. kessleri* و *N. melanostomus* پایین بوده، بطوریکه تعداد آللها و چند شکلی در این دو گونه نیز پایین است اما برای سه گونه دیگر تقریباً تنوع بالا می‌باشد که Vyskocilova و همکاران (۲۰۰۷) علت آن را جمعیت بومی این سه گونه و مهاجم بودن *N. kessleri* و *N. melanostomus* بیان می‌دارد در واقع Vyskocilova و همکاران (۲۰۰۷) بومی بودن گونه‌ها را عامل بالا بودن تنوع این سه گونه بیان می‌دارد که در مقایسه با این تحقیق از آنجا که گونه *N. caspius* بومی خزر می‌باشد این گونه نیز از تنوع بالایی برخوردار است. در بررسی حاضر انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی واینبرگ (H-W) در تمام لوکوسها و در تمام نمونه‌ها به جز لوکوس NMe7 برای هر دو جمعیت و NMe8 برای جمعیت گرگان مشاهده شده است. علت آن را می‌توان ناشی از استفاده از پرایمرهای غیرگونه‌ای، وجود آللهای نول و ساختار جمعیت بیان کرد. در واقع وجود آللهای نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است (Rodzen *et al.*, 2002). برای اندازه‌گیری اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن نسبت به اختلاف ژنتیکی کل از فاکتورهای F_{st} و R_{st} استفاده می‌شود. برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار آن بین صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهندهٔ تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Wright, 1978). اما بطور معمول مقدار F_{st} بطور معقولانه‌ای زیر ۰/۰۵ مطرح می‌شود که محققین ممکن است ساختار زیرجمعیت‌ها را ضعیف تفسیر کنند، درحالیکه عدد بدست آمده نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست، نکته دیگر اینکه میزان F_{st} در اکثریت موارد به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی‌مورفیسم (ناشی از جهش) بطور مؤثری میزان F_{st} را کاهش می‌دهد (Charlesworth, 1998; Wright, 1978; Headrick, 1999; Nagylaki, 1998). از اینرو مقدار F_{st} کمتر از ۰/۰۵ در حقیقت نشان‌دهندهٔ تمایز ژنتیکی مهمی است و این نکته بوسیله wright (۱۹۷۸) تأکید شده است. در این بررسی میزان F_{st} تقریباً متوسط و در تمام نمونه‌ها معنی‌دار است و همچنین R_{st} نیز در تمام نمونه‌ها معنی‌دار می‌باشد. نتایج آزمون AMOVA نشان داد که جمعیت‌های گاو ماهی خزری در ۲ منطقه مورد بررسی در طول ساحل حوضه جنوبی خزر متفاوت و معنی‌دار می‌باشد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۳۹ است که Shaklee و همکاران (۱۹۸۲) و Thorpe و Sol-Cave (۱۹۹۴) در مطالعات خود نشان دادند که متوسط میزان تفاوت ژنتیکی برای جمعیت‌های وابسته به گونه (conspecific) ۰/۰۷-۰/۰۰۲ و جمعیت‌های وابسته به جنس (congenerics) ۰/۶۱-۰/۰۳ است. میزان فاصله ژنتیکی بدست آمده در بررسی حاضر (۰/۳۹) در محدوده congeneric قرار دارد و تفاوت ژنتیکی در میان ۲ جمعیت مورد مطالعه از *N. caspius* را بیان می‌دارد. بنابراین جمعیت‌های متفاوت از گاو ماهی خزری در ۲ منطقه مورد بررسی در طول ساحل حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد.

نتیجه بدست آمده از بررسی حاضر نشان می‌دهد که حداقل دو جمعیت مختلف از گاو ماهی خزری در جنوب دریای خزر یافت می‌شود که شامل جمعیت بندر انزلی و بندر ترکمن می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات شیلات ایران از محل اعتبار مربوط به قرارداد با اتحادیه سراسری تکثیر و پرورش آبزیان صورت گرفته و کلیه مراحل آزمایشگاهی آن در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر - ساری انجام گردیده است. از کلیه افرادی که در اجرا و تکمیل این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

رحیم اف، د.ب.، ۱۹۹۱. گاو ماهیان دریای خزر (سیستماتیک، اکولوژی و اهمیت آن). انتشار به زبان روسی ۱۹۹۱، ترجمه: یونس عادلی. مرکز تحقیقات شیلات گیلان.

Allendorf F.W., Ryman N. and Utter F.M., 1987. Genetics and fishery management: Past, present, and

future. *In*: (eds. N. Ryman and F.M. Utter), Population genetics and fishery management. University of Washington Press, Seattle, USA. pp.1–19.

Chistiakov D.A., Hellemans B. and Volckaert A.M.F., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function. Aquaculture, 255:1–29.

Coad B., 2003. Fresh water fishes of Iran, species accounts-gobiidae-neogobius. Brian W. Coad cited at: www.briancoad.com.

Charlesworth, B., 1998. Measures of divergence between population and the effect of forces that reduce variability. Molecular Biology and Evolution, 15:538-543.

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

Dufour B., Hogan T. and Heath D., 2007. Ten polymorphic microsatellite markers in the in vasive round goby (*Neogobius melanostomus*) and cross-species amplification. Journal Compilation Bleakwell Publishing Ltd., 7:1205-1207.

Headrick P.W., 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution. 53:313-318.

Hillis D.M. and Moritz C., 1990. An overview of applications of molecular systematics. *In*: (eds. D.M. Hillis and C. Moritz), Molecular systematics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. pp.502-515.

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

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

Nagylaki T., 1998. Fixation indices in subdivided population. Genetics, 148:1325-1332.

Peakall R. and Smouse P.E., 2005. GenAlex 6: GENETIC Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. http//www.anu.edu.au/BoZo/ GenAlex/Cited at: August 2, 2008.

Jonna R., 2004. "Gobiidae" (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz. umich.edu/site/accounts/information/Gobiidae.html. Cited at: July 24, 2008.

Rodzen J.A. and May B., 2002. Inheritance of microsatellite loci in the polyploidy white sturgeon (*Acipencer transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci. Aquaculture, 232:165-182.

Shaklee J.B., Tamaru C.S. and Waples R.S., 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Oacific, 36:141-157.

Thorpe J.P. and Sol-Cave A.M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. Zoologica Scripta, 23:8-18.

Utter F., Aebersold P. and Winans G., 1987. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. Population genetics and fishery management. Washington Sea Grant Program, University of Washington Press, Seattle. pp.21-45.

Vyskocllova M., Onderackova M. and Simkova A., 2007. Isolation and characterization of micro-satellites in *Neagobius kessleri* (Perciformes, Gobiidae) and cross-Species amplification within the family Gobiidae. Jurnal Compilation Blackwell Publishing Ltd., 6:703-707.

Ward R.D., 2000. Genetics in fisheries management. Hydrobiologia, 420:191–201.

Wright S., 1978. Evolution and the genetics of population. Vol. 4, variability within and among natural population. University of Chicago Press, Chicago, USA.

Wirgin I.L. and Waldman J.R., 2005. Use of nuclear DNA in stock identification: single-copy and repetitive sequence markers. In: (S.X. Cadrin; K.D. Friedland and J.R. Waldman eds.) Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science, Elsevier, Amsterdam, Holland.

Genetic comparison of *Neogobius caspius* (Eichwald, 1831) in the west and east of south Caspian Sea using microsatellite markers

Rezvani S. (1)*; Gothb Razmjoo E.(2); Laloei F. (3); Taghavi M.J.(4) and Nooruzi M.(5)

rezvani@ifro.ir

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

2- Islamic Azad University, Science and Research Branch, P.O.Box: 14515-775 Tehran, Iran

3,4- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O. Box: 961 Sari, Iran

5- Islamic Azad University, Tonkabon Branch, P.O.Box: 1616 Tonkabon, Iran

Received: May 2009 Accepted: March 2010

Keywords: Microsatellite, Population Genetics, *Neogobius caspius*, Caspian Sea

Abstract

Neogobius caspius is a small benthic fish, native to the Caspian Sea. The fish is highly important as it comprises the main food item of the Caspian Sturgeons. The genetic diversity of *N. caspius* populations in the Caspian Sea was studied using microsatellite technique. In the study, 115 specimens of *N. caspius* from two regions (Turkmen Bandar and Anzali Bandar) in south Caspian Sea were collected. DNA was extracted using 12 pairs of microstellite primers for which polymerase chain reaction (PCR) was conducted. DNA bands were analyzed using UVdoct and GenAlex software package. Out of 12 microsatellite primers, 11 loci were produced, of which 9 were polymorphic, 2 monomorphic and one showed smear. The average observed and expected hetrozygosity was 0.749 and 0.638, respectively. Significant genetic differences between the two regions were observed ($P \leq 0.01$). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were in all specimens. These results indicate that at least two populations of *N. caspius* exist in the south Caspian Sea.

*Corresponding author