

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگر ریزماهوره

محمد رضایی*؛ علی شعبانی؛ بهاره شعبانپور و حدیثه کشیری

rezai63.mohammad@gmail.com

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۰۷۳۹

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۸۹

لغات کلیدی: ماهی سفید، ریزماهوره، تنگنای ژنتیکی، دریای خزر

صورت که افزایش وزن و طول برحسب سن بتدریج روند نزولی پیدا کرده است (ولی‌پور و خانی‌پور، ۱۳۸۸). این امر بطور مشخص می‌تواند مربوط به برنامه‌های بازسازی و تکثیر مصنوعی باشد که هر ساله توسط مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر سازمان شیلات ایران انجام می‌شود.

تنوع ژنتیکی منابع دریایی اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از آنها دارد زیرا اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها، در شرایط محیطی در حال تغییر است (Diz & Presa, 2009). برنامه‌های بازسازی به منظور افزایش گونه‌های وحشی انجام می‌شوند اما نتیجه آنها اغلب منجر به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ذخایر ژنی بومی و در نهایت انقراض جمعیت‌های محلی می‌شود (Machado et al., 2007). متأسفانه تنها اطلاعات موجود در مورد ماهی سفید مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای بهاره و پاییزه این گونه می‌باشد (چکمه‌دوز و همکاران، ۱۳۸۷) و تاکنون اطلاعاتی در مورد ساختار ژنتیکی ماهی سفید در میان مناطق مختلف منتشر نشده است. با توجه به اینکه اثر روش‌های تکثیر مصنوعی بر ذخایر ژنتیکی آبریان ثابت شده و تکثیر طبیعی ماهی سفید از مدت‌ها قبل به شدت کاهش یافته است و در حال حاضر نیز بیشتر ذخایر این گونه از طریق تکثیر مصنوعی ازدیاد می‌شوند، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه و تشخیص جمعیت‌های مختلف آن برای استفاده در برنامه‌های بازسازی ذخایر و حفظ تنوع این گونه ارزشمند بسیار ضروری می‌باشد.

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سفید ۲۵ نمونه ماهی از رودخانه‌های گرگانرود و قره‌سو در فروردین ماه سال ۱۳۸۵ صید و DNA ژنومی قطعات باله دمی از طریق روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ده جایگاه ژنی ریزماهوره‌ای مورد بررسی قرار گرفت. ده جایگاه ژنی مورد بررسی پلی‌مورف بودند و در هر دو منطقه تنوع نشان دادند. محدوده تعداد آلل در سطح مناطق ۱۳-۴ و محدوده هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ده جایگاه ژنی مورد بررسی ۰/۲۲-۱/۰۰ بدست آمد. مقدار F_{ST} بین جمعیت‌ها ۰/۱۴ بود ($P < 0/05$). آنالیز توزیع تنوع ژنتیکی نشان داد که میزان تنوع درون جمعیتی بسیار بالاست (۹۹ درصد) در حالیکه تنوع بین جمعیتی پایین است (۱ درصد). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ بالایی در هر دو جمعیت دیده شد. نتایج فوق نشان می‌دهند که این گونه هنوز از تنوع ژنتیکی نسبتاً مناسبی برخوردار است و همچنین با توجه به دندروگرام UPGMA ترسیم شده براساس مقدار فاصله ژنتیکی که مناطق را در دو شاخه جدا قرار داد به نظر می‌رسد بیش از یک جمعیت ماهی سفید در سواحل استان گلستان وجود دارد.

ماهی سفید به لحاظ میزان صید و قیمت فروش مهمترین ماهی برای صیادان محسوب می‌گردد و بیش از ۶۰ درصد صید کل ماهیان استخوانی در سواحل ایرانی خزر را تشکیل می‌دهد. تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد که رشد در این گونه در مقایسه با سالهای گذشته بطور بارزی کاهش یافته است، به این

* نویسنده مسئول

فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی برای هر جمعیت در هر جایگاه ژنی همچنین تست انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Genepop 3.1 محاسبه گردید (Raymond & Rousset, 1995). بسته نرم‌افزاری GenALEX (Peakall & Smouse 2006) برای تعیین مقدار F_{ST} (تمایز ژنتیکی زیر جمعیت‌های درون جمعیت کل بر طبق مدل آللی بی‌نهایت (IAM)) براساس فراوانی و همچنین تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و تعیین میزان تمایز بین جمعیت‌ها براساس مقادیر F_{ST} و R_{ST} (تمایز زیر جمعیت‌ها براساس مدل جهش پلهای (SMM)) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) مورد استفاده قرار گرفت. تعیین مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نئی (Nei, 1972) و تعیین رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene صورت گرفت (Yeh et al., 1999).

هر ده جایگاه ژنی مورد بررسی در ماهی سفید پلی‌مورف بودند. در مجموع حدود ۹۵ آلل مختلف با محدوده اندازه ۳۰۸-۱۰۴ جفت باز در کل جایگاه‌های ژنی بدست آمد. دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بین مناطق ۱-۱۲/۰ با میانگین ۰/۷۶ محاسبه گردید. از مجموع ۲۰ تست تعادل هاردی-واینبرگ همه به جز ۳ مورد انحراف از تعادل را نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱: تنوع ژنتیکی ۱۰ جایگاه ژنی مورد مطالعه در جمعیت‌های ماهی سفید

Z21908	Rru4	Rru2	Lid1	CypG30	CypG27	CypG24	CypG3	Ca3	Ca1	
۴	۴	۸	۸	۸	۱۲	۱۳	۱۰	۱۳	۸	N_a
۲/۵۳	۳/۵۴	۶/۱۵	۷/۱۸	۴/۷۱	۶/۳۷	۹/۱۲	۷/۰۲	۹/۲۵	۴/۸۸	N_e
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۵۶	۰/۳۲	۰/۵۶	۱/۰۰	۰/۵۲	۰/۸۸	۱/۰۰	H_0
۰/۶۰	۰/۷۱	۰/۸۳	۰/۸۶	۰/۷۸	۰/۸۴	۰/۸۹	۰/۸۵	۰/۸۹	۰/۷۹	H_e
-۰/۶۵	-۰/۳۹	-۰/۱۹	۰/۳۴	۰/۵۹	۰/۳۳	-۰/۱۲	۰/۳۹	۰/۰۱	-۰/۲۵	F_{IS}
***	***	***	***	***	***	*	***	**	ns	pHw
۵	۴	۱۰	۸	۵	۱۰	۱۱	۱۰	۱۱	۶	N_a
۲/۸۶	۲/۹۴	۷/۱۴	۵/۰۴	۲/۹۸	۶/۶۱	۷/۸۶	۶/۹۴	۵/۲۷	۴/۳۱	N_e
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۴۸	۰/۱۲	۰/۵۲	۱/۰۰	۰/۵۲	۰/۸۰	۱/۰۰	H_0
۰/۶۵	۰/۶۶	۰/۸۶	۰/۸۰	۰/۶۶	۰/۸۴	۰/۸۷	۰/۸۵	۰/۸۱	۰/۷۶	H_e
-۰/۵۳	-۰/۵۱	-۰/۱۶	۰/۴۰	۰/۸۱	۰/۳۸	-۰/۱۴	۰/۳۹	۰/۰۱	-۰/۳۰	F_{IS}
***	***	**	***	***	***	ns	***	*	ns	pHw

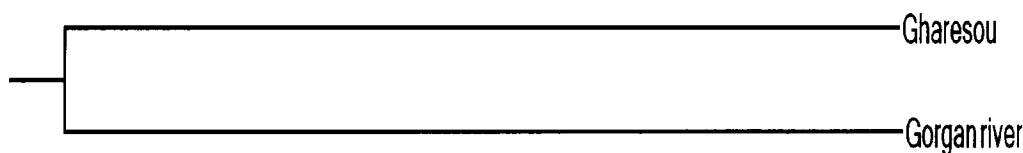
N_a : تعداد آلل. N_e : تعداد آلل موثر
 H_0 : هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_e : هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F_{IS} : شاخص درون آمیزی
 pHw: تست احتمال هاردی-واینبرگ
 (Ns: عدم معنی داری، * $P \leq 0/05$ ، ** $P \leq 0/01$ ، *** $P \leq 0/001$)

آلل تا حدودی پایین می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهند که تعداد آلل برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به هتروزیگوسیتی مناسبتر است (Diz & Presa, 2009). تکثیر مصنوعی ماهی سفید از حدود ۳۰ سال پیش شروع شده و با توجه به نبود شرایط لازم برای تکثیر طبیعی این گونه به نظر می‌رسد جمعیت حاصل از تکثیر مصنوعی بتدریج در حال غالب شدن در دریای خزر می‌باشد (ولی‌پور و خانی‌پور، ۱۳۸۸). با توجه به کاهش شدید تکثیر طبیعی ماهی سفید و مدت زمان طولانی تکثیر مصنوعی این گونه و عدم امکان استفاده از تمام مولدین و نسبت‌های جنسی برابر در زمان تکثیر و همچنین نتایج بدست آمده در این بررسی که کم بودن تعداد آلل‌ها را نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که جمعیت ماهی سفید ساکن در دریای خزر دچار کاهش اندازه جمعیت موثر شده و علائمی از بروز تنگنای ژنتیکی ناشی از عملیات تکثیر مصنوعی را نشان می‌دهند. در این بررسی در اکثر جایگاه‌های ژنی انحراف از تعادل دیده شد، همچنین جایگاه‌های ژنی Ca3, CypG3, CypG27, CypG30 و Lid1 در درصد بالایی از کسری هتروزیگوسیتی را نشان دادند. طبق فرضیه‌های عنوان شده توسط Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ دلایل متفاوتی را می‌توان برای کسری هتروزیگوسیتی ذکر کرد:

- آللهای نول: در نتایج بدست آمده از این تحقیق کسری هتروزیگوسیتی بالایی در جایگاه‌های ژنی مختلف در تمام نمونه‌ها دیده شد. با توجه به بالا بودن مقدار آن اثر آلل‌های نول را در ایجاد این حالت نمی‌توان نادیده گرفت.
- تنگنای ژنتیکی: بیشتر در افزایش ذخایر دیده می‌شود. هنگامی که از تعداد مولدین کم تعداد زیادی لارو تولید می‌کنند که این لاروها بخش اصلی نسل بعدی را تشکیل می‌دهند.

از نظر تمایز بین مناطق مقدار F_{ST} از طریق فراوانی $0/017$ بدست آمد. بررسی نتایج F_{ST} حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نشان می‌دهد که مقدار تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا (۹۹ درصد) در حالیکه مقدار تنوع بین جمعیت‌ها بسیار پایین (۱ درصد) می‌باشد. در زمینه تعیین میزان تمایز بین مناطق نیز مقدار F_{ST} $0/014$ ، $P \leq 0/05$ و مقدار R_{ST} $0/022$ ، $P \geq 0/05$ بدست آمد. براساس معیار فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه $0/86$ و مقدار فاصله ژنتیکی $0/14$ بدست آمد. دندروگرام UPGMA ترسیم شده براساس مقدار فاصله ژنتیکی نشان می‌دهد که این دو منطقه در دو شاخه جدا قرار می‌گیرند (شکل ۱)

تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط اتحادیه بین‌المللی حفاظت از گونه‌ها و طبیعت (IUCN) برای برنامه‌های حفاظت ذخایر است (Lucentini *et al.*, 2009). جریان به سمت افزایش تنوع ژنتیکی از ماهیان آب شیرین به آنادراموس و ماهیان دریای وجود دارد که در مقادیر متوسط هتروزیگوسیتی بدست آمده در این سه منطقه (هتروزیگوسیتی: $0/54$ ، $0/68$ و $0/77$) و همچنین در میانگین تعداد آللهای در جایگاه‌های ژنی (تعداد آلل: $9/1$ ، $10/8$ و $19/9$) مشخص شده است (Dewoody & Avise, 2000). بطور کلی در اثر انحراف ژنتیکی آللهای با فراوانی پایین (آللهای نادر) ابتدا حذف می‌شوند. از اینرو در جمعیت‌هایی که اخیراً اندازه آنها کاهش یافته است بعلاوه افزایش انحراف ژنتیکی در مقایسه با جمعیت‌های ثابت کسری آلل‌های نادر مشاهده خواهد شد (Garza & Williamson, 2001). با مقایسه نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این گونه نسبت به سایر ماهیان آنادراموس در حد مناسب ولی تعداد



شکل ۱: دندروگرام UPGMA ترسیم شده بر اساس فاصله ژنتیکی

منابع

- چکمه‌دوز قاسمی، ف.؛ پورکازمی، م.؛ زمینی، ع.؛ یارمحمدی، م.؛ برادران نویری، ش.؛ رضوانی، س. و عزیززاده، ل.، ۱۳۸۷. بررسی ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه *Rutilus frisii kutum* با استفاده از مارکرهای میکروستلایتی. کتاب چکیده نخستین همایش منابع شیلاتی دریای خزر. صفحه ۸.
- ولی پور، ا. و خانی پور، ع.آ.، ۱۳۸۸. ماهی سفید جواهر دریای خزر. انتشارات مرکز تحقیقات شیلات. ۹۷ صفحه.
- Ballox F. and Lugon-Moulin N., 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Bassam B.J., Caetano-Anolles G. and Gresshoff G.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry*, 84:680-683.
- Dewoody J.A. and Avise J.C., 2000. Microsatellite variation in Marin, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. *Journal of Fish Biology*, 56:461-473.
- Diz P.A. and Presa P., 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician R2as (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*, 287:278-285.
- Garza J.C. and Williamson E.G., 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10:305-318.
- Hamilton P.B. and Tyler C.R., 2008. Identification of microsatellite loci for parentage analysis in roach *Rutilus rutilus* and eight other cyprinid fish by cross-species amplification, and a novel test for detecting hybrid between roach and other cyprinids. *Molecular Ecology Resources*, 8:462-465.
- Hillis D.M., Moritz C. and Mable B., 1996. *Molecular Systematics*. 2nd edition. Sinauer Association Inc. Sunderland, MA. 655P.

یک عامل به تنهایی نمی‌تواند انحراف از تعادل را توضیح دهد اما افزایش جریان ژنی و بروز تنگنای ژنتیکی ناشی از عملیات تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر ماهی سفید را می‌توان از مهمترین عوامل موثر در آن دانست. معمولاً در بررسی‌های جمعیتی میزان F_{ST} شاخص مهمی جهت تمایز و تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Ballox & Lugon-Moulin, 2002). میزان F_{ST} بدست آمده (۰/۱۴) در این بررسی نشان‌دهنده تمایز بسیار پایین اما معنی‌دار ($P < 0/05$) بین دو منطقه است. براساس معیار Wright در سال ۱۹۷۸ مقادیر F_{ST} از صفر تا ۰/۰۵ میزان کم تمایز ژنتیکی، ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ مقدار متوسط و ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ مقدار بالای تمایز را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آنالیز AMOVA نشان داد که ۹۹ درصد تنوع به درون جمعیت‌ها و ۱ درصد به بین جمعیت‌ها مربوط می‌شود. بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz & Presa, 2009). در این بررسی میزان R_{ST} ۰/۲۲ بدست آمد. بنابراین مقادیر پایین F_{ST} ($P < 0/05$) و R_{ST} ($P > 0/05$) نشان‌دهنده تمایز پایین میان دو منطقه است. دلیل پایین بودن تمایز بین مناطق را می‌توان ناشی از مهاجرت و جریان ژنی طبیعی بین آنها دانست. البته نحوه رهاسازی لاروها نیز می‌تواند دلیلی برای کاهش آن باشد زیرا لاروهای بدست آمده از رودخانه‌های مختلف را بدون در نظر گرفتن محل صید مولدین رهاسازی می‌کنند که این امر باعث بالا رفتن تبادل ژنی بین ماهیان مناطق مختلف می‌شود. Thrope و Sol-cava در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که مقادیر فاصله ژنتیکی نئی (Nei, 1972) برای جمعیت‌های هم گونه بطور میانگین ۰/۰۵ (محدوده ۰/۰۲-۰/۰۷)، برای گونه‌های همجنس بطور میانگین ۰/۳۰ (محدوده ۰/۰۳-۰/۶۱)، برای جنس‌های هم خانواده محدوده از ۰/۵۸ تا ۱/۲۱ می‌باشد. مقادیر فاصله بدست آمده در این بررسی در محدوده گونه‌های هم‌جنس قرار می‌گیرند ولی مقدار آن پایین می‌باشد. دندروگرام UPGMA بدست آمده نشان می‌دهد که احتمالاً دو جمعیت مجزا از ماهی سفید در آبهای گلستان وجود دارد. مسلماً بهترین روش برای حفاظت از ماهی سفید بازسازی محل‌های تخم‌ریزی طبیعی این گونه است. با توجه به ضرورت تکثیر مصنوعی مد نظر قرار دادن جدایی جمعیت‌های مختلف این گونه در زمان تکثیر و رهاسازی لاروها و همچنین استفاده از حداکثر تعداد مولدین ضروری می‌باشد.

- Lucentini L., Palomba A., Gigliarelli L., Sgaravizzi G., Lancioni H., Lanfaloni L., Natali M. and Panara F., 2009.** Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox lucius*) population. *Fisheries Research*, 96:139–147.
- Machado-Schiaffino G., Depico E. and Garcia-Vazquez E., 2007.** Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture*, 264:59–65.
- Nei M., 1972.** Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- Peakall R. and Smouse P.E., 2006.** GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Raymond M. and Rousset F., 1995.** GENEPOP (Version 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, 86:248-249.
- Rico C., Ibrahim K.M., Rico I. and Hewitt G.M., 1997.** Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*, 51:462–475.
- Thorpe J.P. and Sol-cava A.M., 1994.** The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematic. *Zoological Scripta*, 23:3-18.
- Wright S., 1978.** Evolution and the genetics of populations. Volume 4: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, USA. 580P.
- Yeh F.C., Yang R.C. and Boyle T., 1999.** POPGENE version 1.3.1 Microsoft windows bases freeware for population genetic analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/ University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.

**Study of genetic structure of *Rutilus frisii kutum*
in Golestan province coastal waters
using microsatellite markers**

Rezaei M.*; Shabani A.; Shabanpour B. and Kashiri H.

rezai63.mohammad@gmail.com

Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739

Gorgan, Iran

Received: July 2009

Accepted: April 2010

Keywords: *Rutilus frisii kutum*, Microsatellite, Genetic bottleneck, Caspian Sea

Abstract

To determine the genetic diversity of *Rutilus frisii kutum*, 25 samples were collected from Gharesou and Gorgan-rud rivers in April 2008. The genomic DNA was extracted from the caudal fin using phenol- chloroform method and investigated with 10 microsatellite loci. All the 10 investigated loci were polymorphic and showed variability in the two populations of the rivers. The mean number of allele per locus at population level and the observed heterozygosity ranged from 4 to 13 and 0.22 to 1.00, respectively. The F_{ST} value between populations was 0.014 ($P < 0.05$), and the analysis of genetic variation distribution indicated a very high within population variation (99%) while among population variation is low (1%). Highly significant deviation from hardy-Weinberg equilibrium was observed in both populations which can be attributed either to the presence of null alleles or to the genetic bottleneck. The results indicated a high level of genetic variation in this species and we concluded that there is more than one population of *Rutilus frisii kutum* in Golestan coastal waters.

* Corresponding author