تنوع و تمایز ژنتیکی اردک ماهی (*Esox lucius*) تالاب انزلی در فصول تخمریزی زمستان و بهار با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

محمدهادی سمیعی*[۱]، مهرنوش نوروزی[۱] و علی ناظمی[۲]

[۱] گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

[۲]گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۸

چکیده

اردک ماهی، *Esox lusius* یکی از ماهیان اقتصادی دریای خزر است که در بررسی حاضر ساختار ژنتیک جمعیت آن در تالاب انزلی با استفاده از پنج جفت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرارگرفت. در کل، ٦۰ نمونه اردک ماهی بالغ در دو فصل تخمریزی بهار و زمستان، از تالاب انزلی جمع‌آوری شدند. همگی پرایمرها چندشکل (پلی‌مورف) نشان دادند و از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی استفاده شد. میانگین اللی در جایگاه‌ها ۱۰/۸ (دامنه اللی ۹ تا ۱۳ ال) بود. هر دو فصل نمونه‌برداری الل‌های اختصاصی در تمامی جایگاه‌ها را نشان دادند. میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب، ۰/۸۸۳ و ۰/۹۱۳ محاسبه شد. میانگین ضریب خویشاوندی در ۵ جایگاه ریزماهواره منفی بود. در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) به جز یک جایگاه در فصل بهار، سایر جایگاه ها خارج از تعادل بودند (P<۰/۰۱). بر اساس تست AMOVA، میزان F_{ST} و R_{ST} بین دو فصل معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/٤٤۲ بدست آمد که نشان‌دهنده وجود تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است. این بررسی، وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی اردک ماهی در تالاب انزلی در فصل‌های مختلف تخم‌ریزی را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: اردک ماهی، *Esox lusius*، ژنتیک جمعیت، تالاب انزلی، ریزماهواره.

مقدمه

اردک ماهی، *Esox lucius* Linnaeus, 1758، یکی از ماهیان آب شیرین است. تالاب انزلی و مصب رودخانه‌های منتهی به این تالاب، یکی از زیستگاه‌های اصلی این ماهی در جنوب دریای خزر است (عبدلی و نادری ۱۳۸۷). این ماهی به‌صورت انفرادی زندگی می‌کند و در فصل تخم‌ریزی در مناطق کم‌عمق یا مکان‌های مملو از مواد غذایی جمع می‌شوند. دوره تخم‌ریزی این ماهی در تالاب انزلی از اواخر بهمن ماه تا اواسط اردیبهشت‌ماه می‌باشد (حسین‌زاده صحافی، ۱۳۹۰). این ماهی با توجه به رشد نسبتاً خوبی که دارد، می‌تواند یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی است ضمن آنکه به لحاظ صید ورزشی با قلاب، طرفداران بسیاری دارد، اما در سال‌های اخیر به‌علت تخریب زیستگاه آن (آلودگی آب‌ها و از بین رفتن نی‌زارها)، نسل آن رو به کاهش نهاده است و بر اساس این شرایط از نظر وضعیت حفاظتی در گروه گونه‌های نیازمند حفاظت قرار گرفته است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). تالاب انزلی که یکی از تالاب‌های ثبت شده در کنوانسیون رامسر و دارای اهمیت بسیار زیاد از جنبه‌های مختلف (از جمله آبزیان با ارزش آن) است.

*نویسنده مسئول: hadisamie@gmail.com

در سالیان گذشته، تبدیل زمین و ورود رسوبات و انواع آلاینده‌ها و مواد مغذی به تالاب، باعث کاسته شدن از عمر طبیعی این اکوسیستم آبی با ارزش شده است، به طوری‌که درصورت ادامه وضعیت کنونی، این تالاب و آبزیان موجود در آن) بسیار زودتر از سرنوشت طبیعی خود از میان خواهد رفت (قهرمان و عطار، ۱۳۸۱؛ توکلی و ثابت رفتار، ۱۳۸۱) بنابراین مطالعه ساختار ژنتیکی گونه‌های موجود در آن از جمله اردک ماهی نشان‌دهنده اثر شرایط کنونی بر بقای این آبزیان است. بررسی اکولوژی و ژنتیک جمعیت ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از ذخایر آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang *et al*., 2007). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها برای بقای طولانی مدت گونه، ضروری است (Bataillon *et al*., 1996) و اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع دریایی دارد و از این‌رو به‌عنوان اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی درحال تغییر، قلمداد می‌گردد (Diz and Presa, 2009). همچنین هر چه دانش ما از جمعیت‌ها و تنوع درون گونه‌های گونه بیشتر باشد تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت‌آمیزتر است. از جمله این نشانگرهای مولکولی، نشانگر ریزماهواره می‌باشد که قادر است سطوح بالایی از چندشکلی را نشان دهند (Chistiakov *et al*., 2005). طبیعت چند لای ریزماهواره‌ها، توارث هم‌بارز، پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا موجب شده است که ریزماهواره‌ها کاربری موفقی با تنوع بالا در رشته‌های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند (Sekar *et al*., 2009). از مطالعات انجام شده با استفاده از ریزماهواره بر روی اردک ماهیان می‌توان به Reading و همکاران (۲۰۰۳)، Nicod و همکاران (۲۰۰٤)، Jacobsen و همکاران (۲۰۰۵)، Launey و همکاران (۲۰۰۵)، Larsen و همکاران (۲۰۰۵)، Lucentini و همکاران (۲۰۰٦)، Wang و همکاران (۲۰۱۱) اشاره نمود.

مطالعه حاضر، به بررسی ساختار ژنتیکی اردک ماهی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره در حوضه جنوبی دریای خزر در تالاب انزلی در دو فصل زمستان و بهار می‌پردازد؛ با این فرضیات که اردک ماهی دارای جمعیت‌های مختلف در فصول تخمریزی زمستان و بهار است و فراوانی ژنوتیپی و اللی هر یک از جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت است، نمونه‌برداری از دو فصل مختلف تخمریزی در تالاب انزلی انجام شده تا وجود جمعیت‌های احتمالی و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره شناسایی شود و ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت بر ذخایر این گونه در دریای خزر بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از ٦۰ نمونه ماهی بالغ از تالاب انزلی (E ′۱۷ °٤۹ ، ′۲۹ °۳۷) در دو فصل تخم‌ریزی زمستان و بهار (در هر فصل ۳۰ نمونه)، از قسمت باله‌ی دمی انجام شد. سپس نمونه‌ها در الکل ۹٦٪ تثبیت گردید و به آزمایشگاه ژنتیک انتقال یافت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع مرحله استخراج نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت از شرکت Roach آلمان و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

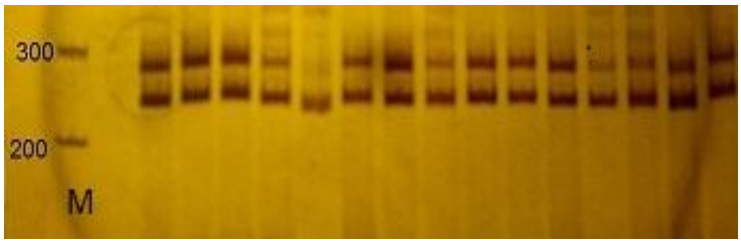
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با ۵ جفت نشانگر ریزماهواره انجام گردید (جدول ۱). واکنش

PCR توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت BIO-RAD با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱ میکرولیتر پرایمر میکس، MgCl2 (۲۵Mm) ۱/۵ میکرولیتر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و با آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌ترتیب، مرحله جداسازی ۹۵–۹٤ درجه سانتی‌گراد از ٤۵ ثانیه تا ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۷ تا ٦۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۰ ثانیه تا ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه، مرحله بسط پرایمر ۷۲–۷۰ درجه سانتی‌گراد، ٤۵ ثانیه تا ۲ دقیقه بهینه‌سازی گردید. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت. تصویر ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار uvitec بررسی شد.

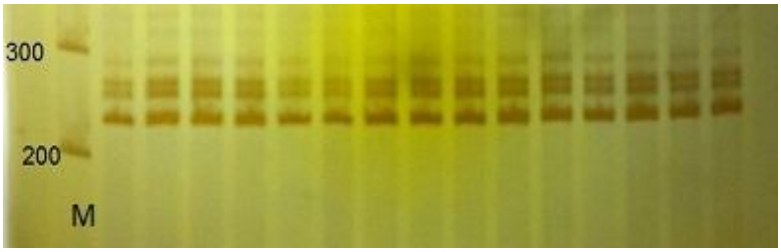
پس از رتبه‌دهی به الل‌ها محاسبات آماری شامل فراوانی اللی[1]، تعداد الل مشاهده شده (Na) و تعداد الل موثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، ضریب خویشاوندی (Fis)، شاخص تمایز F_{ST} براساس فراوانی اللی، جریان ژنی، ماتریس شباهت[2] و فاصله ژنتیکی[3] بر اساس Nei,1972، تعادل هاردی وینبرگ بر اساس χ^2، مقادیر R_{ST} و F_{ST} براساس AMOVA[4] در سطح اطمینان ۱ درصد و با نرم‌افزار GeneAlex محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2009).

نتایج

در این مطالعه، تمام ۵ جایگاه مورد بررسی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شدند و چندشکلی نشان دادند. در شکل‌های ۱ تا ۳ برخی از باندها نشان داده شده است.

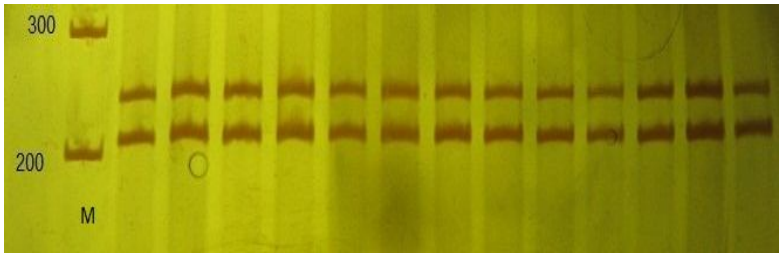


شکل ۱- محصول PCR و آرایش باند DNA اردک ماهی با استفاده از پرایمر Eluc002، M: مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت باز



شکل ۲- محصول PCR و آرایش باند DNA اردک ماهی با استفاده از

1- Allel frequency
2- Genetic identity
3- Genetic distance
4- Analysis of MOlecular Variance



شکل ۳- محصول PCR و آرایش باند DNA اردک ماهی با استفاده از پرایمر Eluc041، M: مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت باز

در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاه‌ها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد. در این بررسی، در کل ٦٤ الل شناسایی شد. در نمونه‌های فصل زمستان ۵۰ الل شناسایی شد که ۲٦ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. در نمونه‌های فصل بهار ۵۸ الل شناسایی شد که ۲۲ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. بیشترین فراوانی اللی (۰/۲۱۷) را جایگاه‌های Eluc004 و جایگاه Eluc045 به‌ترتیب، در زمستان و بهار نشان دادند. بیشترین تعداد الل را جایگاه‌های Eluc004 و Eluc045 هر کدام با ۵ الل نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- اندازه اللی و فراوانی اللی در ۵ جایگاه ریزماهواره در نمونه های اردک ماهی در دو فصل زمستان و بهار.

جایگاه	اندازه اللی	فراوانی اللی			اندازه اللی	فراوانی اللی	
Eluce002	(جفت باز)	زمستان	بهار	Eluce004	(جفت باز)	زمستان	بهار
	۲٤٤	۰/۰۰	۰/۰۵۰		۲۳۸	۰/۰۰	۰/۱۰۰
	۲٤۸	۰/۱۳۳	۰/۰۸۳		۲٤۰	۰/۰۰	۰/۱۳۳
	۲۵۰	۰/۱۵۰	۰/۱۸۳		۲٤۲	۰/۰۰	۰/۱۳۳
	۲۵۲	۰/۱۳۳	۰/۱٦۷		۲٤٤	۰/۱۳۳	۰/۰۵۰
	۲۵٤	۰/۰۸۳	۰/۰۸۳		۲٤٦	۰/۰۳۳	۰/۰۵۰
	۲۷٤	۰/۰۵۰	۰/۰۰		۲٤۸	۰/۰۸۳	۰/۰۵۰
	۲۷٦	۰/۱۰۰	۰/۰۸۳		۲۵٤	۰/۱۵۰	۰/۰۰
	۲۷۸	۰/۰۸۳	۰/۱۰۰		۲۵۸	۰/۱٦۷	۰/۰۰
	۲۸۰	۰/۱۰۰	۰/۲۰۰		۲٦۲	۰/۰٦۷	۰/۰٦۷
	۲۸۲	۰/۰۵۰	۰/۰۵۰		۲٦٤	۰/۰۱۷	۰/۱۱۷
	۲۸٤	۰/۱۱۷	۰/۰۰		۲٦۸	۰/۰۱۷	۰/۱۱۷
					۲۷۰	۰/۱۰۰	۰/۱۱۷
					۲۷۲	۰/۲۱۷	۰/۰٦۷
					۲۷٤	۰/۰۱۷	۰/۰۰
Eluce027	۱٤۲	۰/۰۰	۰/۰۵۰	Eluce041	۲۱۰	۰/۰۳۳	۰/۰۸۳
	۱٤٤	۰/۰۰	۰/۰۸۳		۲۱۲	۰/۰۸۳	۰/۰٦۷
	۱٤٦	۰/۰۰	۰/۰٦۷		۲۱٤	۰/۰۸۳	۰/۱۰۰

۰/۰۸۳	۰/۰۶۷	۲۱۶	۰/۰۵۰	۰/۰۰	۱۴۸
۰/۰۸۳	۰/۱۱۷	۲۱۸	۰/۱۱۷	۰/۰۸۳	۱۵۰
۰/۰۳۳	۰/۰۶۷	۲۲۰	۰/۰۵۰	۰/۱۸۳	۱۵۲
۰/۰۵۰	۰/۰۵۰	۲۲۲	۰/۱۰۰	۰/۱۵۰	۱۵۴
۰/۱۶۷	۰/۰۸۳	۲۲۸	۰/۰۶۷	۰/۱۱۷	۱۵۶
۰/۱۱۷	۰/۱۸۳	۲۳۰	۰/۰۳۳	۰/۰۵۰	۱۵۸
۰/۱۰۰	۰/۱۳۳	۲۳۲	۰/۰۸۳	۰/۰۶۷	۱۶۲
۰/۰۳۳	۰/۰۰	۲۳۴	۰/۱۱۷	۰/۰۵۰	۱۶۴
۰/۰۸۳	۰/۱۰۰	۲۳۶	۰/۱۰۰	۰/۱۵۰	۱۶۶
			۰/۰۸۳	۰/۱۵۰	۱۶۸

ادامه جدول ۱ -

فراوانی اللی		اندازه اللی	جایگاه
بهار	زمستان	(جفت باز)	Eluce045
۰/۱۰۰	۰/۰۰	۱۷۰	
۰/۱۰۰	۰/۰۰	۱۷۲	
۰/۱۰۰	۰/۰۰	۱۷۴	
۰/۲۱۷	۰/۰۰	۱۷۶	
۰/۰۳۳	۰/۰۰	۱۷۸	
۰/۰۳۳	۰/۰۱۷	۱۸۲	
۰/۰۱۷	۰/۱۳۳	۱۸۶	
۰/۰۶۷	۰/۱۸۳	۱۸۸	
۰/۰۶۷	۰/۰۸۳	۱۹۰	
۰/۰۶۷	۰/۱۰۰	۱۹۲	
۰/۰۶۷	۰/۰۱۷	۱۹۶	
۰/۰۰	۰/۲۰۰	۲۰۰	
۰/۱۱۷	۰/۱۱۷	۲۰۲	
۰/۰۱۷	۰/۱۵۰	۲۰۴	

مجموعاً ۱۳ الل اختصاصی یافت شد. نمونه‌های زمستان و بهار به‌ترتیب دارای ٤ و ۹ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰/۰۵ بودند که در فصل دیگر نمونه‌برداری مشاهده نشد. بیشترین الل اختصاصی را جایگاه‌های Eluc004 و Eluc045 هر یک با ۵ الل اختصاصی نشان دادند. جایگاه Eluc004 با تعداد ۵ الل اختصاصی (۲ عدد در زمستان به فراوانی ۰/۱۵۰ و ۰/۱۶۰، ۳ عدد در بهار به‌ترتیب، به فراوانی ۰/۱۰۰، ۰/۱۳۳ و ۰/۱۳۳) نشان داد. جایگاه Eluc045 با تعداد ۵ الل اختصاصی (یک عدد در زمستان به فراوانی ۰/۲۰۰ و ٤ عدد در بهار به‌ترتیب، به‌فراوانی ۰/۱۰۰، ۰/۱۰۰، ۰/۱۰۰ و ۰/۲۱۷) نشان داد. جایگاه Eluc027 با تعداد ۲ الل اختصاصی هر دو در بهار (به فراوانی ۰/۰۸۳ و ۰/۰۶۷) نشان داد. جایگاه Eluc002 با تعداد یک الل اختصاصی در زمستان (به فراوانی ۰/۱۱۷) نشان داد (جدول ۱). میانگین تعداد کل الل واقعی و

موثر به‌ترتیب، ۱۰/۸ و ۸/۷ بود. دامنه اللی از ۹ تا ۱۳ الل بدست آمد. تعداد زیادی الل در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر یافت شد. در این بررسی دامنه Ho بین دو فصل نمونه‌برداری در تمامی جایگاه‌ها ۰/۷۳۳ تا ۱ و متوسط ۰/۹۱۳ بود. میانگین Ho در فصل‌های زمستان و بهار به‌ترتیب، ۰/۹۰۰ و ۰/۹۱۳ بود. دامنه He نیز بین ۰/۸۵۵ تا ۰/۹۱٤ و متوسط آن ۰/۸۸۳ بود. میانگین He در فصل‌های زمستان و بهار به‌ترتیب، ۰/۸۷۳ و ۰/۸۹۳ بود. در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاه‌ها خارج از تعادل بودند (P≤۰/۰۰۱). فقط در جایگاه Eluc027 در فصل بهار انحراف از تعادل دیده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل های مؤثر (Ne)، الل‌های اختصاصی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی قابل انتظار (He)، انحراف از تعادل هاردی- وینبرگ

جایگاه	فصل نمونه برداری		دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
	زمستان	بهار	اندازه باند (جفت باز)
Eluc002			۵۸
Na(Ne)	۱۰(۹)	۹(۷/۲)	۲٤٤-۲۸٤
Ho(He)	۱ (۰/۸۸۹)**	۰/۸٦۷ (۰/۸٦۳)**	
Eluc004			۵۷
Na(Ne)	۱۱ (۷/۲)	۱۱(۹/۷)	۲۳۸-۲۷۲
Ho(He)	۰/۷۳۳ (۰/۸٦۲)***	۰/۹٦۷ (۰/۸۹۷)**	
Eluc027			۵۹
Na(Ne)	۹(۷/٦)	۱۳(۱۱/٦)	۱٤۲-۱٦۸
Ho(He)	۰/۸۳۳ (۰/۸٦۹) ***	۰/۹۳۳(۰/۹۱٤)ns	
Eluc041			۵۹
Na(Ne)	۱۱(۹/۲)	۱۲(۱۰/۱)	۲۱۰-۲۳٦
Ho(He)	۱ (۰/۸۹۲) ***	۱ (۰/۹۰۲) ***	
Eluc045			٦۱
Na(Ne)	۹(٦/۸)	۱۳(۹)	۱۷۰-۲۰٤
Ho(He)	۰/۹۳۳ (۰/۸۵۵) ***	۰/۸ (۰/۸۸۹) **	کل
Na(Ne) میانگین	۱۰ (۸)	۱۱ (۹/۵)	۱۰/۸(۸/۷)
Ho(He) میانگین	۰/۹ (۰/۸۷۳)	۰/۹۱۳ (۰/۸۹۳)	۰/۹۰۷(۰/۸۸۳)

(معنی‌دار نیست، ns ؛ *** P<۰/۰۰۱ ؛ ** P<۰/۰۱ ؛ * P<۰/۰۵) در ۵ جایگاه ریزماهواره

میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۲۳ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux *et al*., 2002). میزان F_{ST} و R_{ST} بر اساس تست AMOVA ، معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) و میزان جریان ژنی ۱/۱۹بر اساس R_{ST} محاسبه شد. میانگین ضریب آمیزش خویشاوندی (Fis) در تمامی جایگاه‌های ریزماهواره ۰/۰۲٦- بود و دامنه آن از ۰/۰۳۳ در جایگاه Eluc004 تا ۰/۱۱۵- در جایگاه Eluc041 بدست آمد. مقادیر مثبت Fis نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Eluc004 با کمترین میزان Fis بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاه‌ها نشان داد (جدول ۲). فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (۱۹۷۲)، ۰/٤٤۲ و میزان شباهت ژنتیکی ۰/٦٤۳ بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۳- میزان شاخص تمایز (F_{ST}) و ضریب خویشاوندی (F_{IS}) در هر جایگاه

	جایگاه					
	Eluc002	Eluc004	Eluc027	Eluc041	Eluc045	میانگین (SE)
F_{ST}	۰/۰۱۰	۰/۰۴۰	۰/۰۱۴	۰/۰۰۵	۰/۰۴۶	۰/۰۲۳ (۰/۰۰۸)
F_{IS}	-۰/۰۶۵	۰/۰۳۳	۰/۰۰۹	-۰/۱۱۵	۰/۰۰۶	-۰/۰۲۶ (۰/۰۲۸)

بحث

تالاب انزلی یکی از با ارزش‌ترین زیستگاه‌های آبی کشور است که متأسفانه در سالیان گذشته با افزایش میزان آلودگی، توسعه صنایع، افزایش بی‌رویه جمعیت در حاشیه تالاب، توسعه مناطق کشاورزی و استفاده از سموم دفع آفات و کودها، افزایش ورود فاضلاب‌های شهری و صنعتی و پساب‌های کشاورزی به این تالاب، در وضعیت نابسامانی قرار گرفته است. آبزیان این تالاب و بخصوص اردک ماهی که از جمله ماهیان با ارزش آن است نیز در وضعیت بحرانی قرار دارد. از این رو حفاظت از ذخایر ارزشمند آن ضروری به نظر می‌رسد. آگاهی از میزان ذخایر توارثی و تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است. به‌طوری‌که بررسی‌های ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان با ارزش اقتصادی به منظور حفاظت از جمعیت آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang *et al*., 2007). هم اکنون، کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا توجه محققان را به اعمال روش‌های دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب نموده است (Lin *et al*., 2000).

تعداد الل و هتروزیگوسیتی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در مواجه با تغییرات محیطی هستند (Frankham, 2008) و میزان رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌سازد (Hakansson and Jensen, 2005). نتایج بررسی حاضر بر روی اردک ماهی نشان می‌دهد که و دامنه اللی بین ۹ تا ۱۳ الل و میانگین تعداد اللی بدست آمده در این بررسی (۰/۴۹±۱۰/۸) در محدوده اعلام شده (۶/۱/±۹/۱) برای ماهیان آب شیرین است (DeWoody and Avis, 2000). در مقایسه با تحقیقات سایر محققین در اردک ماهی، Wang و همکاران (۲۰۱۱) میانگین تعداد اللی بدست آمده ۷/۶۷ و دامنه اللی بین ۲ تا ۱۳ الل بدست آوردند، Reading و همکاران (۲۰۰۳)، میانگین تعداد اللی ۵ ودامنه اللی بین ۲ تا ۱۱ الل اعلام کردند. Jacobsen و همکاران (۲۰۰۵)، دامنه اللی بین ۷ تا ۱۱ الل محاسبه کردند. با وجود اینکه تعداد الل بدست آمده در محدوده ماهیان آب شیرین و اردک ماهیان می‌باشد اما در این بررسی تعداد زیادی الل با فراوانی پایین بدست آمد. وجود الل‌های زیاد با فراوانی پایین نشان‌دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon *et al*., 2004). کاهش تغییرپذیری ژنتیکی در ذخایر این گونه را می‌توان به مشکلاتی از قبیل صید بی‌رویه به ویژه در مناطق حفاظت شده، آلودگی زیست‌محیطی، تخریب زیستگاه اصلی (تالاب انزلی) و پایین آمدن سطح آب دریای خزر طی چند دهه گذشته دانست. مجموع این عوامل موجب از بین رفتن میکروزیستگاه‌ها و کاهش منابع غذایی اردک ماهی در سال‌های اخیر بوده است که منجر به کاهش شدید ذخایر آن درتالاب انزلی گردیده است. ادامه چنین روندی موجب کاهش تنوع ژنتیکی می‌گردد و در نتیجه، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش می‌دهد (Shen

and Gong, 2004) و در صورت تداوم وضع موجود باید شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود.

هترزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد. همچنین بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است (Beardmore *et al*., 1997). نتایج بررسی حاضر بر روی اردک ماهی نشان می‌دهد که میانگین هترزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۹ (±۰/۰۵۲) است و بیشتر از مقدار اعلام شده (۰/۵٤±۰/۲۵) برای ماهیان آب شیرین است (DeWoody and Avis, 2000). در این بررسی در هر دو فصل نمونه‌برداری میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار کمی بالاتر و مشابه با تحقیقات سایر محققین در اردک ماهیان بود. به‌طوری‌که Wang و همکاران (۲۰۱۱) دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۱٥٤ تا ۰/۸٤٦ و هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۱٤٥ تا ۰/۸۱۷ بدست آوردند، Reading و همکاران (۲۰۰۳)، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۱۹۰ تا ۰/۹۱۷ و هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۱۹٤ تا ۰/۸٥۰ اعلام نمودند. Jacobsen و همکاران (۲۰۰٥)، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را صفر تا ۰/۸٥۲ و هتروزیگوسیتی قابل انتظار را صفر تا ۰/۷۷۷ محاسبه کردند. در بررسی حاضر، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۷۳۳ تا یک و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸٥٥ تا ۰/۹۱٤ بدست آمد. احتمالاً افزایش هتروزیگوسیتی در برخی جایگاه‌ها به علت وجود الل‌های نول می‌باشد که به اشتباه رتبه‌دهی شده‌اند. همچنین احتمال وجود افراد نامرتبط از دیگر مناطق به تالاب را از دلایل دیگر افزایش میزان هتروزیگوسیتی می‌توان در نظر داشت.

در بررسی حاضر بر روی اردک ماهی، هر دو فصل نمونه‌برداری تقریباً همه جایگاه‌ها خارج از تعادل هاردی- وینبرگ بودند (P≤۰/۰۰۱). چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی از وجود الل‌های پوچ (Null) باشد که پهلوگیری در آنها صورت نمی‌پذیرد و بروز آن در توارث ریزماهواره در اردک ماهیان تایید شده است (Wang *et al*., 2011, Aguilar *et al*., 2005, Lucentini *et al*., 2006, Reading *et al*., 2003, Larsen *et al*., 2005). به نظر می‌رسد، اختلاط جمعیت‌ها مهم‌ترین عاملی است که سبب می‌گردد تعادل هاردی – وینبرگ برقرار نباشد.

R_{ST} و F_{ST} به‌طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند (Balloux and Lugan, 2002). در این بررسی، میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۲۳ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux *et al*., 2002). بر اساس تست AMOVA میزان R_{ST} و F_{ST} بین دو فصل نمونه‌برداری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). از این رو به نظر می‌رسد که حداقل دو جمعیت مختلف ژنتیکی تالاب انزلی وجود داشته باشد. پایین بودن مقدار F_{ST} به علت پلی‌مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در ریزماهواره‌ها و مهاجرت در نقاط مختلف تالاب است که احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی است و موجب ارتباط زیاد در زیر جمعیت‌ها می‌شود و می‌تواند به‌طور موثری میزان F_{ST} را کاهش دهند (Balloux and Lugan, 2002). Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thorpe and Sol-Cave (۱۹۹٤) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جدایی جمعیت‌ها را به‌طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۰۳ تا ۰/٦۱) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/٤٤۲) و نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

این بررسی، دلایل و نتایج اولیه برای وجود جمعیت‌های متمایز اردک ماهی در فصل های مختلف تخم‌ریزی و وجود تنگناهای ژنتیکی بر آنها در تالاب انزلی را نشان می‌دهد و برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن ضروری است، توجه و اقدام جدی صورت پذیرد. کاهش جمعیت‌های اردک ماهی در طول سال‌های گذشته، اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را با نگهداری تمامیت ژنتیکی جمعیت‌های این ماهی روشن می‌سازد. بنابراین شناسایی ساختار جمعیت این ماهی با ارزش به طراحی مناسب برنامه‌های بازسازی ذخایر کمک می‌کند.

منابع

۱. توکلی، ب. و ثابت رفتار، ک. ۱۳۸۱. مطالعهٔ تاثیر فاکتورهای مساحت، جمعیت وتراکم جمعیت حوزهٔ آبخیز بر روی آلودگی رودخانه‌های منتهی به تالاب انزلی. مجلهٔ محیط شناسی. ویژه‌نامهٔ تالاب انزلی. صفحه ۵۷ -۵۱.

۲. حسین‌زاده صحافی، ه. ۱۳۹۰. نقشه راه توسعه آبزی‌پروری ماهیان گرمابی کشور. کانون هماهنگی دانش و صنعت آبزی‌پروری کشور. ۱۳۰ صفحه.

۳. عبدلی، ا. و نادری، م. ۱۳۷۸. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان. ۲۴۲ صفحه.

4. Aguilar, A., Banks, J.D., Levine, K.F., and Wayne, R.K., 2005. Population genetics of northern pike (*Esox lucius*) introduced into Lake Davis. California. Can. J. Fish. Sci. Aquat. 62, 1589-1599.
5. Alarcon, J.A., Magoulasb, A., Georgakopoulosb, T., Zourosb, E., and Alvareza, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquacult. 230, 65-80.
6. Bataillon, T.M., David, J.L., and Schoen, D.J., 1996. Neutral genetic markers and conservation. Simulated germplasm collections. Genetics. 144, 409-417.
7. Beardmore, J.A., Mair, G.C., and Lewis, R.I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquat. Res. 28, 829– 839.
8. Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A., and Volchaert, F.A. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Genetics. 170, 1821-1826.
9. Dewoody, J.A., and Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine freshwater and anadermous fishes with other animals. Fish Biol. 56, 461-473.
10. Diz, P.A., and Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquacult. 287: 278-285.
11. Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Mol. Ecol. 17: 325-333.
12. Hakansson. J., and Jensen, P. 2005. Behavioral and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biol. Cons. 122: 431–439.
13. Jacobsen, B.H., Hansen, M.M., and Loeschcke, V. 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius* L.) populations: Insights into the genetic structure & demographic history of a genetically depauperate species. Biol. J. Lin. Soc. 84:91-101.
14. Larsen, P.F., Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Jensen, L.F., and Loeschcke, V. 2005. Stocking impact and temporal stability of genetic composition in a brackish northern pike population (*Esox lucius* L), assessed using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. Heredity. 9: 136–143.
15. Launey, S., Krieg, F., Morin, J., and Laroche, J. 2003. Five new microsatellite markers for Northern pike (*Esox lucius*). Mol. Eco. Notes. 3:366-368.

16. Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigharelli, L., Natali, M., and Panara, F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L.). Fish. Res. 80: 251-262.
17. Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. Amr. Nature. 106: 283-292.
18. Nicod, J.C., Wang, Y.Z., Excoffier, L., and Largiade, C.R. 2004. Low levels of mitochondrial DNA variation among central and southern European (*Esox lucius*) populations. J. Fish Biol. 64: 1442–1449.
19. Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. GenAlEx 6.41: Genetic Analysis in Excel Population genetic software for teaching & research The Australian National University. Canberra. Australia. Available at: http://wwwanueduau/BoZo/GenAlEx.
20. Reading, B.J., Wills, P.S., Heidinger, R.C., and Heist, J.H. 2003 development of microsatellite markers for muskllange (*Esox masquinongy*) & cross-species amplification in two other Esocids. Mol. Ecol. 3: 447-449.
21. Sekar, M., Suresh, E., Kumar, N.S., Nayak, S.K., and Balakrishna, C. 2009. Microsatellite DNA markers a fisheries perspective Part 1: The nature of microsatellites. genetic. biodiv. 27-29.
22. Shaklee. J.B., Tamaru, C.S., and Waples, R.S. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Sci. 36, 141-157.
23. Shen, X.Y., and Gong, Q.L. 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus* using RAPD and microsatellite technique. Ocean. Limn. Si. 35: 332–341.
24. Thorpe, J.P., and Sole-Cava, A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zool. Scripta. 23, 3-18.
25. Wang, J., Chenghui, W., Long, Q., Yuqing, M.A., Xinxin, Y., Zsigmond, J., and Sifa, L.I. 2011. Genetic characterization of 18 novel microsatellaite loci in northern pike (*Esox lucius*). Genetic Mol. Biol. 34: 169-172.

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 9, No. 1, April 2015

Genetic variability and differentiation of Anzali Wetland Pike (*Esox lucius*) during Spawning Seasons, winter and spring, using microsatellite molecular method

[*]M.H. Samiei[1], M. Norouzi[1] and A. Nazemi[2]
[1]Dept. of Marine Biology and Fishery, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonkabon, Iran
[2]Dept. of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonkabon, Iran

Abstract

Pike, *Esox lusius* is one of the most valuable commercial species that evaluated the genetic structure in Anzali wetland using microsatellite markers. A total of 60 specimens of adult pikes were sampled from two spawning seasons, winter and spring, in Anzali wetland. Five pairs of microsatellites, tested on the genomic DNA that all loci of microsatellite produced polymorphic bands as polymorphic loci were used to analyze the genetic variation of the pick. Analyses revealed that average of alleles per locus was 10.8 (range 9 to 13 alleles). All sampled seasons contained private alleles. The average observed and expected heterozygosity was 0.913 and 0.883, respectively. The inbreeding coefficient values of five microsatellite loci were negative. With the exception of one loci in spring, all loci significantly deviated from H-W equilibrium ($P<0.01$). Based on AMOVA, R_{ST} and F_{ST} values were significant between seasons ($P<0.01$). The genetic distance between populations was 0.442, which indicates that the genetic difference among the studied populations is pronounced. These results support the existence of different genetic populations in spawning seasons Anzali wetland.

Keywords: Pike, *Esox lucius,* Population Genetic, Anzali Wetland, Microsatellite.

[*]Corresponding author; hadisamie@gmail.com