

## بررسی ژنتیک جمعیت گاو ماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*)

### حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

حمزه پورغلام<sup>(۱)\*</sup>؛ عباسعلی زمینی<sup>(۲)</sup>؛ فرامرز لالوئی<sup>(۳)</sup>؛ حسین خارا<sup>(۴)</sup>؛ مهدی نادری<sup>(۵)</sup> و

محمد جواد تقوی<sup>(۶)</sup>

۱ و ۲- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳ و ۴- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی ۹۶۱

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۸

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۸

### چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گاو ماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهورها، تعداد ۱۳۳ نمونه ماهی از سواحل دریای خزر شامل مناطق گلستان (۲۸ نمونه)، مازندران (۵۳ نمونه) و گیلان (۵۲ نمونه) جمع‌آوری شد. سپس حدود ۵-۳ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله سینه‌ای و باله پشتی جدا و در الکل اتیلیک خالص (۹۶ درصد) تثبیت گردید و برای انجام مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شد.

DNA ژنومی نمونه‌ها از بافت نرم باله ماهی به روش فنل- کلروفرم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از بیوفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش PCR با استفاده از ۶ جفت پرایمر ریزماهورها صورت گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. جهت سنجش وزن مولکولی محصول PCR برحسب جفت باز (bp) و تعیین ژنوتیپ‌ها از نرم افزار UV Duc استفاده گردید. مقادیر مربوط به فراوانی آللی، تعداد آللهای واقعی و موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر  $F_{ST}$ ،  $R_{ST}$  و جریان ژنی براساس آزمون AMOVA با استفاده از نرم‌افزار ژنتیکی Gene Alex محاسبه گردید. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که هر ۶ جفت پرایمر ریزماهورها ای بررسی شده در گاو ماهی سرگنده، پلی مورف بودند. میانگین تعداد آللهای مشاهده شده و موثر بترتیب ۱۱/۴۴ و ۷/۲۸ بود و حداکثر هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار بترتیب ۰/۹۶۴ و ۰/۹۳۲ محاسبه گردید. در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ مناطق گلستان، گیلان و مازندران در تمامی جایگاههای مورد بررسی با استثنای جایگاه NG71 و NG111 در منطقه گلستان، خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند ( $P < 0.05$ ).

براساس محاسبات انجام شده حداکثر  $F_{ST}$  (۰/۰۶) بین نمونه‌های گلستان و گیلان که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۱/۴) است مشاهده شد و حداقل  $F_{ST}$  (۰/۰۳) بین نمونه‌های مازندران و گیلان که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳/۴۳) بودند، مشاهده گردید. بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های منطقه گیلان و گلستان ۰/۷۱ و ۰/۴۹ بود. براساس نتایج بدست آمده از محاسبه  $F_{ST}$  می‌توان عنوان نمود که ۳ گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه در حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد.

**کلمات کلیدی:** تنوع ژنتیکی، گاو ماهی، *Neogobius gorlap*، الکتروفورز، دریای خزر

\* نویسنده مسئول: Hamze.p12@gmail.com

## مقدمه

امروزه شناسایی گونه‌ها، زیرگونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره‌برداری مناسب موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها یا جمعیت‌های با ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در موجودات می‌شود. تنوع ژنتیکی آبزیان یکی از شاخصهای مهم تعیین شرایط اکولوژیک منابع آبی می‌باشد (Zhou et al., 2003). کاهش تنوع ژنتیکی برای جمعیتها زیان بار بوده و بر میزان برداشت آنها تاثیرگذار می‌باشد. بهره‌برداری از ذخایر گونه‌های مختلف نیاز به شناخت کافی از وضعیت ذخایر گونه‌ها، نژادها و جمعیت‌های متعدد آن دارد تا بتوان مدیریت اصولی بر ذخایر اعمال نمود.

گاو ماهیان خانواده بزرگی از ماهیان استخوانی می‌باشند که بیشتر در آبهای مناطق معتدل و گرمسیری اقیانوس‌ها و اساساً نزدیک سواحل دریاها و بسیاری از مصب‌ها و آبهای شیرین زندگی می‌کنند. مناطق مهم پراکنش آنها دریای خزر، سیاه، مدیترانه، دریاچه اورال و رودخانه‌های حوضه آبریز آنها می‌باشد (عباسی، ۱۳۸۲).

دریای خزر حدود ۳۵ گونه و زیرگونه از خانواده گاو ماهیان را در خود جای داده است (نادری و عبدلی، ۱۳۷۸). گاو ماهیان به رغم تراکم و گسترش وسیعی که در دریای خزر دارند، متأسفانه بعثت صید غیراقتصادی کمتر مورد مطالعات بیولوژیک قرار گرفته‌اند. در هر صورت پراکنش گونه‌های مختلف گاو ماهیان در ماههای مختلف سال از شمال تا جنوب دریای خزر متفاوت است که در این بین دو عامل مهم نوع بستر و کمیت و کیفیت غذا در پراکنش و میزان توده زنده آنها دخیل می‌باشد. بطوریکه در خزر شمالی گونه *Neogobius fluviatilis* و در خزر میانی به جهت تراکم بالای نرم تنان میزان بیوماس و رشد ماهی دم گرد دریای خزر *Neogobius melanostomus* بیشتر از سایر مناطق گزارش شده است (فیلاتووا، ۱۳۷۳).

با توجه به مطالعات انجام شده گاو ماهی سرگنده با نام علمی *Neogobius kessleri gorlap* بعنوان گونه غالب در کرانه جنوبی دریای خزر شناخته شده است (فیلاتووا، ۱۳۷۳). ترکیب غذایی این گونه عمدتاً از گاو ماهیان شنی دریای خزر و تا حدی گاو ماهی *Bentophilus stellatus* و سایر منابع شامل صدف کاردیوم، میگو، کیلکا، خرچنگ پهن و همچنین بچه ماهی کفال بعنوان غذای ثانویه می‌باشد. همچنین تغذیه در رودخانه از ماهیان کوچکتر، سخت‌پوستان و حشرات آبی می‌باشد (نادری و

عبدلی، ۱۳۸۷).

گاو ماهی سرگنده مهاجرت خود را از هفته دوم بهمن ماه شروع نموده و در اواخر اسفند ماه اقدام به تخم‌ریزی در سواحل جنوبی دریای خزر می‌نماید. زمان تخم‌ریزی آنها پس از آمادگی و تکامل گنادها تحت اثر عوامل مختلف محیطی (غذا، درجه حرارت، استرس، و...) قرار دارد. در صورت فراهم شدن کلیه عوامل درونی و محیطی مناسب عملیات تخم‌ریزی در حضور فرد نر از اواخر زمستان آغاز می‌گردد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۱). بدین ترتیب گاو ماهیان بیشتر در بهار برای تخم‌ریزی و تغذیه به سواحل دریا مهاجرت می‌نمایند که زمان مهاجرت آنها تحت تاثیر درجه حرارت آب می‌باشد. گاو ماهیان مناطق جنوبی دریای خزر نسبت به مناطق مرکزی زودتر مهاجرت خود را آغاز می‌کنند بطوریکه گونه‌های *N. syman* و *N. kessleri* نسبت به سایر گونه‌ها زودتر مهاجرت نموده و بعد از تخم‌ریزی به مناطق عمیق مهاجرت می‌نمایند (فیلاتووا، ۳۷۳).

گاو ماهیان دریای خزر به جهت تغذیه از بی‌مهرگان کفزی و سایر ماهیان کوچک از رقبای غذایی سایر ماهیان دریای خزر محسوب می‌گردند اما با این وجود خود آنها نیز مورد تغذیه سایر ماهیان با ارزش شیلاتی از جمله تاسماهیان، شگ ماهیان، ماش ماهی، ماهی اسبله، سوف و تنها پستاندار دریای خزر، فک دریای خزر *Pusa caspica* قرار می‌گیرند (بریمانی، ۱۳۵۶). از طرفی اعتقاد بر این است که نزدیک به ۴۰ درصد از غذای فک دریای خزر و در نواحی جنوب شرقی دریای خزر بیشتر از ۵۰ درصد جیره غذایی فیل ماهی را گاو ماهیان تشکیل می‌دهند (فیلاتووا، ۱۳۷۳). طبق بررسی‌های محققین روسی گوشت گاو ماهیان نه تنها از مزه و کیفیت بالایی برخوردار است بلکه پارهای از گونه‌ها اهمیت صنعتی داشته و در تغذیه دام و تهیه کنسانتره هم مورد استفاده قرار می‌گیرد (فیلاتووا، ۱۳۷۳).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای درخصوص تنوع ژنتیکی گاو ماهی سرگنده صورت نگرفته است. Vyskocilova و همکاران در سال ۲۰۰۷ تنوع ژنتیکی *Neogobius kessleri* را در مناطق بالا و میانی رودخانه دنوب را با استفاده از ۱۲ نشانگر میکروستلایت مطالعه نمودند. همچنین Dougherty و همکاران در سال ۱۹۹۶ با استفاده از آنالیز mtDNA جمعیت *N. melanostomus* را در دریاچه Lauretian مورد بررسی قرار دادند.

Adams و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش ریزماهوره ساختار جمعیتی قزل‌آلای رودخانه‌ای *Salvalimus*

و بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده توسط دستگاه بیوفتومتر (مدل اپندورف) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت.

برای انجام واکنش PCR از ۶ جفت پرایمر ریزماهواره استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۲/۵ میکرومول، ۲۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۵ میکرو لیتر برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر (مدل Auto-Q شرکت Quanta biotech) بترتیب: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) ۵۸-۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله سوم بسط پرایمر (Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه تنظیم گردید.

(fontinallis) دریاچه‌های حوضه آبریز خلیج هند را مورد بررسی قرار دادند.

با توجه به اینکه تاکنون مطالعاتی در مورد تنوع ژنتیکی و بررسی جمعیت‌های احتمالی گاو ماهی سرگنده صورت نگرفته است، این بررسی با هدف شناسایی جمعیت‌های این گونه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در حوضه جنوبی دریای خزر انجام شده است.

### مواد و روش کار

نمونه‌برداری از گاو ماهی سرگنده از دریا با روش صید پره از سواحل استان گیلان (۵۲ نمونه)، سواحل استان مازندران (۵۳ نمونه) و سواحل استان گلستان (۲۸ نمونه) صورت گرفته است. از هر نمونه مقدار ۱ تا ۲ گرم بافت باله جمع‌آوری و در اتانول ۹۵ درصد نگهداری و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید.

استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل-کلروفرم با استفاده از باله ماهی انجام شد (Fevolden & Pogson, 1997)

جدول ۱: توالی و مشخصات پرایمرهای ریزماهواره مورد استفاده برای گاو ماهی سرگنده (Vyskocilova, 2007)

جایگاه	توالی پرایمر	محل تکرار	دمای اتصال	محدوده آلی (bp)
NG111	F: GTGTGGATCGGTGCCTAACT R: ACTCGGCTTTCTCTGCTCTG	(GA)8GG(GA)3GG (GA)2GG(GA)5	۵۱	۱۶۸-۱۹۶
NG115	F: CACTTCCCTGTGGTGTGATG R: CCTTGTCTGTCTCCAAGTGC	(AG)4TCTGC(GT)5 N58(GT)9	۵۸	۱۸۸-۲۲۰
NG70	F: CGATTCTGTACGGTGTAT R: CACAACAAGCCATGTCCAAA	(TG)12	۵۷	۱۴۰-۱۹۲
NG71	F: GAAGCCATTCTGCCTTTCTG R: GTGTCGCATGAGTTGAATGG	(GC)4TCTGC (CT)24GC(CT)4	۵۵	۲۷۶-۲۰۴
NG92	F: AAGCAACTCACGCCAAAGTC R: AGTGCTGCCATGTCAATCTG	(CA)8(CGCA)6 (CG)2(CGCA)5	۵۰	۲۶۴-۲۰۴
NG215	F: GCACAATGCCACACTTTAGG R: CGGTAACACACTCTGGCTCA	(TC)14(GT)21	۵۷	۱۵۶-۲۴۴

میانگین فراوانی آللهای بترتیب در منطقه گیلان  $0.013 \pm 0.002$ ، مازندران  $0.044 \pm 0.002$  و گلستان  $0.054 \pm 0.002$  می‌باشد. جدول ۳ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد آللهای واقعی و آللهای موثر در منطقه مازندران بترتیب ۱۹ و  $14/74$  و کمترین آن ۵ و  $2/26$  در گیلان بود. همانگونه که جدول دیده می‌شود در تمامی مناطق نمونه‌برداری و برای تمام جایگاهها مقدار Ne از Na کمتر می‌باشد.

دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه‌برداری در جایگاههای شش‌گانه بین  $0/23$  تا  $0/93$  بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه NG111 و در نمونه‌های منطقه گلستان و کمترین مقدار در جایگاه NG71 در نمونه‌های منطقه گیلان می‌باشد (جدول ۳).

دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار در مناطق نمونه‌برداری بین  $0/56$  تا  $0/93$  بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار مربوط به جایگاه NG111 در مازندران و کمترین مقدار آن مربوط به جایگاه NG71 در نمونه‌های منطقه گیلان مشاهده شده است.

محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در مناطق نمونه‌برداری و در تمام جایگاهها به استثنای منطقه گلستان در جایگاههای NG70 و NG111، افزایش هتروزیگوسیتی یا عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر He نسبت به Ho وجود دارد.

براساس نتایج آزمون کای (جدول ۴) در هر سه منطقه گیلان، مازندران و گلستان و جایگاههای مختلف ریزماهواره بجز جایگاههای NG70 و NG111 در منطقه گلستان انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شده است ( $P < 0.05$ ).

محصول PCR (۸-۷ میکرولیتر) با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر DNA ۵۰ bp، مشاهده گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و آللهای موثر برای هر جایگاه، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei, 1978, 1972)، تعادل هاردی-واینبرگ، مقادیر  $R_{st}$  و  $F_{st}$  جریان ژنی و تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم افزار GenAlEx Ver. 6 (Peakall & Smouse, 2005) محاسبه گردید.

## نتایج

در این بررسی ۱۳۳ نمونه باله گاو ماهی سرگنده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. غلظت DNA در کلیه نمونه‌ها جهت انجام واکنش PCR مناسب بود (۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم) و با توجه به نتایج الکتروفورز ژل آگارز از کیفیت مناسبی برخوردار بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در هر ۶ جایگاه در نمونه‌های مورد بررسی حالت پلی‌مورف نشان دادند (شکل‌های ۲ و ۳).

براساس نتایج حاصله حداکثر تعداد آللهای در سه منطقه نمونه‌برداری در جایگاه NG215 با ۲۲ آلل و حداقل آن در جایگاههای NG71 و NG92 با ۹ آلل دیده شد.

حداکثر فراوانی آللی در منطقه گیلان  $0/61$  مربوط به جایگاه NG71 و حداقل آن  $0/01$  در جایگاههای NG70، NG71، NG111 و NG215 در گیلان بوده است (جدول ۲). همچنین

جدول ۲: فراوانی آللهای در جایگاههای مورد بررسی و در مناطق مختلف نمونه‌برداری

جایگاه	حداکثر		حداقل	
	گیلان	مازندران	گیلان	مازندران
NG70	۰/۲۴	۰/۲۰	۰/۰۱	۰/۰۱
NG71	۰/۶۱	۰/۵۱	۰/۰۱	۰/۰۳
NG92	۰/۴۷	۰/۳۸	۰/۰۳	۰/۰۱
NG111	۰/۲۴	۰/۱۵	۰/۰۱	۰/۰۱
NG115	۰/۲۵	۰/۱۸	۰/۰۲	۰/۰۲
NG215	۰/۱۸	۰/۱۳	۰/۰۱	۰/۰۱

جدول ۳: مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، آللهای واقعی (Na) و موثر (Ne) در ۶ جایگاه ریزماهواره پلی مورفیک در مناطق مختلف نمونه برداری گاو ماهی سرگنده

منطقه جایگاه	گیلان				مازندران				گلستان			
	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne
NG70	۰/۵۵	۰/۸۴	۱۰	۶/۳۵	۰/۷۹	۰/۸۹	۱۴	۸/۷۴	۰/۸۹	۰/۸۸	۱۲	۸/۴۸
NG71	۰/۲۳	۰/۵۶	۵	۲/۲۶	۰/۴۰	۰/۶۸	۷	۳/۱۱	۰/۸۶	۰/۷۶	۱۲	۴/۱۸
NG92	۰/۰۷	۰/۶۶	۵	۲/۹۷	۰/۵۶	۰/۸۰	۱۲	۵/۰۶	۰/۵۰	۰/۷۴	۱۲	۳/۸۵
NG111	۰/۶۷	۰/۸۴	۹	۶/۲۸	۰/۴۲	۰/۹۰	۱۷	۱۰/۵۴	۰/۹۳	۰/۸۹	۱۲	۹/۰۶
NG115	۰/۷۹	۰/۸۲	۹	۵/۷۲	۰/۶۵	۰/۸۹	۱۴	۷/۷۹	۰/۶۹	۰/۸۷	۱۲	۷/۹۶
NG215	۰/۸۹	۰/۹۱	۱۸	۱۰/۹۷	۰/۷۷	۰/۹۳	۱۹	۱۴/۷۴	۰/۸۹	۰/۹۱	۱۲	۱۱/۰۴

جدول ۴: نتایج آزمون کای (χ<sup>2</sup>) برای تعادل هاردی-واینبرگ برای جایگاههای ریزماهواره ای پلی مورفیک در مناطق نمونه برداری شده از گاو ماهی سرگنده

منطقه	عوامل تعادل χ <sup>2</sup>						
	NG215	NG115	NG111	NG92	NG71	NG70	
گیلان	درجه آزادی	۱۵۳	۳۶	۳۶	۱۰	۱۰	۴۵
	آزمون مربع کای	۲۴۳/۶۲	۱۳۰/۸۹	۱۳۹/۷۳	۱۳۱/۵۶	۴۶/۴۰	۱۳۴/۷۹
	احتمال	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	معنی دار بودن	***	***	***	***	***	***
مازندران	درجه آزادی	۱۷۱	۹۱	۱۳۶	۶۶	۲۱	۹۱
	آزمون مربع کای	۳۱۸/۶۵	۱۸۴/۸۴	۳۸۹/۶۹	۲۰۱/۵۰	۷۵/۱۳	۲۸۴/۸۳
	احتمال	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	معنی دار بودن	۱۳۸/۲۹	***	***	***	***	***
گلستان	درجه آزادی	۱۰۵	۷۸	۱۰۵	۱۰	۲۱	۶۶
	آزمون مربع کای	۱۳۸/۲۹	۱۲۲/۲۳	۱۲۸/۵۵	۶۷/۷۵	۲۹/۴۹	۱۵۲/۲۹
	احتمال	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۶	۰/۰۰	۰/۱۰	۰/۰۰
	معنی دار بودن	*	**	ns	***	ns	***

مازندران و گلستان بترتیب ۰/۱۴ و ۰/۵۴، بین گیلان و مازندران ۰/۲۰ و ۰/۹۹ و بین گیلان و گلستان، ۰/۲۱ و ۰/۹۵ محاسبه گردیده است. جدول ۵ میزان  $F_{ST}$  که براساس فراوانی و آزمون AMOVA محاسبه گردیده است را نشان می دهد.

در بررسی حاضر بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه NG215 در نمونه‌های مازندران (۲/۸۱) و کمترین مقدار آن (۱/۰۴) در جایگاه NG71 در نمونه‌های گیلان مشاهده شد. همچنین میزان  $R_{ST}$  و جریان ژنی (Nm) بین دو منطقه

جدول ۵: مقدار  $F_{ST}$  محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه‌برداری گاو ماهی سرگنده (اعداد بالا  $F_{ST}$  براساس فراوانی، اعداد پائین  $F_{ST}$  براساس آزمون AMOVA)

مناطق	گلستان	مازندران	گیلان
گلستان	۰/۰۰۰	۰/۰۳۴*	۰/۰۶۱*
مازندران	۰/۰۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۳۰*
گیلان	۰/۰۹۹	۰/۰۴۸	۰/۰۰۰

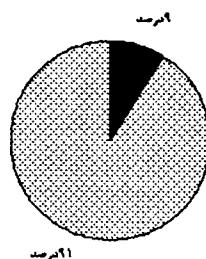
\* اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۱ درصد ( $P < 0.01$ ) معنی‌دار است.

بیشترین شباهت بین نمونه‌های مازندران و گلستان بوده است. نمودار ۱ تنوع ژنتیکی در درون و بین مناطق نمونه‌برداری گاو ماهی سرگنده را نشان می‌دهد.

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei 1972) انجام شد (جدول ۶). محاسبات انجام شده نشان داد که بیشترین فاصله بین نمونه‌های گیلان و مازندران و

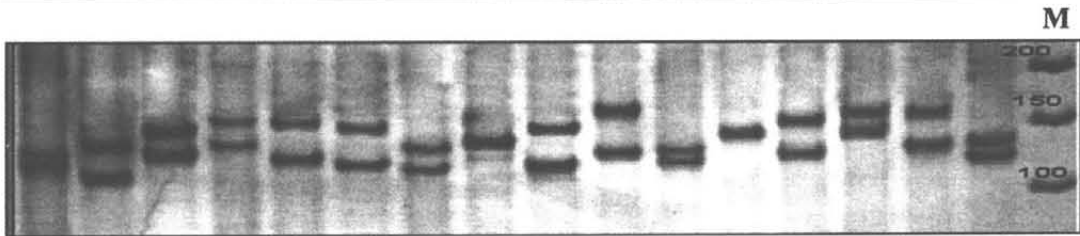
جدول ۶: فواصل و شباهت ژنتیکی بین مناطق مختلف نمونه‌برداری گاو ماهی سرگنده (اعداد بالا فاصله ژنتیکی و اعداد پائین شباهت ژنتیکی)

مناطق	گلستان	مازندران	گیلان
گلستان	۰/۰۰	۰/۴۹	۰/۷۱
مازندران	۰/۶۳	۰/۰۰	۰/۷۵
گیلان	۰/۴۹	۰/۲۸	۰/۰۰

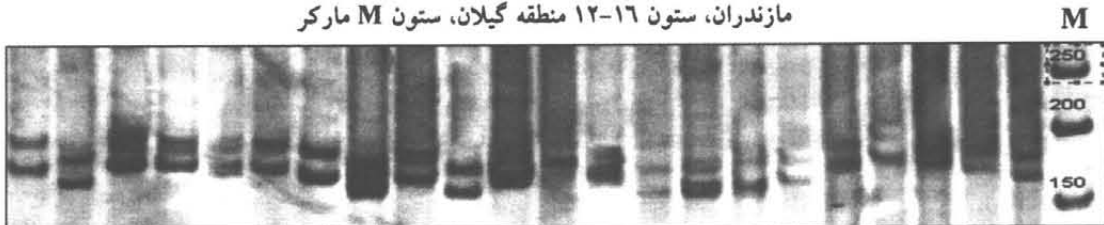


■ اختلاف بین مناطق مختلف □ اختلاف افراد در داخل هر منطقه

نمودار ۱: تنوع ژنتیکی بین نواحی و افراد هر منطقه در ۶ جایگاه ریزماهواره پلی مورفیک در گاو ماهی سرگنده



شکل ۲: جایگاههای ریز ماهواره‌ای در گاو ماهی سر گنده با استفاده از پرایمر NG71، ستون ۶-۱ منطقه گلستان، ستون ۱۱-۷ منطقه مازندران، ستون ۱۶-۱۲ منطقه گیلان، ستون M مارکر



شکل ۳: جایگاههای ریز ماهواره‌ای در گاو ماهی سر گنده با استفاده از پرایمر NG215، ستون ۸-۱ منطقه گلستان، ستون ۱۸-۹ منطقه مازندران، ستون ۲۲-۱۹ منطقه گیلان، ستون M مارکر

## بحث

میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سه منطقه نمونه‌برداری ۰/۶۶ و هتروزیگوسیتی قابل انتظار در کل مناطق ۰/۸۲ بدست آمد که بالا بودن دامنه هتروزیگوسیتی در گاو ماهی سرگنده دریای خزر بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی آن در مناطق مختلف نمونه‌برداری می‌باشد.

Vyskocilova و همکاران در سال ۲۰۰۷ تنوع ژنتیکی *Neogobios kessleri* را در مناطق بالا و میانی رودخانه دانوب را با استفاده از ۱۲ نشانگر ریز ماهواره مطالعه نمودند. تعداد آللهای در ۳۳۲ نمونه ماهی ۲ تا ۴ و هتروزیگوسیتی بین ۰/۱۳ تا ۰/۷۵ بود. مشاهده می‌گردد که مقدار هتروزیگوسیتی تقریباً مشابه با مطالعه حاضر می‌باشد. همچنین در مطالعات دیگر مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار در ماهی *N. melanostomus* بترتیب ۰/۱۳ تا ۰/۵۲ و ۰/۱۵ تا ۰/۵۰ بود.

مطالعه تنوع زیستی در جوامع، مشخص‌کننده وسعت تنوع ژنی آن جامعه می‌باشد. راههای مختلفی برای این مطالعه وجود دارد که ساده‌ترین آن اندازه‌گیری فراوانی آللهای یا ژنوتیپ‌ها می‌باشد. فراوانی هتروزیگوت‌ها از این جهت اهمیت دارد که هر هتروزیگوت ناقل آللهای متفاوتی است که این نشاندهنده وجود تنوع می‌باشد. به همین دلیل معمول‌ترین معیار تنوع ژنی در یک جمعیت میزان هتروزیگوسیتی می‌باشد (Brightte et al., 2005). هتروزیگوسیتی بیانگر طیف وسیعی از ژنوتیپ بعنوان پاسخ به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Beardmore et al., 1997). در این بررسی هر سه منطقه نمونه‌برداری شده و در تمام جایگاهها بغیر از جایگاه NG70 و NG71 در سواحل گلستان،

حالت پلی مورفیسم در ژنوم هسته موجودات بعنوان شاخص ژنتیکی ارزشمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی بمنظور محافظت از ذخایر ژنی گونه‌ها محسوب می‌شود. مدیریت ذخایر در صورتیکه بر پایه اطلاعات دقیق از قبیل مطالعات مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai et al., 2006). ریز ماهواره‌ها شاخص حساسی در اندازه‌گیری هموزایگوسیتی در جفتگیری‌های همخون هستند. بنابراین برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب می‌باشند (Alarcon et al., 2004).

در این بررسی تنوع ژنتیکی گاو ماهی سرگنده در ۶ جایگاه ریز ماهواره‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، میانگین بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های سواحل مازندران با ۱۳/۸۳ آلل و میانگین کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های سواحل گیلان با ۵/۷۶ آلل بود. همچنین میانگین بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های مازندران با ۸/۶۶ آلل و میانگین کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های گیلان با ۵/۷۶ آلل بود. همچنین در ۱۳۳ نمونه بررسی شده، میانگین تعداد آللهای مشاهده شده ۱۱/۴۴ و میانگین تعداد آللهای موثر ۷/۲۸ می‌باشد.

قابل ذکر است که آللهای مشاهده شده در هر جایگاه ژنی به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه بود و به همین جهت این امکان وجود دارد که در آزمایشات گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت تعداد آللهای واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین بدست آید (Peakal & Smous, 2005).

(Macconachi, 2004).

$F_{ST}$  و  $R_{ST}$  بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییرپذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Skaala et al., 2005).

در تفسیر مقدار  $F_{ST}$  می‌توان گفت که تمایز ژنتیکی بین سواحل گیلان و گلستان در حد متوسط و بین سایر مناطق نمونه‌برداری شده در حد پائین می‌باشد (Smith & Mereagh, 2005).

در این بررسی با توجه به نتایج حاصله (جدول ۵) و اختلاف معنی‌دار میزان  $F_{ST}$  بین مناطق مختلف نمونه‌برداری می‌توان عنوان نمود که ۳ گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه در حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد. این تفاوت بین ۳ گروه می‌تواند بخاطر اختلاف در نوع بستر، شیب بستر، وسعت عمق کم در نواحی مختلف، شوری و برخی پارامترهایی مانند pH باشد. همچنین نوع تغذیه (تنوع ماکروبتوزها در غرب و شرق حوضه جنوبی با هم متفاوت می‌باشد) و تقابل بین گونه‌ای در این تنوع موثر است. علاوه بر این گاو ماهیان غذای اصلی ماهیان خاویاری بوده و موضوع صید و شکار و سایر کنشهای بین گونه‌ای تفاوت در سازگاری زیستگاهها را می‌تواند بوجود آورد. در غرب و شرق حوضه جنوبی دریای خزر، خلیج گرگان و تالاب انزلی بعنوان دو زیستگاه بزرگ با مواد غنی بالا وجود دارد که این ویژگی در مناطق مرکزی کمتر دیده می‌شود. این شرایط زیست محیطی می‌تواند باعث تغییراتی در ساختار گاو ماهیان گردد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه مسئولین و همکاران در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری بخصوص سرکار خانم نیرانی و آقایان طالبیان و باقرزاده تشکر و قدردانی می‌نمایم.

## منابع

- بریمانی، ا.، ۱۳۵۶. ماهی شناسی و شیلات. جلد دوم، دانشگاه تهران. صفحات ۲۸۴ تا ۲۸۵.
- فیلاتووا، م.، ۱۳۷۳. جانوران و تولیدات زیستی دریای خزر. ترجمه: ابوالقاسم شریعتی. شرکت سهامی شیلات ایران. ۱۷۱ صفحه.
- عباسی، ک.، ۱۳۸۲. گاو ماهیان دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۲ صفحه.
- نادری، م. و عبدلی، ا.، ۱۳۷۸. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. ۲۲۳ صفحه.
- وثوقی، غ. و مستجیر، ب.، ۱۳۷۱. ماهیان آب شیرین. دانشگاه تهران. صفحات ۲۹۶ تا ۲۸۵.

هتروزگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزگوسیتی قابل انتظار کمتر بود. کاهش هتروزگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزگوسیتی قابل انتظار نشاندهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌هاست. علت این کاهش تنگناهای ژنتیکی می‌باشد که احتمالاً بر اثر شرایط زیست محیطی، تخریب زیستگاههای طبیعی، آمیزش‌های خویشاوندی بوجود می‌آید و در نتیجه با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزگوسیتی در ذخائر می‌شود (Norris et al., 1999).

بیشترین مقدار هتروزگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های سواحل گلستان دیده شده که نشانه بالا بودن تنوع در این ناحیه نسبت به جمعیت‌های ناحیه دیگر است.

نتایج مطالعه حاضر نیز انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق گلستان، گیلان و مازندران در تمامی جایگاههای مورد بررسی باستانهای جایگاه NG71 و NG111 در منطقه گلستان، را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) نیز انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به وجود آلهای صفر و تلاقی خویشاوندی نسبت دادند.

Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ ضمن بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هوموزیگوسیتی، آلهای نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیرکافی بودن نمونه‌ها می‌داند. همچنین Kitanishii و همکاران در سال ۲۰۰۸ انحراف از تعادل مشاهده شده در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* را به خطای نمونه‌برداری نسبت دادند.

فاکتور  $F_{ST}$  بیان کننده توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می‌باشد و بیانگر آن است که هرچه میزان جریان ژنی بین مناطق بیشتر باشد، اختلاف ژنتیکی کمتر است (اریک، ۱۳۸۴). در این بررسی بیشترین مقدار  $F_{ST}$  بین دو منطقه گلستان و گیلان (۰/۰۶) بود. همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق گیلان و گلستان (۰/۷۱) محاسبه گردیده است. مقدار  $F_{ST}$  بین صفر تا ۰/۰۵ نشاندهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا است و مقدار بیش از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می‌دهد (Jaime et al., 2005). در این مطالعه میزان تمایز بین جمعیت‌های بررسی شده در محدوده تمایز ژنتیکی متوسط قرار دارد.

میزان جریان ژنی در مناطق مختلف بین ۰/۰۹ تا ۱/۵۴ متغیر بود که بیانگر عدم انجام مهاجرت‌های زیاد می‌باشد. از آنجاییکه پدید آمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت‌های جدا یا نسبتاً جدا از یکدیگر می‌باشد، بنابراین بطور قطع می‌توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه‌زایی ارتباط برقرار نمود (Beacham &



- Adams B.K. and Hutchings A., 2003.** Micro geographic population structure of brook char: A comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62:517-533.
- Alarcon J.A., Magoulas A. and Alvarez M.C., 2004.** Genetic comparison of wild and cultivate European population of the gill head sea bream. *Aquaculture*, 230:65-80.
- Beacham T.D. and Macconachi C., 2004.** Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. *Journal of Fish Biology*, 61:1021-1032.
- Beardmore J.A., Mair G.C. and Lewis R.I., 1997.** Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture*, 28:829-839.
- Brightite J., Hansen M. and Loeschcker V., 2005.** Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: Insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. *Biology Journal of Linnaean Society*, 84:1-11.
- Dougherty J.D., Moore W.S. and Ram J. L., 1996.** Mitochondrial DNA analysis of round goby (*Neogobius melanostomus*) and tubenose goby (*Proterorhinus marmoratus*) in the Great Lakes basin. *Journal of Fish Aquaculture*, 53:474-480.
- Dahle G., Jorstad K.E., Rusaas H.E. and Ottera H., 2006.** Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morpha*) populations. *ICES Journal of Marine Science*, 63:209-215.
- Fevolden S.E. and Pogson G.H., 1997.** Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian coastal and north-east Arctic population of Atlantic Cod. *Journal of Fish Biology*, 51:895-908.
- Jaime C., Ania P., Miguel H. and Carmen B., 2005.** A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture*, 261:1194-1203.
- Kitanishi S., Yamamoto T. and Higashi S., 2008.** Microsatellite variation reveals fine-scale genetic structure of masu salmon, *Oncorhynchus masou*, within the Atsuta River. *Ecology of Freshwater Fish*, 32:1-7.
- Nei M., 1972.** Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- Nei M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. *American Naturalist*, 89:583-590.
- Norris A.T., Bradley D.G. and Cunningham E.D., 1999.** Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon populations. Department of Genetics, Trinity College Dublin, Ireland. pp.247-264.
- Peakall M. and Smouse A., 2005.** Gene Alex 6: Genetic analysis in Excel .Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia.
- Skaala Q., Hoyheim B., Glover K. and Dahlea G., 2005.** Microsatellite analysis in domesticated and Wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240:131-143.
- Smith P. and Mereagh M., 2005.** Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean. *Journal of Fish Biology*, 57:72-83.
- Thai B.T., Pham T.A. and Austin G.M., 2006.** Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*, 258:228-240.
- Vyskocilova M., Ondrackova M. and Sinkova A., 2007.** Isolation and characterization of microsatellites in *Neogobius kessleri* (Perciformes, Gobiidae) and cross-species amplification within the family Gobiidae. *Molecular Ecology Notes*, 7:701-704.
- Zhou J.F., Wu Q.J., Ye Y.Z. and Tong J.G., 2003.** Genetic divergence between *Cyprinus carpio* and *Cyprinus carpio haematopterus* as assessed by mitochondrial DNA analysis, with emphasis on origin of European domestic carp. *Genetica*, 119:93-97.

## Investigation of genetic population of *Neogobius gorlap* in southern Caspian Sea using microsatellite markers

Pourgholam H.<sup>(1)\*</sup>; Zamini A.A.<sup>(2)</sup>; Laloei F.<sup>(3)</sup>; Khara H.<sup>(4)</sup>; Naderi M.<sup>(5)</sup> and Taghavi M.J.<sup>(6)</sup>

1,2 & 4- Natural Resource Faculty of Islamic Azad University, Lahijan Branch,  
P.O.Box: 1616 Lahijan, Iran

3,5 & 6- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

Received: July 2009

Accepted: January 2010

**Keywords:** Genetic variation, Electrophoresis, Caspian Sea, Iran

### *Abstract*

Genetic diversity of *Neogobios gorlap* population was examined on 133 samples from regions in southern parts of the Caspian Sea (Golestan 28 samples, Mazandaran 53 samples and Guilan 52 samples). Genomic DNA was extracted from fin tissue by phenol-chlorophorm method. PCR was performed using 6 microsatellite primers. The PCR products of samples were accompanied with standard marker (50 bp ladder). To measure fragment size, samples were run on a 6% polyacrylamid gel. Allele count and frequency, the effective and real allele, expected heterozygosity and observed heterozygosity, genetic diversity; Shannon Information Index, genetic identity and genetic distance,  $F_{st}$ ,  $R_{st}$ , gene flow and Hardy-Weinberg Equilibrium based on Analysis of Molecular Variance (AMOVA) were calculated using the Gene Alex software.

All studied loci were polymorph. The mean observed and effective allele number was 11.44 and 7.28 respectively. Also, the maximum observed and expected heterozygosity was 0.964 and 0.932 respectively. Specimens from all regions (with the exception of locus NG71 and NG111 in Golestan region) were not in Hardy-Weinberg Equilibrium in all of the loci ( $P < 0.05$ ).

The maximum  $F_{st}$  (0.06) was observed between Golestan and Guilan regions ( $N_m = 1.40$ ). The minimum  $F_{st}$  (0.03) was observed between Mazandaran and Guilan ( $N_m = 3.43$ ). The highest genetic distance (0.71) and the lowest genetic distance (0.49) was observed between specimens from Guilan and Golestan regions. Based on  $F_{st}$  results, we found that there is a significant genetic divergence between some samples. Therefore, we suggest three genetic groups of *Neogobios gorlap* for the southern part of the Caspian Sea.

\* Corresponding author: Hamze.p12@gmail.com