

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان:

**تعیین نوع ژنتیکی سه ذخیره مختلف مولد ماهی باس دریایی آسیایی
(*Lates calcalifer*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره
نشاندار شده با فلورسنس در ایستگاه تحقیقاتی
ماهیان دریایی بندر امام خمینی**

مجری:

سمیرا ناظم رعایا

شماره ثبت

۶۷۱۹۶

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور

عنوان طرح/پروژه: تعیین تنوع ژنتیکی سه ذخیره مختلف مولد ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*) با استفاده از نشانگر ریز ماهواره نشاندار شده با فلورسنس در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی
کد مصوب: ۲-۷۴-۱۲-۰۰۶-۰۰۰۰۴۱

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: سمیرا ناظم‌رعی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: سمیرا ناظم‌رعی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): آیه سادات صدر، محمد یونس‌زاده فشالمی، حسین هوشمند، مینا آهنگرزاده، مجتبی ذبایح نجف‌آبادی، منصور طرفی موزان‌زاده، محمود حافظیه، منصور شریفیان، مریم میربخش، مهدی گلشن، کاوه خسرویانی، بهاره خرمی‌نیا

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): محمدعلی نعمت‌اللهی

محل اجرا: استان خوزستان

تاریخ شروع: ۱۴۰۰/۰۱/۰۱

مدت اجرا: ۲ سال و ۸ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۴

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: تعیین تنوع ژنتیکی سه ذخیره مختلف مولد ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره نشاندار شده با فلورسنس در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی

کد مصوب: ۰۰۰۰۴۱-۰۰۶-۱۲-۷۴-۲

شماره ثبت (فروست): ۶۷۱۹۶ تاریخ: ۱۴۰۴/۰۲/۰۷

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم سمیرا ناظم‌رعایا دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته مهندسی فناوری منابع طبیعی است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فراوری آبزیان در

تاریخ ۱۴۰۴/۰۱/۲۴ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد ☐ پژوهشکده ☒ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور

مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
۱- مقدمه		۳
۱-۱- انواع نشانگرهای ژنتیکی		۴
۱-۱-۱- نشانگرهای ریخت شناختی		۴
۱-۱-۲- نشانگرهای فیزیولوژیک		۵
۱-۱-۳- نشانگرهای سیتوژنتیک		۶
۱-۱-۴- نشانگرهای پروتئینی		۶
۱-۱-۵- نشانگرهای مولکولی		۷
۲-۱- ریزماهورها		۸
۳-۱- فراوانی ریزماهورها در داخل ژنوم		۹
۴-۱- کاربرد نشانگرهای ریزماهور		۱۰
۵-۱- نقشه‌یابی ژنومی		۱۰
۶-۱- انتخاب به کمک نشانگر (MAS)		۱۱
۷-۱- تعیین میزان همخونی		۱۲
۸-۱- انواع ریزماهورها		۱۲
۹-۱- تشخیص آلل‌های ریزماهوری		۱۳
۱۰-۱- چندشکلی ریزماهورها		۱۴
۱۱-۱- مزایای ریزماهورها		۱۵
۱۲-۱- معایب ریزماهورها		۱۶
۱-۱۲-۱- انتخاب مدل جهش مناسب		۱۶
۲-۱۲-۱- اشتباهات آلل خوانی		۱۶
۳-۱۲-۱- آلل‌های صفر		۱۷
۴-۱۲-۱- اندازه نمونه مورد نیاز		۱۸
۱۳-۱- آماره‌های مورد استفاده		۲۰
۱-۱۳-۱- تعادل هاردي-واینبرگ		۲۰
۲-۱۳-۱- هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی		۲۱
۳-۱۳-۱- معیارهای چندشکلی		۲۲
۴-۱۳-۱- محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)		۲۲
۵-۱۳-۱- فاصله ژنتیکی		۲۳

۲۳	۱-۱۳-۶-فاصله ژنتیکی D_A
۲۴	۱-۲. اهداف پروژه
۲۵	۱-۳- فرضیه ها
۲۶	۱-۴- پرسش های تحقیق
۲۶	۱-۵- مروری بر منابع
۲۶	۱-۵-۱-سوابق تحقیق در داخل کشور
۲۸	۱-۵-۲-سوابق تحقیق در خارج از کشور در ماهی باس دریایی آسیایی
۳۱	۲- مواد و روش ها
۳۱	۲-۱- بررسی ذخایر موجود
۳۲	۲-۲- نمونه برداری برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی
۳۳	۲-۳- استخراج DNA
۳۳	۲-۴- بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلیمرز و پروفایل حرارتی آن
۳۶	۲-۵- روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها
۳۸	۳- نتایج
۳۸	۳-۱- کیفیت و کمیت DNA استخراج شده
۳۸	۳-۲- مشاهده باندهای حاصل از PCR مرحله اول روی ژل آگارز
۴۱	۳-۳- نتایج حاصل از خوانش قطعات ریزماهواره
۴۲	۳-۴- تنوع آللی
۴۲	۳-۴-۱- فراوانی آللی و آلل های منحصر به فرد
۴۵	۳-۴-۲- شاخص های چند شکلی آللی
۵۴	۳-۴-۳- محتوی چند شکلی نشانگرها
۵۵	۳-۴-۴- تجزیه و تحلیل خوشه ای PCoA نمونه های مورد بررسی
۵۵	۳-۴-۵- ساختار ژنتیکی جمعیت ها
۵۹	۴- بحث و نتیجه گیری
۷۰	پیشنهادها
۷۲	منابع
۷۸	چکیده انگلیسی

چکیده

هدف این مطالعه تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت و بررسی تنوع و تمایز ژنتیکی و مولدین باس دریایی آسیایی (Lates calcarifer) (سه ذخیره وارد شده به ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی در سه سال مختلف به نام ۹۶، ۹۸ و ۹۹ در این تحقیق)، در ۱۲ جایگاه ژنی ریزماهواره بود. نشانگرهای ریزماهواره با فلورسنس نشاندار شدند و قطعات دی ان ای با دستگاه خودکار تجزیه و تحلیل بر پایه الکتروفورز موئن با دقت بالا تجزیه تحلیل شدند. نتایج بیانگر آن بود که همه نشانگرها در همه جمعیت ها چندشکل هستند میانگین آللی مقدار ۱۸/۵ آلل به ازای هر جایگاه در کل ذخایر (مجموع سه جمعیت ۹۶، ۹۸ و ۹۹) به دست آمد. نزدیک به نیمی (۴۹٪) از ۶۵ آلل های منحصر به فرد در جمعیت ۹۹ مشخص شد. همچنین، جایگاه Lca137 به طور انحصاری در ذخیره ۹۹ دو آلل منحصر به فرد داشت. در کل جمعیت ها، میانگین آللی مشاهده شده (Na) و آلل موثر (Ne) و شاخص تنوع شانون (I) به ترتیب $۳۴۱ \pm ۰/۲۵$ و $۴/۲۲۱ \pm ۰/۲۴۴$ و $۰/۰۶۰ \pm ۱/۵۴$ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) در مجموع سه ذخیره $۰/۰۴۰ \pm ۰/۷۳۲$ به دست آمد که با مقدار هتروزیگوسیتی قابل انتظار (He) $(۰/۰۱۶ \pm ۰/۷۳۳)$ همخوانی داشت. به ترتیب، بیشترین تعداد آلل مشاهده شده (Na) $۶۹۹ \pm ۰/۷$ و آلل موثر (Ne) $۴۸۵ \pm ۰/۰۲۱$ و شاخص شانون (I) $۱/۰۸ \pm ۱/۷۲۳$ در ذخیره ۹۹ و کمترین در ذخیره ۹۶ با مقادیر $۵۱۲ \pm ۰/۳۳۳$ ، $۳۷۹ \pm ۰/۳۶۶$ و $۱/۰۹۵ \pm ۱/۳۹۵$ مشاهده شد. در ذخیره ۹۸، مقدار Na و Ne به ترتیب، $۴۱۷ \pm ۰/۹۱۷$ و $۳۱۳ \pm ۰/۹۷۵$ مشخص شد. بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب در ذخیره ۹۸ $(۰/۰۷۵ \pm ۰/۷۸۷)$ و ذخیره ۹۶ $(۰/۰۷۳ \pm ۰/۶۷۵)$ محاسبه شد. مقدار شاخص F که بیانگر همخوانی است در هر سه ذخیره بسیار پایین بود و حتی مقدار آن در ذخیره ۹۸ منفی $(-۰/۰۶۹)$ شد. بیشترین و کمترین فراوانی آللی به ترتیب در ذخیره ۹۹ با تعداد کل ۹۹ آلل و ذخیره ۹۶ با تعداد ۶۴ آلل مشخص شد. جایگاه Lca063 با تعداد ۲۶ آلل چندشکل ترین جایگاه و Lca074 با تعداد ۱۱ آلل کمترین مقدار چندشکلی را از آن خود کرد. برآورد آماره های Wright که شامل F_{IS} ، F_{ST} و F_{IT} و بیانگر ضریب همخوانی درون جمعیتی، ضریب همخوانی در کل جمعیت و ضریب هم نسبی هستند، به ترتیب $۰/۰۰۵$ ، $۰/۰۵۷$ و $۰/۰۴۹$ برآورد شدند. از مون مجذور مربعات مشخص کرد که ذخیره ۹۸ در همه ۱۲ نشانگر در تعادل هاردی-واینبرگ بود (HWE)، درحالیکه ذخیره ۹۶ در یک جایگاه Lca098 و جمعیت ۹۹ در دو جایگاه Lca130 و Lca137 به شکل معنی داری از تعادل هاردی-واینبرگ خارج شدند ($p < ۰/۰۱$). ماتریس فاصله ژنتیکی Nei و فاصله ژنتیکی F_{ST} نشان داد که کمترین فاصله بین ذخایر ۹۶ و ۹۸ و بیشترین فاصله بین دو ذخیره ۹۶ و ۹۹ به دست آمد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) مشخص کرد که تنها واریانس ژنتیکی بین جمعیتی (۳٪) به شدت کمتر از درون جمعیتی است (۹۷٪) است ($p < ۰/۰۱$)، که منجر به تمایز ژنتیکی هرچند اندک اما معنی دار بین جمعیت ها شده است ($F_{ST} = ۰/۰۳۳$). بر اساس تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی، در مدل ترکیبی، حداقل مقدار احتمال برای K عدد دو می باشد، یعنی ذخایر به دو ساختار ژنتیکی مجزا تفکیک می شوند. اولین ساختار، جمعیتی ترکیب از ذخایر ۹۶ و ۹۸ و دومین ساختار جمعیت ذخیره ۹۹ است. هرچند تنوع ژنتیکی در جمعیت ۹۹ بیشتر از

جمعیت (ترکیب ذخایر ۹۸ و ۹۶) دیگر است، اما در کل سطح تنوع ژنتیکی در این مطالعه قابل مقایسه با مطالعات پیشین است و در وضعیت مطلوبی قرار دارد. گفتنی است از این جمعیت‌های موجود در بانک ژن زنده ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی می‌توان به عنوان یک جمعیت پایه پیش‌نیاز یک برنامه اصلاح نژادی به‌گزینی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: نشانگر، ریزماهواره، تنوع ژنتیکی، تمایز ژنتیکی، ساختار جمعیت، تکثیر و پرورش، *Lates calcarifer*