ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) سواحل حوضه جنوبی دریای خزر در استان مازندران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مهرنوش نوروزی[۱] ، علی ناظمی[۲]، فاطمه دانشور*[۱]، محمد هادی سمیعی[۱]

۱. گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن
۲. گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن

چکیده

ماهی کیلکای معمولی، *Clupeonella cultriventris* یکی از ماهیان اقتصادی دریای خزر است که ساختار ژنتیک جمعیت آن در دریای خزر در آبهای مازندران با استفاده از ریزماهواره ها مورد بررسی قرارگرفته است. در کل ۶۰ نمونه ماهی بالغ کیلکای معمولی در دو فصل بهار و تابستان، جمع آوری شدند. از ۸ جفت پرایمر ریزماهواره طراحی شده برای ماهی شاد آمریکایی و ماهی هرینگ اقیانوس آرام ، بر روی DNA ژنومی ماهی کیلکای معمولی استفاده گردید. پنج جفت از پرایمرها چند شکل (پلی مورف) نشان دادند و از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی ماهیان بالغ کیلکای معمولی استفاده شد. میانگین اللی آنها در لوکوس ها ۱۱/۷ (دامنه Na ، ۶ تا ۱۷ الل در جایگاهها) بود. هر دو فصل نمونه برداری اللهای اختصاصی در تمامی لوکوس ها نشان دادند. میانگین هتروزایگوسیتی قابل انتظار و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۶۶ و ۰/۵۴۳ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (*H-W*) بیشتر لوکوس ها خارج از تعادل هاردی-وینبرگ بودند ($P <$ ۰/۰۱). بر اساس تست *AMOVA* میزان F_{ST} بین دو فصل معنی دار بود ($P \leq$ ۰/۰۱). این بررسی، وجود جمعیتهای متمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی در جنوب مرکزی دریای خزر (استان مازندران) در فصل های مختلف را نشان می دهد.

واژگان کلیدی : ماهی کیلکای معمولی، ژنتیک جمعیت، دریای خزر، ریزماهواره، *Clupeonella cultriventris*

۱. مقدمه

کیلکا ماهیان دریای خزر از جنس *Clupeonella* و خانواده شگ ماهیان (Clupeidae) هستند. تمام سواحل دریای خزر، محل زندگی کیلکای معمولی است و به منظور تخم ریزی تمام منطقه وسیع خزر شمالی را پوشش می دهد. کیلکا ماهیان از زئو پلانکتونها تغذیه می کنند و خود نیز غذای گونه های با ارزشی مانند آزاد ماهیان و تاس ماهیان است. این گونه دارای زندگی پلاژیک است و در سطح آب مناطق ساحلی در اعماق کمتر از ۵۰ متر زندگی می کند. به همین علت در جنوب دریای خزر و در قسمت شرق و غرب تراکم بیشتری دارد. دمای تولید مثل ۱۰ تا ۲۰ درجه سانتیگراد است. فصل تولید مثل از خرداد تا مرداد می باشد (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷).

جمعیت ماهیان کیلکا پس از سال ۱۳۷۷، بواسطه عواملی چون ظهور و گسترش شانه داران به عنوان رقبای جدی غذایی، مسمومیت مزمن در اثر آلاینده های نفتی، فنلی و فلزات سنگین و تغییرات دمایی دریای خزر و گسترش صیادی تحت فشار قرار گرفته و کاهش یافته است (غفارزاده و هنربخش، ۱۳۸۶). با توجه به تراکم زیاد این گونه در دریای خزر و همچنین تولید مثل آن در مناطقی از این دریا و عدم وابستگی به رودخانه این گونه در طبقه LC (کمترین نگرانی) قرار دارد. اما باید توجه داشت در صورتی که مدیریت درستی در زمینه بهره برداری صورت نگیرد، جمعیت آن در معرض تهدید قرار خواهد گرفت (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷).

بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت 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 می کند. بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon *et al*., 1996) و اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع دریایی دارد و به عنوان اولین پیشنیاز برای حفظ سازگاری جمعیتها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می گردد (Diz and Presa, 2009). همچنین هر چه دانش ما از جمعیت ها و تنوع درون گونه های گونه بیشتر باشد تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت آمیزتر است. از جمله این مارکرهای مولکولی، که این منظور می توان استفاده نمود، مارکرهای میکروستلایت می باشد که قادر است سطوح بالایی از پلی مورفیسم را نشان دهند (Chistiakov *et al*., 2005). طبیعت چند اللی میکروستلایت ها، توراث همبارز، پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث پذیری موجب شده که میکروستلایت ها کاربری موفقی با تنوع بالا در رشته های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند (Sekar *et al*., 2009).

از مطالعات انجام شده با استفاده از میکروستلایت بر روی شگ ماهیان می توان به Shaw و همکاران (۱۹۹۹) بر روی *Clupea harengus* ، Julian and Barton (۲۰۰۷) بر روی *Alosa sapidissima* ، Gonzalez and Zardoya (۲۰۰۷) بر *Sardine pilchardus* ، Miller و همکاران (۲۰۰۱) روی *Clupea pallasi* اشاره نمود. همچنین به مطالعه مولکولی بر روی این گونه در حوضه جنوبی دریای خزر به لالویی و همکاران (۱۳۸۵) می توان اشاره کرد.

کاهش جمعیتهای گونه کیلکای معمولی در طول دهه اخیر اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را روشن می سازد. از آنجاییکه نگهداری تمامیت ژنتیکی جمعیتهای این ماهی اهمیت اساسی دارد بنابراین شناسایی ساختار جمعیت به طراحی مناسب برنامه های بازسازی ذخایر کمک می کند. در مطالعه حاضر ذخایر گونه کیلکای معمولی با استفاده از جایگاههای میکروستلایتی برای مطالعه ساختار جمعیتهای این ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر در منطقه بابلسر انجام گردید. با این فرضیات که ماهی کیلکای معمولی دارای جمعیت های مختلف در فصول متفاوت است و فراوانی ژنوتیپی و اللی هر یک

از جمعیت ها با یکدیگر متفاوت است، نمونه برداری از دو فصل مختلف در منطقه بابلسر انجام شده تا وجود جمعیتهای احتمالی و تمایز ژنتیکی بین جمعیتها با استفاده از مارکرهای میکروستلایت شناسایی شود و ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت بر ذخایر این گونه در دریای خزر بررسی گردد.

۲. مواد و روش ها

نمونه گیری از منطقه بابلسر (که صید صنعتی کیلکاماهیان در آن انجام می شود) در دو فصل بهار و تابستان و در هر فصل ۳۰ نمونه، از قسمت باله ی دمی انجام گرفت. سپس نمونه ها در الکل ۹۶٪ تثبیت گردید و در نهایت به آزمایشگاه ژنتیک انتقال یافت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد، تا شروع مرحله ی استخراج نگهداری شدند.

استخراج DNA از بافت باله‌ی دمی ماهی کیلکای معمولی 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 روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

برای بررسی ژنتیکی کیلکای معمولی از ۸ جفت پرایمر از ریزماهواره طراحی شده برای جنسهای *Alosa* شامل چهار جفت پرایمر (AsaC051, AsaC059, AsaC249, AsaC334 ؛ Julian and Barton ،۲۰۰۷)، *Clupea* شامل چهار جفت پرایمر (Cpa4 ,Cpa8, Cpa104, Cpa125؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۱) استفاده شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و میزان مواد مصرفی (شرکت سیناژن) در هر واکنش PCR شامل : dNTPs ،۰/۲ میلی مولار ؛ پرایمر ۰/۲ تا ۰/۴ میکرولیتر؛ DNA ، ۲۰۰ نانوگرم؛ ۰/۴ – ۰/۳ واحد از تگ DNA پلی مراز هات استارت (فرمنتاز، آلمان)، PCR بافر هات استارت، x ۱؛ کلرید منیزیم ۴/۵ – ۲/۵ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در pH : ۸/۷ انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره ای پلی مراز به ترتیب مرحله جدا سازی ۹۵ – ۹۴ درجه سانتیگراد از ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۱/۵ تا ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه تا ۲ دقیقه و ۳۵ تا ۳۸ چرخه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ - ۷۰ درجه سانتیگراد ، ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه بهینه سازی گردید. محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت و تصویر ژلها تهیه گردید و با استفاده از نرم افزار uvitec بررسی شد (http://www.labtech-equipment.com/UV/UV.html).

آنالیز آماری شامل فراوانی الی[1] ، تعداد الی (Na) و تعداد اللهای موثر (Ne) در جایگاههای میکروستلایتی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار(He) و مشاهده شده (Ho) ، مقادیر R_{ST} و F_{ST} ، ماتریس شباهت[2] و فاصله ژنتیکی[3] براساس Nei,1972 **و** تعادل هاردی واینبرگ براساس X^2 ، تمایز ژنتیکی بر اساس تست *AMOVA* [4] درسطح احتمال ۰/۰۱ درنرم افزارGeneAlex (Peakall and Smouse,2009) محاسبه گردید.

۳. نتایج

در این مطالعه از ۸ جایگاه مورد بررسی فقط پنج عدد از آنها تکثیر شدند (Cpa4، Cpa8، Cpa104، Cpa125 وAcaC051). در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاهها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد. در این بررسی، میانگین تعداد کل الل واقعی و موثر به ترتیب ۱۱/۷ و ۸/۴ می باشد. دامنه الی از ۸ تا ۲۹ الل بدست آمد. تعداد زیادی الل در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر یافت شد. مجموعا ۲۸ الل اختصاصی یافت شد. نمونه های تابستان و بهار هریک

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

دارای ۱۴ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰/۰۵ بودند که در فصل دیگر نمونه برداری مشاهده نشد. بیشترین الل اختصاصی را لوکوس Cpa104 با تعداد ۱۰ الل اختصاصی (۳ عدد در تابستان به فراوانی ۰/۱۰۰ ، ۰/۱۱۷ ، ۰/۱۳۳ و ۷ عدد در بهار به ترتیب به فراوانی ۰/۰۶۷ ، ۰/۰۸۳ و ۰/۱۰۰ با تکرار) نشان داد. لوکوس Cpa6 با تعداد ۷ الل اختصاصی (۵ عدد در تابستان به فراوانی ۰/۰۶۷ ، ۰/۱۰۰ و ۲ عدد در بهار هر دو به فراوانی به ترتیب به فراوانی ۰/۰۸۳ ، ۰/۱۶۷) نشان داد. لوکوس Cpa125 با تعداد ۵ الل (۲ عدد در تابستان به فراوانی ۰/۰۸۳ ، ۰/۱۱۷ و ۳ عدد در بهار به فراوانی ۰/۰۸۳ ، ۰/۱۰۰ ، ۰/۱۳۳) نشان داد. لوکوس Cpa8 با تعداد ۴ الل اختصاصی (۳ عدد در تابستان هر دو به فراوانی ۰/۰۶۷ ، ۰/۱۰۰ ، ۰/۱۱۷ و یک عدد در بهار به فراوانی ۰/۰۶۷) نشان داد. و لوکوس AsaC051 دو الل اختصاصی (یک عدد در تابستان و یک عدد در بهار به فراوانی ۰/۰۸۳) نشان داد.

در نمونه های تابستان حداکثر فراوانی اللی در لوکوس Cpa6 با فراوانی ۰/۱۶۷ و در الل شماره ۱۷ و در اندازه اللی ۲۸۴ جفت باز دیده شد. در لوکوس Cpa104 مجموعا ۲۹ الل شناسایی شد که ۱۷ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. در لوکوس های Cpa6 در مجوع ۱۸ الل شناسایی شد که ۱۲ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. در لوکوس های Cpa8 در مجوع ۱۴ الل شناسایی شد که ۷ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. و در لوکوس Cpa125 مجموعا ۱۹ الل شناسایی شد که ۱۳ الل آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند. در لوکوس AsaC051 مجموعا ۸ الل شناسایی شد که ۲ الل آن در فراوانی کمتر از ۰/۰۵ بود (جدول ۱).

فراوانی اللی بر اساس فصول نمونه برداری، درهر دو فصل در مجموع تمامی لوکوس ها ۸۶ الل یافت شد. ۳۵ الل در هر دو فصل با فراوانی بیشتر از ۰/۵ یافت شد. در فصل بهار ۳۲ الل و در فصل تابستان ۲۳ الل با فراوانی صفر یافت شد.

در این بررسی دامنه Ho بین دو فصل نمونه برداری در تمامی لوکوس ها ۰/۱۶۷ تا ۰/۹۶۷ و متوسط ۰/۵۴۳ بود که کمترین مقدار ۰/۱۶۷ در جایگاه Cpa104 در نمونه های جمع آوری شده از تابستان و بیشترین مقدار ۰/۹۶۷ در جایگاه Cpa6 مربوط به نمونه های جمع آوری شده از تابستان می باشد. دامنه He نیز بین ۰/۹۲۱-۰/۷۵۷ و متوسط آن ۰/۸۶۲ است که کمترین مقدار در جایگاه Asac051 مربوط به نمونه های تابستان و بیشترین آن در لوکوس Cpa104 در نمونه های بهار می باشد (جدول ۲). در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (*H-W*) همه لوکوس ها خارج از تعادل بودند ($P\leq$۰/۰۰۱). فقط در لوکوس Cpa8 در فصل تابستان انحراف از تعادل دیده نشد (جدول ۱).

میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۳۲ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می باشد (Balloux *et al*., 2002). میزان F_{ST} بر اساس تست *AMOVA* ، ۰/۰۴ (P<۰/۰۱) و میزان جریان ژنی ۵/۹۳ محاسبه شد. اما میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۳۲ و میزان جریان ژنی ۷/۹ بدست آمد. فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (۱۹۷۲)، ۰/۵۶۶ و میزان شباهت ژنتیکی ۰/۵۶۸ بدست آمد.

جدول ۱- مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل های مؤثر (Ne)، اللهای اختصاصی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزایگوسیتی قابل انتظار (He)، ماهی کیلکای معمولی با استفاده از ۵ جفت لوکوس ریزماهواره. تعادل هاردی-وینبرگ با علامت * نشان داده شده است، معنی دار نیست، ns ؛ *** P <۰/۰۰۱ ؛ ** P <۰/۰۱ ؛ * P <۰/۰۵

دمای اتصال(درجه سانتیگراد)			
اندازه باند (جفت باز)	تابستان	بهار	لوکوس
			Cpa104
۵۱/۵	۱۷ (۳)	۱۵ (۷)	(الل اختصاصی)Na
۳۱۲-۳۹۰	۰/۱۶۷***	۰/۲***	Ho
	۰/۹۱۹	۰/۹۲۱	He
			Cpa8
۵۲	۱۲ (۳)	۱۰ (۱)	(الل اختصاصی)Na
۱۰۴-۲۱۶	۰/۹ns	۰/۷*	Ho
	۰/۸۹۳	۰/۸۵۷	He
			Cpa6
۵۲	۱۳ (۵)	۱۲(۲)	(الل اختصاصی)Na
۱۰۴-۲۱۶	۰/۹۶۷*	۰/۸۶۷**	Ho
	۰/۸۹۷	۰/۸۸۱	He
			Cpa125
۵۹	۱۴(۲)	۱۱(۳)	(الل اختصاصی)Na
۲۱۶-۲۸۰	۰/۳۶۷***	۰/۴۶۷***	Ho
	۰/۸۸۶	۰/۸۵۸	He
			AsaC051
۵۴	۷(۱)	۶(۱)	(الل اختصاصی)Na
۱۶۰-۱۸۰	۰/۴۶۷*	۰/۳۳۳***	Ho
	۰/۷۵۷	۰/۷۹۴	He
	۱۴	۱۴	الل اختصاصی کل
کل			میانگین
۱۱/۷(۱)	۱۲/۶(۱/۶)	۱۰/۸(۱/۴)	Na(SE)
۸/۴(۰/۸)	۸/۸(۱/۳)	۷/۹(۱/۲)	Ne (SE)
۰/۵۴۳(۰/۰۹)	۰/۵۷۳ (۰/۱۵۵)	۰/۵۱۳ (۰/۱۲۱)	Ho(SE)
۰/۸۶۶(۰/۰۱)	۰/۸۷۰ (۰/۰۲۹)	۰/۸۶۲ (۰/۰۲۱)	He (SE)

۴. بحث و نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می کند .بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon *et al.*, 1996). در مورد منابع دریایی، تنوع ژنتیکی اهمیتی حیاتی جهت مدیریت و حفاظت از آنها داشته، به عنوان اولین پیش نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت ها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می گردد (Diz and Persa, 2009).

آگاهی از میزان ذخایرتوارثی و تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه ، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است؛ به طوری که بررسی های 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 روش ها ی دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب نموده است (Lin *et al.*,2000).

با وجود اهمیت بالای ماهی کیلکای معمولی متأسفانه تا کنون پرایمر اختصاصی ریزماهواره برای این گونه طراحی نگردیده است. از این رو در این بررسی از ۸ جفت پرایمر ریزماهواره که برای ماهی شاد آمریکایی و ماهی هرینگ اقیانوس آرام طراحی شده بود، بر روی DNA ژنومی ماهی کیلکای معمولی استفاده گردید. اما از کل پرایمرهای مورد استفاده فقط ۵ جفت آن در PCR تکثیر شدند. در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاهها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است. با وجود اینکه ریزماهواره ها را می توان در گونه هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری ریزماهواره هاست که محل باند شدن با پرایمرها می باشد (Cui *et al*., 2005).

مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی دریای خزر بسیار محدود است. لالویی و همکاران (۱۳۸۵) جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP در دو منطقه گیلان و مازندران مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصله و آنالیز آماری داده ها، تفاوت بین هاپلوتیپها معنی دار بود و ساختار ژنتیکی متفاوتی بین دو منطقه نمونه برداری مشاهده گردیده است. در بررسی حاضر، اگرچه جمعیت ها اختلاف معنی داری را در میزان هتروزایگوسیتی و تعداد اللی در هر لوکوس نشان ندادند، اما تفاوت معنی داری در تمایز ژنتیکی نشان دادند.

تعداد اللی و هتروزایگوسیتی از شاخص های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت ها از لحاظ مواجه شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankham, 2008) و ویژگیهایی همچون رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه های طبیعی را تعیین می سازد (Hakansson and Jensen, 2005). نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی نشان می دهد که میانگین تعداد اللی بدست آمده در این بررسی (۱۱/۷±۱/۰۷) کمتر از مقدار اعلام شده (۱۳/±۱۱/۵) برای ماهیان دریایی است (DeWoody and Avis , 2000). کاهش تعداد الل های مشاهده شده در سطح جمعیت می تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind *et al*., 2009). همچنین وجود اللهای زیاد با فراوانی پایین نشان دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon *et al*., 2004). ممکن است علت این امر به تاریخچه دریاچه خزر باز گردد که دخایر بزرگی از این ماهیان در سالیان گذشته در آن زندگی می کرده است، اما امروزه به دلایل مختلفی ذخایر آن به شدت کاهش یافته است (Ivanov *et al*., 2000). کاهش تغییر پذیری ژنتیکی در ذخایر وحشی را به خاطر استرس وارده به جمعیت ناشی از صید بی رویه و زوال تولید مثل در محیط طبیعی و در نتیجه کاهش توان تولید است. کیلکا ماهیان تنها ماهیان دریای خزر هستند که صید صنعتی در مورد آنها اعمال می شود. امروزه آمار و ارقام نشان دهنده کاهش ذخایر این ماهی به دلایل مختلف است. از جمله توزیع غیر اصولی ناوگان صیادی ، صدمه خوردن به جمعیتهای جوان کیلکا، ظهور و گسترش جمعیت شانه داران (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۰؛ غفارزاده و هنربخش۱۳۸۶). از طرفی کاهش تنوع ژنتیکی ، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده (Shen and Gong, 2004) و در صورت تداوم وضع موجود باید شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود.

هترزایگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختارجمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و 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 ماهی کیلکای معمولی نشان می دهد که میانگین هترزایگوسیتی مشاهده شده (۰/۰۱۷±) ۰/۵۴۳ است و کمتر از مقدار اعلام شده (۰/۲۲± ۰/۶۶) برای ماهیان دریایی و مطالعات سایر محققین است (DeWoody and Avis , 2000). در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس ها هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. البته این احتمال وجود دارد که از افراد خویشاوند در یک محل، نمونه برداری شده است. اما به طور معمول کاهش تنوع ژنتیکی در تمامی مولدین با گذر از تنگناهای ژنتیکی واقع می شود (Xia *et al*., 2005) در این گونه تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه (صید توده ای کیلکا ماهیان در فصل تکثیر) و حمله مهاجم شانه دار است، که با گذشت زمان موجب کاهش الل و کاهش هتروزایگوسیتی در ذخایر می شود.

در بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی، هر دو فصل نمونه برداری تقریبا همه لوکوس ها خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند ($P\leq$۰/۰۰۱). چنین نتیجه ای می تواند ناشی وجود اللهای پوچ (Null) باشد که پهلوگیری در آنها صورت نمی پذیرد و بروز آن در توارث ریزماهواره در شگ ماهیان تایید شده است (Julian and Barton, 2007; Gonzalez and Zardoya, 2007; Miller *et al*., 2001; Pereyra *et al*., 2004). به نظر می رسد، مهاجرت و اختلاط جمعیت ها مهمترین عاملی است که سبب می گردد تعادل هاردی – واینبرگ برقرار نباشد.

R_{ST} و F_{ST} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می شوند (Balloux and Lugan, 2002). در این بررسی میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۳۲ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می باشد (Balloux *et al*., 2002) بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت ها از یکدیگر جداست. بر اساس تست AMOVA میزان R_{ST} بین دو فصل نمونه برداری معنی دار بود (P<۰/۰۱). از این رو به نظر می رسد که حداقل دو جمعیت مختلف ژنتیکی در منطقه بابلسر وجود داشته باشد. پایین بودن مقدار F_{ST} به علت پلی مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در ریزماهوارهها و مهاجرت در این ماهی است که به طور موثری میزان F_{ST} را کاهش می دهند (Balloux and Lugan, 2002). به طور کلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت ها جلوگیری می کند و در ماهیان بین مقدار F_{ST} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (Waples, 1987). طبق این فرضیه و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالا ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است و همچنین ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت در زیر جمعیت ها ایجاد می شود که علت وجود ساختار جمعیتی کم این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thorpe and Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جدایی جمعیت ها را به طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۰۳ تا ۰/۶۱) ذکر کرده اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/۵۶۶) و نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت های مشاهده شده است.

کاهش جمعیتهای گونه کیلکای معمولی در طول دهه اخیر اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را روشن می سازد. از آنجایی که نگهداری تمامیت ژنتیکی جمعیتهای این ماهی اهمیت اساسی دارد بنابراین شناسایی ساختار جمعیت به طراحی مناسب برنامه های بازسازی ذخایر کمک می کند. این بررسی دلایل و نتایج اولیه را برای وجود جمعیتهای متمایز ماهی کیلکای معمولی و وجود تنگناهای ژنتیکی بر آنها رانشان می دهد و برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن ضروری است توجه و اقدام جدی صورت پذیرد. طبق واقعیت های موجود، هر سال میزان صید کیلکا ماهیان بر اثر صید بی رویه و حمله شانه دار مهاجم کاهش می یابد، ضروری است برنامه ریزی های جامع برای کنترل صید و برنامه ریزی جدی تر برای احیاء ذخایر این گونه صورت پذیرد.

منابع

اسماعیلی ساری، ع. ابطحی، ب. سیف آبادی، ج. خدابنده، ص. طلایی، ر. درویشی، ف. و ارشاد، ه. ۱۳۸۰. تهاجم شانه دار *Mnemiopsis leidyi* و آینده دریای خزر. نقش مهر. ۱۴۴ ص.

زایتسف و . الف.، ۱۳۸۱. شانه دار *M.leidyi* در دریای سیاه و خزر و اثرات ناشی از ورود آن، ترجمه، قربانعلی امانی عبدالملکی، موسسسه تحقیقات شیلات ایران، ۷۲ ص.

فضلی، ح. صیاد بورانی، م. جانباز، ع. نادری ، م. ابو، م. مقیم، م. عوفی، ف. و آذری، ع. ۱۳۸۱. بررسی آماری و بیولوژیک کیلکا ماهیان در مناطق صید تجاری، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۷۳ صفحه.

لالوئی، ف. رضوانی گیل کلاهی، س. نیرانی، م. و تقوی، م. ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت های کیلکای معمولی (*Clupeionella clutriventris*) در حوضه جنوبی دریای خزر به روش *PCR-RFLP* ، مجله علمی شیلات ایران، سال پانزدهم، شماره ۲، صفحه: ۱۱۹- ۱۲۸.

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

غفارزاده، ح. هنربخش، ن. ۱۳۸۶. بررسی تبعات اقتصادی عدم مبارزه با گونه مهاجم شانه دار در خزر در سواحل ایرانی دریای خزر، علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره نهم، شماره چهارم ، زمستان ۸۶.

Alarcon, J.A. Magoulas, A. Georgakopoulos, T. Zouros, E. and Alvarez, M.C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Aquaculture. 230: 65–80.

Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Molecular Ecology. 11: 155-165.

Bataillon, T. M., David, J. L. and Schoen, D. J. 1996. Neutral genetic markers and conservation:

simulated Germplasm collections. Genetics. 144:409-417.

Beardmore, J.A. Mair, G.C. and Lewis, R.I. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture Research. 28: 829– 839.

Chistiakov, D.A. Hellemans, B. Haley, C.S. Law, A.S. Tsigenopoulos, C.S. Kotoulas, G. Bertotto, D. Libertini, A. and Volckaert, F.A. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. Genetics. 170: 1821–1826.

Cui, J. Z. Shen, X. Y. Yang, G. P. Gong, Q. L. and Gu, Q. Q. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus* . Aquaculture. 250: 129– 137.

Diz, P. A., and Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician

Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. 287: 278-285.

Gonzalez, E. G. and Zardoya, R. 2007. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). BMC Evolutionary Biology. 7: 197.

Gonzalez, E. G. and Zardoya, R. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the sardine *Sardina pilchardus* (Clupeiformes: Clupeidae). Molecular Ecology Notes. 7: 519–521.

Hynes, R. A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish

populations whit special reference to Salmo. Fish Biology. 47:103-126.

Ivanov, V. P. 2000. Biologocal resources of the Caspian Sea. P:100.

Julian, Sh. E. and Barton, M. L. 2007. Microsatellite DNA markers for American shad (*Alosa sapidissima)* and cross-species amplification within the family Clupeidae. Molecular Ecology Notes. 7: 805-807.

Lin, Y. S., Poh, Y. P., Lin, S. M. and Tzeng, C. S. 2002. Molecular techniques to identify freshwater

eels. Zoological Studies. 41:421-430.

Miller, K. M., Laberee, K., Schulze, A. D. and Kaukinen, K. H. 2001. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasi*). Molecular Ecology Notes. 1: 131-132.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283-292.

Peakall, R. and Smouse, P.E. 2009. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. Available at: http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/

Pereyra, R. T., Saillant E., Pruett, C. L., Rexroad C. E., Rocha-Olivers A. and Gold G. R. 2004. Characterization of polymorphic microsatellites in the Pacific sardine *Sardinops sagax sagax* (Clupeidae). Molecular Ecology Notes. 4: 739-741.

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. Genetics and Biodiversity. 27-29.

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

Shaw, P.W. Turan, C. Wright, J.M. O'Connell, M. and Carvalho, G. R. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*) with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. Heredity. 83: 490–499.

Shen, X.Y. and Gong, Q.L. 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. Oceanol Limnology Sience. 35: 332–341.

Thorpe, J.P. and Sole-Cava A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zoologica Scripta. 23: 3-18.

Wang, C., Yu, X. and Tong, J. 2007. Microsatellite diversity and population genetic structure of

redfin culture (*Culter erythropterus*) in fragmented lakes of the Yangtze River. Hydrobiologia.

586: 321-329.

Waples, R.S. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution. 41: 385– 400.

Xia, J. Zheng, J. and Wang, D. 2005. Ex situ conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) as measured from microsatellites and mtDNA diversity. ICES Journal of Marine Science. 62: 1711-1716.