

بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در مناطق انزلی و گمیشان با استفاده از نشانگر ریزماهوره

حدیثه کشیری^{۱*}، علی شعبانی^۲، بهاره شعبانپور^۲ و محمد رضایی^۳

۱. دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. عضو هیات علمی رشته شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

ماهی کلمه یکی از گونه‌های ارزشمند ماهیان استخوانی بوده که در نواحی جنوبی دریای خزر از نظر اقتصادی حائز اهمیت می باشد. بررسی‌ها نشان داده که تکثیر طبیعی این گونه طی سالهای اخیر کاهش یافته است. در حال حاضر بازسازی ذخایر ماهی کلمه از طریق تکثیر مصنوعی صورت می گیرد. در این راستا، کاهش ذخیره ژنی این گونه از نگرانی‌های اصلی در ادامه این مسیر می باشد. در تحقیق حاضر، جهت بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه تعداد ۵۴ نمونه ماهی از مناطق انزلی و گمیشان (۲۷ نمونه از هر منطقه) در بهار سال ۱۳۸۶ صید گردید. DNA ژنومی نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۱۰ لوکوس ریزماهوره‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی پارامترهای تنوع ژنتیکی (تالاب گمیشان: تعداد الل در سطح لوکوس: $N_a=11/4$ ، تعداد الل موثر: $N_e=7/92$ ، هتروزایگوسیتی مشاهده شده: $H_o=0/69$ و هتروزایگوسیتی مورد انتظار: $H_e=0/85$) (تالاب انزلی: $N_a=10/2$ ، $N_e=7/38$ ، تفاوت معنی‌داری بین مناطق مورد نظر مشاهده نشد ($P>0/05$). آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۵٪) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. میزان شاخص F_{st} $0/46$ به دست آمد که نشان دهنده وجود تمایز ژنتیکی پایین بین مناطق انزلی و گمیشان می باشد. ۱۰ نمونه از ۲۰ تست مورد بررسی، انحراف معنی‌داری ($P\leq 0/05$) از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند که علت عمده آن را می توان به کاهش هتروزایگوسیتی نسبت داد. همچنین نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام بر اساس فاصله ژنتیکی نشان داد که احتمالاً دو جمعیت مورد بررسی مجزا می باشند.

واژگان کلیدی: ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)، تعادل هاردی-واینبرگ، ریزماهوره، انزلی، گمیشان.

* نویسنده مسؤل، پست الکترونیک: hadiskashiri@gmail.com

۱. مقدمه

طی سال های اخیر جمعیت های بسیاری از گونه ها به دلیل دخالت های مستقیم یا غیر مستقیم بشر دچار تغییرات چشمگیری شده و در معرض خطر انقراض می باشند. بسیاری از این گونه ها جهت ابقا در طبیعت و محفوظ ماندن از خطر انقراض نیاز به تکثیر مصنوعی دارند (Millennium Ecosystem Assessment, 2005)، به طوریکه امروزه تکثیر حمایتی به طور گسترده ای به منظور بازسازی، حفاظت و افزایش جمعیت های وحشی انجام می پذیرد. روش تکثیر حمایتی در برنامه های بازسازی ذخائر شامل صید مولدین از طبیعت، تکثیر در شرایط اسارت و رهاسازی نتاج آنها در طبیعت می باشد (Dunham, 2004). امروزه، نگرانی در مورد اثرات ژنتیکی احتمالی رهاسازی به نکته ای اساسی در ارزیابی کارایی برنامه های بازسازی ذخایر تبدیل شده است (Gonzalez et al., 2008). محققین بر این باورند که علی رغم مزایای تکثیر حمایتی در بهبود جمعیت های وحشی، این روش دارای محدودیت های عمده ای نیز می باشد. در واقع، برنامه های بازسازی که به منظور تقویت ذخایر وحشی انجام می گیرد می تواند باعث کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، تغییر در ذخایر ژنی بومی و حتی انقراض جمعیت های محلی گردد (Machado-Schiaffino et al., 2007). تنوع ژنتیکی به عنوان اولین پیش نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت ها در شرایط محیطی در حال تغییر بوده و اهمیتی حیاتی برای منابع دریایی جهت مدیریت ژنتیکی و حفاظت از آن ها دارد. طی دهه های اخیر، اطلاعات ژنتیکی در بیولوژی حفاظت به عنوان جزئی ضروری در برنامه های مدیریتی گونه های در معرض تهدید در نظر گرفته می شود (Ludwig, 2006). بنابراین اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت ها قبل از انجام هرگونه پروژه بازسازی و رهاسازی ضروری می باشد (Raymond and Rousset, 1995). در بررسی های ژنتیک جمعیت معمولا نشانگرهای ژنتیکی مختلفی مورد استفاده قرار می

گیرند. نشانگرهای ریزماهوره، توالی های تکراری DNA می باشند که مزایای آنها باعث افزایش کاربرد و استفاده از آنها به جای سایر نشانگرها در مطالعات ژنتیک جمعیت شده است (Angers and Bernatchez, 1998). ریزماهوره ها دارای پلی مورفیزم بالایی بوده به طوریکه این مارکرها می توانند به منظور مطالعه ژنتیک جمعیت، بویژه در مورد جمعیت هایی که با دیگر مارکرها تنوع کمی نشان می دهند، بسیار مفید باشند (Dunham, 2004).

ماهی کلمه خزر یکی از گونه های ارزشمند دریای خزر بوده و به علت دارا بودن گوشتی خوش طعم به عنوان یک منبع غذایی مهم برای ساکنین نواحی جنوبی دریای خزر محسوب می گردد. این ماهی همچنین یک منبع غذایی مهم برای فیل ماهی دریای خزر می باشد (Keyvanshokoo and Kalbassi, 2006). بررسی ها نشان داده که تکثیر طبیعی این گونه طی سالهای اخیر کاهش یافته است. کاهش در ذخایر ماهی کلمه در سال های اخیر، بنا به دلایل مختلف از جمله صید بی رویه، آلودگی آبها و ایجاد سد بر مسیر مهاجرت وجود داشته به طوریکه این گونه جزو گونه های در معرض تهدید دریای خزر معرفی گردیده است (Kiabi et al., 1999). در حال حاضر حفاظت و بازسازی ذخایر این ماهی با ارزش از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی لاروها (۱-۲ گرم) به آب های طبیعی انجام می پذیرد، در این خصوص، کاهش ذخیره ژنی از نگرانی های اصلی در ادامه این مسیر می باشد. با وجود اهمیت بسیار بالای ماهی کلمه برای ساکنین سواحل دریای خزر و همچنین تکثیر مصنوعی این گونه به منظور بازسازی ذخایر آن، متأسفانه تحقیقات اندکی در مورد وضعیت ژنتیکی و جمعیت شناسی این گونه ارزشمند صورت گرفته است و تنها مطالعه منتشر شده مربوط به بررسی صورت گرفته روی آنالیز ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق خلیج گرگان و انزلی با استفاده از ۶ لوکوس میکروستلایت (Keyvanshokoo et al., 2007) و مارکر RAPD (Keyvanshokoo and

۲. مواد و روش ها

در بهار سال ۱۳۸۶، تعداد ۵۴ عدد ماهی کلمه از مناطق گمیشان (E ۴۰.۴۱' ۵۷' ۵۳° N ۲۷.۹۲'; ۳۷° ۱۸' E) در استان گلستان (۲۷ نمونه) و انزلی (E ۱۳.۲۰' ۲۲' ۴۹° N ۲۰.۲۶' ۲۸' ۳۷°) در استان گیلان (۲۷ نمونه) (شکل ۱) توسط مراکز صید سازمان شیلات ایران صید گردید. حدود ۲-۳ گرم از باله پشתי هر ماهی جمع‌آوری و در ظروف نمونه‌گیری حاوی الکل اتیلیک مطلق قرار داده شد. سپس نمونه‌ها برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل گردیدند.



شکل ۱. مناطق نمونه برداری ماهی کلمه (گمیشان و انزلی)

(Kalbassi, 2006) می باشد. با توجه به اینکه تکثیر طبیعی ماهی کلمه از مدت‌ها پیش کاهش یافته و در حال حاضر نیز بخشی از ذخایر این گونه از طریق تکثیر مصنوعی تامین می گردد، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه در مناطق مهم پراکنش آن بسیار ضروری می باشد. لذا در این تحقیق تلاش شد تا با به کارگیری ۱۰ لوکوس ریزماهواره به بررسی هر چه بهتر ساختار ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق گمیشان و انزلی که جزو مناطق عمده پراکنش این گونه محسوب می شوند، پرداخته گردد.

کیفیت و کمیت DNA های استخراجی نیز با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و بایوفتومتر تعیین گردید.

ده لوکوس مایکروستلایت Ca1, Ca3 (Dimsoski *et al.*, 2000), CypG27, CypG24, CypG3 (Baerwald and May, 2004), Lid1 (Barinova *et al.*, 2004), Rru2, Rru4, Z21908 (Shimoda *et al.*, 1999) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). تکثیر لکوس‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۴۰۰ میکرومولار از نوکلئوتیدها، یک واحد تگ DNA پلیمرز، بافر PCRX، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم انجام گرفت. همچنین چرخه های

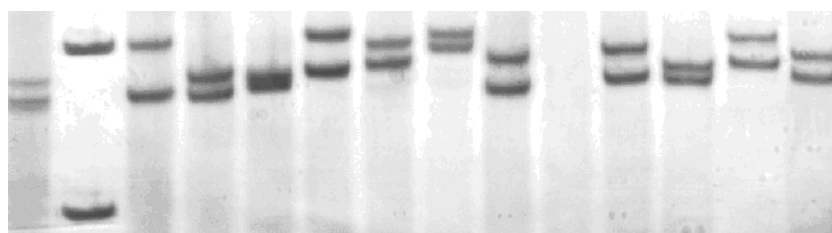
DNA هسته‌ای نمونه‌ها با استفاده از هضم پروتئیناز K، خالص سازی فنل-کلروفرم و رسوب اتانولی طبق روش عنوان شده توسط Hillis و همکاران در سال ۱۹۹۶ استخراج شد (Hillis *et al.*, 1996). بدین منظور، نمونه های بافت باله با استفاده از پروتئیناز K و بافر استخراج (۱۰۰ میلی مول تریس اسیدی، ۱۰ میلی مول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، ۲۵۰ میلی مول کلرید سدیم و بافر سولفات دودسیل سدیم (SDS) ۱ درصد: پی اچ ۸) با ۱۲ ساعت نگهداری در دمای ۵۵ درجه هموزن و هضم گردید. بافت تجزیه شده به روش فنل-کلروفرم خالص سازی و DNA از طریق اضافه کردن اتانول سرد و سانتریفیوژ رسوب داده شد. رسوب DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل و برای نگهداری طولانی مدت در فریز ۲۰- قرار داده شد.

یونیزه) جداسازی شدند، از نشانگر DNA (Ladder ۵۰bp) به عنوان شاخص برای تعیین اندازه الی استفاده شد. در ادامه، ژل‌ها به روش نیترا ت نقره (Bassam *et al.*, 1991) رنگ آمیزی و پس از تهیه تصاویر آنها توسط دستگاه مستندساز ژل (شکل ۲)، از نرم افزار 3.0 Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید.

حرارتی شامل ۳ سیکل: ۱ سیکل ۳ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه (واسرشته سازی اولیه)، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه ای به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه (بسط)، و ۱ سیکل ۷۲ درجه ای به مدت ۳ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی، بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد (غیر

جدول ۱. خصوصیات لکوس‌های به کار برده شده در این مطالعه

دمای اتصال	پرایمر	توالی تکراری	جایگاه ژن
۵۵	F: AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC R: CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA	(CA) ₂₄	Ca1
۵۲	F: GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC R: TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG	(TAGA) ₁₄	Ca3
۵۹	F: AGT AGG TTT CCC AGC ATC ATT GT R: GAC TGG ACG CCT CTA CTT TCA TA	(CAGA) ₂ (TAGA) ₁₁	CypG3
۵۸	F: CTG CCG CAT CAG AGA TAA ACA CTT R: TGG CGG TAA GGG TAG ACC AC	(CAGA) ₁₉	CypG24
۴۹	F: AAG GTA TTC TCC AGC ATT TAT R: GAG CCA CCT GGA GAC ATT ACT F: GAA AAA CCC TGA GAA ATT CAA AAG A	(TAGA) ₈	CypG27
۵۲	R: GGA CAG GTA AAT GGA TGA GGA GAT A	(TAGA) ₇	CypG30
۵۱	F: TAA AAC ACA TCC AGG CAG ATT R: GGA GAG GTT ACG AGA GGT GAG	(CT) ₅ (CA) ₂₀	Lid1
۴۶	F: TTC CAG CTC AAC TCT AAA GA R: GCA CCA TGC AGT AAC AAT	(GT) ₉ A(TG) ₅	Rru2
۵۴	F: TAA GCA GTG ACC AGA ATC CA R: CAA AGC CTC AAA AGC ACA A	(CA) ₁₅	Rru4
۵۹	F: ATT GAT TAG GTC ATT GCC CG R: AGG AGT CAT CGC TGG TGA GT	(CA) ₆	Z21908



شکل ۲. نمونه ای از محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید (جایگاه CypG27)

۳. نتایج

هر ده لوکوس مورد استفاده در این تحقیق، پلی مورفیزم نشان دادند. در بررسی ظرفیت اطلاعات پلی مورفیزم لوکوس ها، PIC قابل توجهی از ۰/۹۳ برای لوکوس های CypG3 و Ca3 تا ۰/۷۴ برای Z21908 مشاهده شد (جدول ۲). نتایج حاصل از نرم افزار microchecker امکان وجود الل های نول را در لوکوس های Rru4، Lid1 و Z21908 تایید نمود، فراوانی الل نول در لوکوس های مذکور به ترتیب ۰/۲۰۱، ۰/۲۸۵ و ۰/۲۳۸ به دست آمد. در بررسی تنوع اللی، تعداد کل الل در سطح لوکوس در محدوده ۲۱ - ۶ به دست آمد به طوریکه لوکوس های Z21908 و Ca3 به ترتیب پایین ترین (۶) و بالاترین (۲۱) تعداد الل را نشان دادند (جدول ۲). تعداد متوسط الل های مشاهده شده و موثر در تالاب گمیشان به ترتیب ۱۱/۴ و ۷/۹۲ و در تالاب انزلی ۱۰/۲ و ۷/۳۸ به دست آمد که از این حیث تفاوت معنی داری بین مناطق مورد نظر مشاهده نشد ($P < 0.05$). مقادیر مربوط به تعداد الل های مشاهده شده و موثر و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در هر منطقه در جدول (۳) آورده شده است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) به ترتیب در محدوده ۱/۰۰-۰/۳۳ (میانگین: ۰/۷) و ۰/۹۳-۰/۷۲ (میانگین: ۰/۸۵) قرار داشت. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح مناطق نیز به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۷۱ برای تالاب گمیشان و انزلی به دست آمد. همچنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی داری از نظر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مشاهده نشد ($P < 0.05$).

تعداد الل در هر لوکوس، الل موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) با استفاده از نرم افزار Genealex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. همچنین نحوه توزیع تنوع مشاهده شده و تمایز بین مناطق بر اساس مدل آلی بی نهایت (Fst) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نیز با همین نرم افزار مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ با مقایسه بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و همچنین تست عدم تعادل پیوستگی (Linkage-disequilibrium)، نرم افزار Genepop 3.1 (Pereira *et al.*, 2010) استفاده شد. به منظور تعیین دلیل انحراف از تعادل، ضریب درون آمیزی (F_{is}) از نظر وضعیت کاهش و افزایش هتروزیگوسیتی و سطح معنی داری آن با استفاده از نرم افزار FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) محاسبه گردید. از نرم افزار Microchecker 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) نیز برای بررسی امکان وجود اللهای نول استفاده شد. تعیین فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei, 1972) و رابطه ژنتیکی بین جمعیتها با استفاده از درخت UPGMA با بکارگیری نرم افزار PopGene 1.3 (Yeh *et al.*, 1999) صورت گرفت، دندروگرام به دست آمده نیز توسط برنامه TreeView (Page, 1996) قابل چاپ گردید. از نرم افزار Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998) هم جهت تعیین ظرفیت اطلاعات پلی مورفیزم (PIC) به عنوان یکی از شاخص های تنوع لوکوسی و همچنین میزان فراوانی الل های نول استفاده گردید. برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مورد انتظار و تنوع اللی از تست ویلکاکسون غیر پارامتریک در نرم افزار SPSS 16 استفاده شد (Zar, 1999).

جدول ۲. تعداد کل ال‌های مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات پلی مورفیسم (PIC) لوکوس‌های مورد استفاده

Z21908	Rru4	Rru2	Lid1	CypG30	CypG27	CypG24	CypG3	Ca3	Ca1	لوکوس
۰/۷۴	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۶	۰/۹۱	۰/۹۲	۰/۹۰	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۸۵	PIC
۶	۸	۸	۹	۱۷	۱۸	۱۳	۱۸	۲۱	۸	تعداد کل ال

جدول ۳. تنوع ژنتیکی ۱۰ لوکوس مورد مطالعه در جمعیت‌های ماهی کلمه

Z21908	Rru4	rRru	Lid1	CypG30	CypG27	CypG24	CypG3	CA3	CA1	
۶	۷	۸	۸	۱۶	۱۲	۱۳	۱۶	۲۱	۷	N _a
۴/۰۵	۳/۶۶	۶/۴۵	۶/۵	۱۱/۷۵	۷/۸۳	۹/۷۲	۹/۲۲	۴۳/۱۴	۵/۵۶	N _e
۰/۳۳	۰/۴۴	۰/۸۵	۰/۵۵	۰/۵۹	۰/۸۱	۰/۷۴	۰/۶۶	۰/۸۸	۱/۰۰	H _o
۰/۷۵	۰/۷۲	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۹۱	۰/۸۷	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۹۳	۰/۸۲	H _e
۰/۵۷	۰/۴۰	۰/۱۱	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۰۸۵	۰/۱۹	۰/۲۷	۰/۰۶۴	-۰/۲	F _{IS}
***	***	ns	***	*	ns	***	**	ns	N _s	pH _w
۶	۸	۶	۹	۱۴	۱۲	۱۰	۱۸	۱۱	۸	N _a
۴/۵۴	۵/۷۴	۴/۲۵	۷/۴۳	۹/۷۸	۶/۷۱	۸/۳۳	۱۳/۶۲	۶/۹۱	۵/۶	N _e
۰/۶۳	۰/۴۸	۰/۷۰	۰/۵۹	۰/۸۵	۰/۶۳	۰/۸۵	۰/۷۷	۰/۶۶	۱/۰۰	H _o
۰/۷۸	۰/۸۲	۰/۷۶	۰/۸۶	۰/۸۹	۰/۸۵	۰/۸۸	۰/۹۲	۰/۸۵	۰/۸۴	H _e
۰/۲۱	۰/۴۳	۰/۰۹	۰/۳۳	۰/۰۷	۰/۲۷	۰/۰۵	۰/۱۷	۰/۲۳	۰/۱۶	F _{IS}
ns	**	*	ns	ns	***	N _s	ns	ns	***	pH _w

N_a: تعداد ال‌های مشاهده شده، N_e: تعداد ال‌های موثر، H_o: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، H_e: هتروزایگوسیتی مورد انتظار، F_{IS}: ضریب درون آمیزی (زیر مقادیر معنی دار خط کشیده شده است)، pH_w: تست احتمال هاردی-واینبرگ (۰/۰۰۵: Pb).

انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ برای تمام ترکیبات جایگاه ژنی - جمعیت محاسبه گردید (جدول ۳). ۱۵ نمونه از ۲۰ تست مورد بررسی (۱۰ لوکوس $\times 2$ منطقه) به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) انحراف از تعادل نشان دادند اما پس از به کار بردن ضریب تصحیح بونفرونی تنها ۱۰ نمونه انحراف معنی داری از تعادل داشتند ($Pb: 0.005$). در این راستا، عدم تعادل پیوستگی بین هیچ کدام از جفت جایگاه‌های ژنی مشاهده نگردید. در بررسی ضریب درون آمیزی (Fis) (جدول ۳)، لوکوس های CypG3، Lid1، و Rru4 در هر دو منطقه و لوکوس های CypG30 و Z21908 در تالاب گمیشان و CypG27 در انزلی کاهش هتروزیگوسیتی معنی داری ($P \leq 0.002$) پس از اعمال ضریب تصحیح در نرم افزار FSTAT، نشان دادند.

در بررسی تمایز ژنتیکی، میزان شاخص Fst بر اساس آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، 0.046 به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از AMOVA نشان داد که ۹۵ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها ۵ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها می‌باشد. بر اساس معیار فاصله ژنتیکی Nei، میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه 0.61 و مقدار فاصله ژنتیکی 0.48 به دست آمد. بر اساس دندروگرام UPGMA بر پایه مقدار فاصله ژنتیکی نیز می‌توان بیان داشت که جمعیت های مورد بررسی جدا از هم می‌باشند.

۴. بحث و نتیجه گیری

ریزماهوره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که به صورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Liu et al., 2009). در این بررسی از ۱۰ لوکوس ریزماهوره جهت ارزیابی هرچه بهتر ساختار ژنتیکی کلمه خزر در مناطق تالاب گمیشان و انزلی که جزو

مناطق عمده پراکنش این گونه ارزشمند در سواحل جنوبی دریای خزر محسوب می‌گردد، استفاده شد. هر ده لوکوس مورد استفاده در این بررسی پلی مورف و دارای ظرفیت اطلاعات پلی مورفیزم (PIC) قابل توجهی (میانگین: 0.86) بودند، همچنین عدم تعادل پیوستگی در هیچکدام از جفت لوکوس‌ها مشاهده نشد. در این میان، لوکوس های Ca3، CypG3، CypG27 و CypG30 تنوع اللی و PIC بالاتری نشان دادند. ارزش یک نشانگر جهت شناسایی پلی مورفیزم را نشان می‌دهد (Botstein et al., 1980) و بالا بودن میزان آن از عوامل مهم در ارزیابی مناسب بودن لوکوس های ریزماهوره ای می‌باشد (Castro et al., 2006) بنابراین با توجه به PIC بالای مشاهده شده و همچنین با استناد به نتایج حاصل از نرم افزار Microchecker مبنی بر عدم وجود ال نول در لوکوس های مذکور، استفاده از این لوکوس ها در مطالعات مولکولی آتی ماهی کلمه توصیه می‌گردد.

دانش تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها دارای اهمیت بالایی جهت حفاظت از جمعیت های در معرض تهدید و برنامه های بازسازی ذخایر می‌باشد. لذا حفظ و بقای تنوع ژنتیکی در برنامه های تکثیر حمایتی باید در اولویت توجه قرار گیرد (Horreo et al., 2008). کاهش تعداد اللی های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind et al., 2009)، لذا تغییر در تنوع ژنتیکی می‌تواند به صورت تغییر در فراوانی اللهای معمول، از دست رفتن اللهای نادر، و کاهش هتروزیگوسیتی از طریق از دست رفتن اللهای معمولی اندازه‌گیری گردد (Evans et al., 2004). در این تحقیق، تفاوت معنی داری از نظر تنوع اللی و هتروزیگوسیتی بین مناطق گمیشان و انزلی مشاهده نشد ($P > 0.05$). متوسط تعداد اللی (Na)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) به ترتیب 10.8 ، 0.70 و 0.85 به دست آمد. در بررسی

حاضر، تعداد الل، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای تالاب انزلی (به ترتیب ۱۰/۲، ۰/۷۱ و ۰/۸۴) بالاتر از مقادیری بود که در مطالعه قبلیتوسط Keyvanshokoo و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از ۶ لوکوس (Na: ۷/۸، Ho: ۰/۵۶ و He: ۰/۷۰) گزارش گردید، علت این تفاوت را می توان به استفاده از تعداد بیشتر لوکوس با پلی مورفیزم بالا در تحقیق حاضر نسبت داد. روی هم رفته، تنوع اللی و هتروزایگوسیتی مشاهده شده ماهی کلمه در مناطق مورد بررسی، نزدیک به مقادیر گزارش شده برای ماهیان آندروموس (۷/۲ ± ۱۰/۸ : Na، ۰/۱۲ ± ۰/۶۸ : H، Dewoody and Avise, 2000) به دست آمد که این موضوع نشان دهنده آن است که تنوع ژنتیکی این گونه در مناطق مورد نظر هنوز هم در حد مطلوبی قرار دارد. بررسی ها نشان داده که معمولا تنوع اللی و ژنی ماهیانی که تحت برنامه های بازسازی ذخایر قرار می گیرند به مرور کاهش یافته و می تواند اثرات نامطلوبی بر ساختار ژنتیکی جمعیت هدف بگذارد (Koljonen *et al.*, 2002). در واقع، به دلیل مشکلات و محدودیت های موجود در کارگاه های تکثیر همچون استفاده از تعداد محدودی مولد برای تولید لارو، فعالیت های این مراکز در غالب موارد می تواند اثرات معکوسی بر جمعیت های هدف گذاشته و حتی در طولانی مدت باعث انقراض جمعیت های بومی نیز گردد (Busack and Currens, 1995). بنظر می رسد تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به طبیعت جهت بازسازی ذخائر طبیعی تاکنون اثر نامطلوبی بر سطح تنوع ژنتیکی ماهی کلمه نداشته اما با توجه به این حقیقت که بازسازی ذخائر ماهی کلمه از طریق تکثیر مصنوعی در حال انجام بوده و در آینده نیز ادامه خواهد یافت، ایجاد تدابیری جهت حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده و اجتناب از مشکلات ناشی از تکثیر مصنوعی ضروری به نظر می رسد.

تعادل هاردی - واینبرگ در جوامعی صادق است که شرایطی چون تعداد افراد بالا، جمعیت بسته، جفت گیری تصادفی و احتمال جهش بالا در آن حکمفرما باشد (صفری و همکاران، ۱۳۸۶). انحراف از تعادل در جمعیت های مختلف می تواند به دلایل مختلفی از جمله بهگزینی، اثر وهلاند، مهاجرت، درون آمیزی و ... باشد. در تحقیق حاضر، پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، ۱۰ نمونه از ۲۰ تست مورد بررسی انحراف معنی داری از تعادل نشان دادند. در این راستا، عدم تعادل پیوستگی به عنوان یکی از دلایل ممکن برای انحراف از تعادل در هیچکدام از لوکوس ها مشاهده نشد.

در بررسی شاخص Fis، لوکوس های CypG3، Lid1 و Rru4 در هر دو منطقه و لوکوس های CypG30 و Z21908 در تالاب گمیشان و CypG27 در انزلی کاهش هتروزایگوسیتی معنی داری نشان دادند. لذا دلیل عمده انحراف از تعادل در جمعیت های مورد بررسی در این تحقیق را می توان به کاهش هتروزایگوسیتی نسبت داد. در بررسی صورت گرفته روی ماهی کلمه در خلیج گرگان و انزلی نیز علت عمده انحراف از تعادل، کاهش هتروزایگوسیتی عنوان شد (Keyvanshokoo *et al.*, 2007). دلایل بیولوژیکی چنین کاهش به خوبی شناخته نشده و فاکتورهای مختلفی برای توجیه آن مطرح می باشد. جدا از دلایل بیولوژیکی معمول در ایجاد کاهش هتروزایگوسیتی، میکروستلایت ها به طور خاصی مستعد این پدیده می باشند (Diz and Presa, 2009). وجود الل های تکثیر نشده یا نول در ماهی پدیده ای کاملا عادی می باشد و وجود این الل ها در توارث میکروستلایت در ماهیان مورد تایید قرار گرفته است (Rodzen and May, 2002). Xu و همکاران (2001) نیز وجود الل های نول را از عوامل مهم کاهش هتروزایگوسیتی عنوان نمودند (Xu *et al.*, 2001). در این تحقیق با استناد به نتایج

حاصل از نرم افزار Microchecker، حضور ال‌های نول در لوکوس های Rru4، Lid1 و Z21908 تایید گردید، نتایج حاصل از نرم افزار Cervus هم فراوانی بالای ال‌های نول را در لوکوس های مذکور نشان داد (به ترتیب: ۰/۲۰۱، ۰/۲۸۵ و ۰/۲۳۸). همچنین با توجه به تکثیر مصنوعی ماهی کلمه، درون آمیزی و بهگزینی نیز می‌تواند عوامل مهمی در این راستا باشد. به طور کلی، انحراف از تعادل را نمی‌توان تنها با یک عامل توجیه نمود و مجموعه‌ای از عوامل مذکور می‌توانند دلایلی برای کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده و انحراف از تعادل در جمعیت‌های مورد بررسی باشند.

آنالیز واریانس مولکولی به عنوان یک آنالیز آماری ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Grassi et al., 2004). آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۹۵٪ تنوع در درون جمعیت‌ها و تنها ۵٪ بین جمعیت‌ها وجود دارد. بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz and Presa, 2009). میزان Fst به عنوان شاخص تمایز بر اساس آنالیز واریانس مولکولی ۰/۰۴۶ به دست آمد که بر اساس معیار Wright (1978) مقادیر ۰-۰/۰۵ نشان دهنده تمایز پائین میان نمونه‌ها می‌باشد (Wright, 1978). میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو منطقه نیز به ترتیب ۰/۶۱ و ۰/۴۸ به دست آمد بر اساس مقادیر شباهت (I) و فاصله ژنتیکی (D) گزارش شده برای جمعیت‌های هم گونه (۰/۹ - ۰/۸، I: ۰/۰۷ - ۰/۰۲، D: ۰/۰۳ - ۰/۰۶۱، I: ۰/۳۵ - ۰/۸۵) و هم جنس (D: ۰/۰۳ - ۰/۰۶۱، I: ۰/۳۵ - ۰/۸۵) می‌توان بیان داشت که فاصله ژنتیکی قابل توجهی بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد که این امر در تطابق با نتایج به دست آمده توسط Keyvanshokoo و همکاران در سال

۲۰۰۷ می‌باشد. دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی نیز جدایی بین مناطق را نشان داد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد که تنوع ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار دارد. با توجه به کاهش تکثیر طبیعی کلمه طی سال‌های اخیر، تکثیر مصنوعی این گونه جهت بازسازی ذخایر آن ضروری بنظر می‌رسد. با این وجود، تکثیر مصنوعی و رها سازی بچه ماهیان کلمه به طبیعت در صورتیکه بدون اعمال مدیریت لازم و در نظر گرفتن اصول صحیح ژنتیکی صورت گیرد، می‌تواند در سال‌های آتی، تبعات جبران ناپذیری را بر پیکره جمعیت‌های این گونه وارد سازد. به طوریکه جمعیت‌های حاصل از کارگاه‌های تکثیر می‌توانند وارد جمعیت‌های وحشی شده و با افزایش آمیزش خویشاوندی و پیشامد ژنتیکی (که معمولا احتمال وقوع بالایی در جمعیت‌های موجود در کارگاه‌ها دارند) باعث کاهش تفاوت ژنتیکی و از دست رفتن واریانس ژنتیکی جمعیت‌ها و در نهایت کاهش شایستگی بقای آنها در طبیعت گردند. لذا توجه هر چه بیشتر به مسئله تکثیر مصنوعی این گونه و ایجاد تدابیری جهت حفاظت از تنوع ژنتیکی مشاهده شده و انتقال به نسل‌های بعدی ضروری به نظر می‌رسد. در این خصوص، لازم است جدایی جمعیت‌های مورد بررسی نیز در برنامه بازسازی ذخائر مد نظر قرار گیرد.

منابع

صفری ر، پورکاظمی م، رضوانی س، شعبانی ع. ۱۳۸۶. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شپ (Acipenser nudiventris) در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از میکروستلایت‌ها. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد چهاردهم، ۴۹-۵۴.

- Angers, B., Bernatchez, L. 1998. Combined use of SMM and non SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 15: 143–159.
- Baerwald, M.R., May, B. 2004. Characterization of microsatellite loci for five members of the minnow, family Cyprinidae, found in the Sacramento–San Joaquin Delta and its tributaries. *Mol. Ecol. Notes* 4: 385–390.
- Barinova, A.; Yadrenkina, E.; Nakajima, M., Taniguchi, N., 2004. Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in the *Leuciscus idus* and Siberian roach *Rutilus rutilus*. *Mol. Ecol. Notes* 4: 86–88.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, G. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytic. biochem.* 84: 680–683.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314–331.
- Busack, C.A., Currens, K. P. 1995. Genetic risks and hazards in hatchery operations: fundamental concepts and issues. *Schramm and Piper*, p 71-80.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Riaza, A., Ferreira, I., Sanchez, L., Martinez, P. 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumption. *Aquaculture* 261: 1194-1203.
- Dewoody, J.A., Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. *J. Fish. Biol.* 56: 461-473.
- Dimoski, P., Toth, G.P., Bagley, M.J. 2000. Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). *Mol. Ecol.* 9: 2187–2189.
- Diz, P.A., Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* 287: 278–285.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. CABI Publishing, p504.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P., Elliott, N.G. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* 233: 109–127.
- Gonzalez, E.B., Nagasawa, K., Umino, T. 2008. Stock enhancement program for black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Hiroshima Bay: Monitoring the genetic effects. *Aquaculture* 276: 36–43.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grassi, F., Imazio, S., Gomarasca, S., Citterio, S., Aina, R., Sgorbati, S., Sala, F., Patrignani, G., Labra, M. 2004. Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. *Plant Sci.* 166: 1437-1441.
- Horreo, J.L., Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., Garcia-Vazquez, E. 2008. Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 280: 89–93.
- Keyvanshokoh, S. and Kalbassi, M. R., 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. *Aquaculture Res.* 37: 1437-1440.
- Keyvanshokoh, S., Ghasemi, A., Shahriari-Moghadam, M. Nazari, R.M., Rahimpour, M. 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran by microsatellite markers. *Aquac. Res.* 38: 953-956.
- Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M. 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian basin of Iran *J. Zoo. Mid. East* 18: 57-65.
- Koljonen, M.L., Tahtinen, J., Saias, M., Koskiniemi, J. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*salmo salar*) by captive breeding programs and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* 212: 69-92.
- Lind, C.U., Evans, B.S., Knauer, J., Taylor, J.J.U., Jerry, D.R. 2009. Decreased genetic

diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture* 286: 12–19.

Liu, F., Xia, J. H., Bai, Z. H., Fu, J.J., Li, J. L., Yue, G.H. 2009. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture* 297: 51-56.

Ludwig, A. 2006. A sturgeon view on conservation genetics. *Eur. J. Wild. Res.* 52: 3–8.

Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., Garcia-Vazquez, E. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* 264:59–65.

Marshall, TC, Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends, Volume 1: Findings of the Conditions and Trends Working Group of the Millennium Ecosystem Assessment.* Island Press, Washington, DC, p420.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283- 92.

Page RDM, 1996. TREE VIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357–358

Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6.3: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.

Pereira J.C., Lino P.G., Leitao A., Joaquim S., Chaves R., Pousao-Ferreira P. Guedes-Pinto H. and Neves dos Santos M., 2010. Genetic differences between wild and hatchery populations of *Diplodus sargus* and *D. vulgaris* inferred from RAPD markers: implications for

production and restocking programs design. *J. Appl. Gen.* 51: 67–72

Raymond, M. and Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. *Heredity*, 86: 248-249.

Rodzen, J.A., May, B. 2002. Inheritance of microsatellite loci in the polyploidy white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genome* 54: 1064-1076.

Shimoda, N., Knapik, E.W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., Sauvage, F., Jacob, H. 1999. Zebra fish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.

Thorpe, J.P., Sol-Cve, A.M. 1994. The use of Allozyme electrophoresis in vertebrate systematics, *Zoo. Scripta.* 23: 3-18.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.

Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations. Volume 4: Variability within and Among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago.

Xu, Z., Primavera, J.H., De la Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J., Warren, A.A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13– 40.

Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Windows Freeware for population Genetic Analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River New Jersey, 07458.

Population Structure of Caspian Roach (*Rutilus Rutilus caspicus*) in Southern Coasts of Caspian Sea using Microsatellite Marke

Kashiri, Hadis*. Shabani, Ali. Shabanpour, Bahareh. Razaei, Mohammad

Department of Fisheries. Faculty of Fisheries and Environment, University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

Caspian roach is regarded as a valuable bony fish that has economic importance in southern parts of Caspian Sea. Investigations show that natural reproduction of this species has been declining during recent years. Restocking of this fish is achieved by the way of artificial reproduction. Loss of genetic stock of this species is of great concern. In the current study, in order to study the population structure of roach, 54 individuals were captured from Gomishan and Anzali wetlands (27 individuals from each region) in April 2007. Genomic DNA was extracted using phenol-chloroform method and investigated by 10 microsatellite loci. The genetic diversity of two regions [(Gomishan: average number of alleles, $N_a= 11.4$, average effective number of alleles, $N_e= 7.92$, observed heterozygosity, $H_o= 0.69$ and expected heterozygosity, $H_e= 0.85$) (Anzali: $N_a= 10.2$, $N_e= 7.38$, $H_o= 0.71$ and $H_e= 0.84$)] were not statistically different ($P>0.05$). Analysis of molecular variance showed high genetic diversity (%95) within populations. The F_{st} value was 0.046, indicating low genetic differentiation among Anzali and Gomishan regions. In this study, 10 of 20 (10 loci \times 2 populations) tests showed significant deviation ($P\leq 0.005$) from Hardy-Weinberg equilibrium due to the heterozygosity deficiency. Results from UPGMA cluster analysis, based on Nei's genetic distance, showed that the regions are probably separated from each other.

Keywords: Roach (*Rutilus Rutilus caspicus*), Hardy-Weinberg equilibrium, microsatellite, Anzali, Gomishan.

*Corresponding author, E-mail: hadiskashiri@gmail.com