Archive of SID

اثر سد شهید رجایی بر تنوع و تمایز ژنتیکی سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) در رودخانه تجن ساری با استفاده از انگشت نگاری RAPD

حسین انوری‌فر[1]، حمید فرحمند*[2]، محمدعلی نعمت‌اللهی[2]، حسین رحمانی[3]، محمود کرمی[4] و بیتا خلیلی[5]

[1] کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[2] استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[3] استادیار دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

[4] استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[5] کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ٨٨/٨/١٧، تاریخ تصویب: ٨٩/١٠/١٨)

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تنوع و تمایز سیاه ماهی در رودخانه تجن ساری که سد شهید رجایی در آن احداث گردیده، طراحی شده است. در مجموع ۶۶ قطعه ماهی که ۳۵ قطعه آن مربوط به‌ایستگاه بالا دست و ۳۱ قطعه آن مربوط به‌ایستگاه پایین دست سد شهید رجایی بود، توسط دستگاه الکتروشوکر، صید و پروفیل DNA این ماهی توسط مارکر RAPD ثبت گردید. از بین ۱۰ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، تعداد ۶ پرایمر با الگوی نواری تکرار پذیر انتخاب شد. در مجموع ۸۹ نوار پلی مورف(نشانگر) به دست آمد که دامنه قطعات تکثیری بین ۵۰ bp– ۱۰۰۰ متغیر بود. نتایج مطالعات ژنتیکی توسط مارکر RAPD نشان داد که میانگین فاصله ژنتیکی این دو جمعیت که بر اساس ماتریکس تشابه و ضریب جاکارت محاسبه شد، ۰/۴۸۷ می‌باشد و از آنجا که مرز تعیین گونه و زیر گونه فاصله ژنتیکی ۰/۵ می‌باشد، استنتاج شد که این دو جمعیت تا حد بسیار بالایی از یکدیگر انشقاق یافته‌اند. نتایج حاصل از آنالیز مولفه‌های اصلی مختصات(PCOA) نیز توانست این دو جمعیت را از یکدیگر متمایز نماید. رسم دندروگرام UPGMA بر اساس ضریب جاکارت نشان داد که‌این دو جمعیت از یکدیگر متمایز است. با توجه به نتایج این بررسی بیان می‌شود که انگشت نگاری RAPD روشی مناسب برای تعیین تمایز ژنتیکی سیاه ماهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیاه ماهی، *Capoeta capoeta gracilis*، انگشت نگاری RAPD، تمایز ژنتیکی، رودخانه تجن، سد شهید رجایی

* نویسنده مسئول: تلفن: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨ فاکس: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨

E-mail: hfarahmand@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاثیر انسان بر اکوسیستم رودخانه‌ها بسیار قابل توجه است برای مثال ۷۷ درصد رودخانه‌ها در شمال امریکا، شمال مکزیک، اروپا و اتحادیه جماهیر شوروی سابق به وسیله سدها متاثر شده‌اند (Dynesius & Nilsson, 1994). تغییرات شرایط محیطی با اثر بر روی صفات ریختی ماهی سبب تغییرات ژنتیکی می‌شود (Tudela, 1999). سدها از جمله مهمترین سازه هایی است که سبب تغییرات شرایط محیطی رودخانه‌ها می‌شود. اثر سدها با تاثیرات بنیادی در تنوع و گوناگونی جانوران اکوسیستم‌ها همراه است (Craig, 2001) که‌این اثرات خود باعث ایجاد تفاوت‌هایی در ماهیان بالا و پائین سد می‌شود (McAllister *et al*, 2001). سدها و دریاچه پشت آنها بر روی تنوع زیستی ماهیان آب شیرین از طریق مسدود کردن مسیر مهاجرت گونه‌ها به سمت بالا و پایین رود (که‌این عامل خود موجب نابودی یا محدود شدن ذخایر ژنتیکی گونه‌ها می‌شود)، تغییر در میزان کدورت و نیز سطح رسوب (ماهیان و یا اکوسیستم‌ها به سطوح خاصی از کدورت و رسوب که در طبیعت وجود دارد سازگار شده‌اند و سیلت موجود در آب ورودی به دریاچه سدها در پشت سد انباشته می‌شود و در نتیجه مواد مغذی و مواد موجود در این آب به دلتاها و مصب‌هایی که در پایین دست وجود دارد نمی‌رسد در نتیجه در حاصلخیزی اکوسیستم‌ها تاثیر می‌گذارد)، فیلتر کردن خار و خاشاک چوبی موجود در آب (این خار و خاشاک خود علاوه بر شرکت در زنجیره غذایی، زیستگاه مناسبی برای گونه‌ها است)، تغییر در شرایط سیلابی رودخانه به وسیله دریاچه پشت سد (آب ورودی در دریاچه پشت سد می‌ماند تا اینکه سیلت آن ته نشین شده و طبقه‌بندی دمایی و اکسیژنی در آن ایجاد شود که اگر آب این دریاچه‌ها باز شود شرایط نامناسبی را برای گونه‌های رود ایجاد می‌کند)، پرورش گونه‌های غیر بومی ماهی در دریاچه‌های پشت سد (احتمالا گونه‌های غیر بومی به‌تدریج جایگزین گونه‌های بومی می‌شود)، اصلاح کیفیت آب خروجی و الگوی جاری شدن آنها و ... اثر می‌گذارد (McAllister *et al*, 2001).

رود تجن یکی از مهمترین رودخانه‌های استان مازندران و حوزه جنوبی دریای خزر است که با سرچشمه گرفتن از ارتفاعات شمال البرز شرقی و مرکزی با عبور از مناطق کوهستانی پوشیده از جنگل، پس از گذر از شهر ساری به دریای خزر می ریزد (Saeidi *et al*., 2007). این رود دارای آب دائمی است و حدود ۳۰ کیلومتر درازا دارد و میانگین آب ورودی از طریق آن به دریای خزر در حدود ۱۹/۴ متر مکعب در ثانیه گزارش شده است (Mazandaran Regional Water Company, 2001). سد شهید رجایی بر روی این رودخانه احداث شده که طبق طبقه‌بندی McAllister و همکاران (2001) جزو سدهای بسیار بزرگ محسوب می شود. این سد بر روی رودخانه دودانگه در محلی به نام تنگه سلیمان واقع در ۴۱ کیلومتری جنوب شهر ساری در ارتفاعات البرز شمالی قرار دارد (Nazariha and Alinezhad, 1999). در رود تجن ساری حدود ۱۰ گونه ماهی زیست می‌کند و سیاه ماهی(*Capoeta capoeta gracilis*) یکی از آنها محسوب می شود (AnvariFar, 2010) و به دلیل پراکنش بسیار گسترده‌ای که دارد برای این مطالعه انتخاب شد. این ماهی از خانواده Cyprinidae و بومی ایران است که در تمام رودهای آب شیرین حوضه جنوبی دریای خزر و دریاچه ارومیه پراکنش دارد (Mostafavi and Abdoli, 2005) بر همین اساس ماهی چیره در حوزه جنوبی دریای خزر به شمار می‌رود (Samaee *et al*., 2009). جنس سیاه ماهی (*Capoeta spp.*) از مرکز تا غرب آسیا پراکندگی دارد که‌این پراکنش شامل کشور های ترکیه، آذربایجان، افغانستان، ارمنستان، گرجستان، عراق، ایران، فلسطین اشغالی و ازبکستان می‌شود (Turan, 2008). این ماهی در دریاچه‌ها تا عمق ۳۵ متری و در رود خانه‌ها در بسترهای قلوه سنگی، شنی و بر روی گیاهان آبزی زیست و تخم ریزی می کند (Valipor, 2003) و در تمام طول رودهایی با جریان آب سریع و کند یافت می‌شود (Turan, 2008) و یک ماهی پوتامودروموس است (Samaee *et al*., 2009). رژیم غذایی سیاه ماهی گیاهخواری است بطوریکه از گیاهان پست، پریفیتون ها و مواد پوسیده گیاهی (پوده) تغذیه می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین به لحاظ دارا بودن جیره غذایی ویژه فاقد رقابت غذایی با دیگر گونه‌های ماهیان در بسیاری از رودها و دریاچه است (Mostafavi and Abdoli, 2005). این گونه از لحاظ ماهیگیری در آب های داخلی، آبزی پروری، صید ورزشی و مطالعات جغرافیای جانوری نیز حائز اهمیت است (Sammaee *et al*., 2006).

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سد شهید رجایی بر تنوع و تمایز ژنتیکی سیاه ماهیان بالادست و پایین دست رود تجن صورت پذیرفت. یکی از روش های مولکولی مورد استفاده در تعیین تنوع و تمایز، تشخیص گونه‌ها، زیر گونه‌ها، جمعیت‌ها و جنس‌ها تکنیک تکثیر تصادفی قطعات چند شکلی DNA (RAPD) است (Gharaei *et al*., 2005). این روش نخستین بار در سال ۱۹۹۰میلادی توسط دو گروه به صورت همزمان کشف شد (Welsh and McClelland, 1990؛ Williams *et al*., 1990). تکنیک RAPD در مقایسه با روش های دیگر مبتنی بر DNA بسیار ساده تر است و نیازی به اطلاعات اولیه در مورد DNA برای طراحی پرایمر ندارد. روش RAPD شامل تکثیر قطعاتی از DNA با استفاده از پرایمر توسط PCR است که منجر به تولید مجموعه قطعات DNA یا همان انگشت نگاری[1] می‌شود. در واقع انگشت نگاری RAPD بررسی این قطعات تولید شده توسط PCR است (Rehnuma *et al*., 2003 ؛ Anvarifar and Farahmand, 2009). RAPD توان بالقوه‌ای برای شناسایی پلی مورفیسم ها دارد که به نسبت بالا است همچنین این مارکر دارای مزایای نشانگر های مبتنی بر PCR است و وراثت مندلی به شکل غالب[2] دارد که به صورت حضور/ عدم حضور امتیاز دهی می‌شود (Liu and Cordes, 2004). از مزایای دیگر این روش می‌توان به سرعت بالای آن، عدم به‌کار گیری مواد رادیو اکتیو، نیاز به مقدار ناچیزی DNA و به‌کار بردن آغازگرهای یکسان برای گونه‌های مختلف و از معایب آن می‌توان مشکل بودن در توضیح وراثت مندلی لوکاس ها و ناتوانی در تشخیص بین هتروزیگوت و هموزیگوت غالب و تکرار پذیری ضعیف باندها اشاره نمود (Welsh & McClenlland, 1990).

اثرات سدها شامل تغییرات پایه‌ای در جامعه جانوری و تنوع زیستی اکوسیستم رودخانه است. در پایین دست سدهای بزرگ، اغلب تاثیرات منفی است زیرا مسیر مهاجرت ماهی‌ها به بالای رودخانه به وسیله سد قطع می‌شود. در بالادست سد تاثیرات به‌این گستردگی نیست و مثال هایی وجود دارد که نشان می‌دهد تعداد گونه‌ها در بالای دست سد افزایش می‌یابد (Gertsev & Gertseva, 1999 ; Poddubny & Galat, 1995). بر اساس تحقیقات انجام شده بر روی رودخانه‌ها و سدهای مربوط به آنها در شش منطقه جغرافیای از جهان که Craig (2001) انجام داد مشخص شد که در ۲۷ درصد موارد اثر مثبت است و در ۷۳ درصد موارد سدها تاثیر منفی بر روی تنوع زیستی ماهیان دارند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سیاه ماهی در رودخانه‌های مختلف از یکدیگر به دلیل جدایی جغرافیایی جدا شده‌اند (Samaee *et al*., 2009 ; Samaee *et al*., 2006 ;Bianco & Banarescu, 1982). با وجود اینکه ثابت شده جدایی جغرافیایی سبب تمایز جمعیت‌های *Capoeta capoeta gracilis* می‌شود ولی تا به حال روی جدایی جغرافیایی که به دلیل ساخت سد در یک رودخانه رخ می دهد، هیچ مطالعه ژنتیکی در ایران صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی رودخانه تجن ساری که سد مخزنی شهید رجایی در آن واقع شده، صورت گرفته است. در این مطالعه دو ایستگاه یکی در بالا دست سد (ایستگاه شماره ۱) و دیگری در پایین دست سد (ایستگاه شماره ۲) انتخاب شد که هر دو ایستگاه در مسیر اصلی رود تجن قرار دارد. ایستگاه بالا دست سد دارای موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۱ دقیقه و ۲۴/۹۱ ثانیه عرض شمالی و۵۳ درجه و ۱۹ دقیقه و ۲۳/۱۳ ثانیه طول شرقی و ایستگاه پایین دست سد ۳۶ درجه و ۱۶ دقیقه و ۱۵/۳۶ ثانیه عرض شمالی و۵۳ درجه و ۱۲ دقیقه و ۵۱/۴۴ ثانیه طول شرقی است (شکل

۱- Fingerprinting

۲- dominant

www.SID.ir

Archive of SID

۱). در این بررسی نمونه برداری از ماهیان با استفاده از دستگاه الکتروشوکر با قدرت ۱ وات و با جریان مستقیم و ولتاژ ۲۰۰-۳۰۰ ولت انجام گرفت. برای انجام مطالعات مولکولی باله‌های سینه‌ای و شکمی یک سمت ماهی (سمت راست) پس از صید جدا شده و در الکل ۹۶ درصد تثبیت و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت الکل آنها تعویض شد. در مجموع تعداد ۶۶ قطعه ماهی نمونه برداری شد که از این تعداد ۳۵ نمونه ماهی مربوط به‌ایستگاه بالا دست و ۳۱ نمونه ماهی مربوط به‌ایستگاه دوم بود.

شکل ۱- موقعیت مکان‌های نمونه‌گیری در بالا دست (۱) و پایین دست (۲) سد شهید رجایی در رود تجن (برگرفته شده از Samaee *et al.*, 2009)

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش کیلاکس[۱] (Walsh *et al.*, 1991؛ Estoup *et al.*, 1996؛ Kumar *et al.*, 2007) صورت پذیرفت. در این روش نمونه‌ای با اندازه ۲×۲ میلیمتر مربع از بافت باله را در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری استریل انداخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول کیلاکس ۱۰ درصد به علاوه ۱۵ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (100 U/ml) به آن اضافه شد. سپس برای فعال نمودن کامل آنزیم پروتئیناز K، میکروتیوب های حاوی نمونه به مدت یک ساعت در بن ماری شیکردار در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از آن، میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد، بر روی حرارت قرار گرفت. هر بار قبل از استفاده نیز میکروتیوب ها پس از یک ورتکس ساده، به مدت ۱۰- ۱۵ ثانیه با دور ۶ rpm هزار سانتریفیوژ شد. برای تعیین کمیت و خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر با نور UV و مشاهده نوار های DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد (۰/۳۲ گرم آگارز جامد در ۴۰ سی سی بافر TAE 1X) و مقایسه آن با فاژ لامبدا استفاده شد.

۱-Chelex protocol

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱]

DNA –(PCR) استخراج شده با استفاده از ۱۰ پرایمر RAPD جهت تعیین چند شکلی مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). این پرایمرها به سفارش شرکت سینا ژن تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR (500 mM KCL and 200 mM Tris-HCL, pH 8.4)، ۲/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase ، ۱۰ میلی مول از هر پرایمر، ۱۵۰ میکرو مول مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP)، ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و آب به مقدار متغییر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۷ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی اولیه)، ۴۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد (واسرشته سازی)، ۱ دقیقه در ۳۸ درجه سانتیگراد (الحاق)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد (بسط) و مرحله پایانی با ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد (بسط نهایی) انجام شد.

الکتروفورز

پس از اتمام کار PCR، محصولات حاصل بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (۰/۶ گرم آگارز در ۴۰ سی سی بافر TAE 1X) الکتروفورز شد. ژل مورد نظر حاوی اتیدیوم برامايد به میزان ۴۰ µl (۰/۰۰۱ حجم بافر) است. این ماده دیده شدن باندها را بر روی ژل امکانپذیر می سازد همچنین برای مشاهده حرکت DNA بر روی ژل، Loading Dye (buffer) با غلظت ۶X به میزان ۱µl به همراه هر محصول PCR به درون چاهک های سینی الکتروفورز تزریق شد. در نهایت محصولات ایجاد شده با استفاده از دستگاه UVITEC مشاهده و با دستگاه مستند سازی ژل[۲] تصویر برداری شد.

آنالیز داده‌های ژنتیکی

برای آنالیز داده‌های ژنتیکی ابتدا پروفیل DNA یا اثر انگشت هر ماهی ثبت و سپس به باندها در صورت حضور/عدم حضور قطعات تکثیر شده امتیاز دهی شد. به این نحو که در صورت تکثیر و وجود باند کد ۱ و در صورت عدم وجود باند کد صفر در نرم افزار Excel (Office 2003) وارد شد. داده‌ها توسط نرم افزار های POPGEN و NTsys مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

از مجموع ۱۰ پرایمر مورد استفاده، تعداد ۶ پرایمر که باندهای پلی مورف بیشتری تولید می کرد انتخاب شد (پرایمرهای ۱-۶). از مجموع ۶ پرایمر، ۸۹ باند چند شکل (پلی مورف) یا نشانگر به‌دست آمد. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده به همراه تعداد نشانگر های پلی مورف بدست آمده از هر پرایمر را نشان می‌دهد. شکل ۲ نمونه‌ای از الگوی باندینگ ۶ پرایمر را در دو نمونه ماهی نشان می‌دهد که یکی مربوط به‌ایستگاه بالا دست و دیگری ایستگاه پایین دست است.

نتایج بررسی تنوع ژنتیکی برای همه باندهای چند شکل لوکاس ها که عبارتند از درصد پلی مورفیسم، تعداد الل های مشاهده[۳] (na)، تعداد الل های موثر[۴] (Ne)، تنوع ژنی Nei(1973)[۵] (H) و شاخص اطلاعاتی شانن[۶] (I) در جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در ایستگاه‌های بالا دست و پایین دست سد در رود تجن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج تنوع ژنتیکی بر اساس آنالیز های Nei (1987) که شامل تنوع ژنتیکی کل نمونه‌ها (Ht)، تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (Hs)، تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) و میزان جریان ژنی (Nm[۷]) می‌شود،

۱- Polymerase Chain Reaction

۲- Gel Documentation

۳- Observed number of alleles

۴- Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

۵- Nei's (1973) gene diversity

۶- Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

۷- estimate of gene flow from Gst or Gcs. E.g., Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst

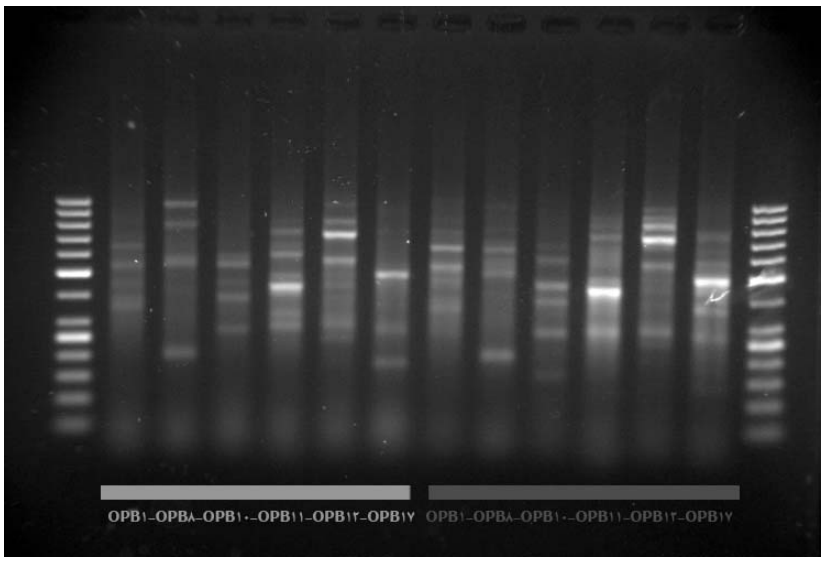
www.SID.ir

Archive of SID

در مجموع در هر دو ایستگاه بالا دست و پایین دست سد ۰/۳۸ ، ۰/۳۶، ۰/۰۶۷ و ۶/۸۶ به‌دست آمد.

جدول ۱- توالی و نوع پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA ژنومی در PCR

ردیف	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدهای پرایمرهای مورد استفاده	درصد GC	تعداد نشانگرهای پلی مورف
۱	OPB1	5′-GTTTCGCTCC-3′	۶۰	۱۶
۲	OPB8	5′-GTCCACACGG-3′	۷۰	۱۵
۳	OPB10	5′-CTGCTGGGAC-3′	۷۰	۱۴
۴	OPB11	5′-GTAGACCCGT-3′	۶۰	۱۵
۵	OPB12	5′-CCTTGACGCA-3′	۶۰	۱۴
۶	OPB17	5′-AGGGAACGAG-3′	۶۰	۱۵
۷	OPA9	5′-GGGTAACGCC-3′	۷۰	-
۸	OPB5	5′-TGCGCCCTTC-3′	۷۰	-
۹	OPB6	5′-TGCTCTGCCC-3′	۷۰	-
۱۰	OPB7	5′-GGTGACGCAG-3′	۷۰	-



شکل۲- نمونه از الگوی باندینگ ۶ پرایمر در جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در ایستگاه‌های بالا دست (سمت راست) و پایین دست سد (سمت چپ) شهید رجایی

جدول ۲- نتایج بررسی تنوع ژنتیکی برای همه باندهای چند شکل (loci) در جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در ایستگاه‌های بالادست و پایین دست سد شهید رجایی

فاکتور	بالا دست سد (ایستگاه اول)	پایین دست سد(ایستگاه دوم)
تعداد الل های مشاهده (na)	۱/۹۴	۱/۹۵
تعداد الل های موثر (Ne)	۱/۵۹	۱/۶۹
تنوع ژنی Nei(1973) (H)	۰/۳۴	۰/۳۸
شاخص اطلاعاتی شانن (I)	۰/۵۱	۰/۵۵
درصد پلی مورفیسم	۹۴/۳۸	۹۵/۵۱

www.SID.ir

Archive of SID

رسم دندروگرام UPGMA[11] بر اساس ضریب جاکارت (j) نشان داد که دو جمعیت سیاه ماهی رودخانه تجن در دو ایستگاه بالا دست و پایین دست سد شهید رجایی از یکدیگر متمایز شده‌اند (شکل ٣). ضریب همبستگی برای آنالیزهای صورت گرفته برابر ٠/٧ و میزان P برابر ١ بود که نشان دهنده آن است که اختلاف‌های مشاهده شده ١٠٠ درصد معنی‌دار است (Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000). (نمونه‌های ١-٣٥ مربوط به‌ایستگاه بالا دست و نمونه‌های ٣٦-٦٦ مربوط به‌ایستگاه پایین دست است). حداکثر فاصله ژنتیکی برای دو جمعیت سیاه ماهی رودخانه تجن ٧٣/٨٢ درصد و کمترین آن ١۴/۵۵درصد و در مجموع به طور میانگین ۴٨/٧٧ درصد محاسبه شد. این فواصل از روی ماتریکس تشابه بر اساس ضریب جاکارت محاسبه شد و از آنجاکه حد بالا و پایین، اختلاف ۵٠ درصدی معیاری برای تشخیص گونه و زیر گونه است (Gharaei *et al.*, 2005)، با توجه به نتیجه میانگین فاصله ژنتیکی تمام افراد جمعیت، می‌توان بیان نمود که‌این دو جمعیت تا حد بسیار بالایی از یکدیگر متمایز شده‌اند. نتایج بدست آمده از آنالیز مولفه‌های اصلی مختصات (PCOA) نیز نشان داد که دو جمعیت سیاه ماهی در دو ایستگاه بالا دست و پایین دست سد شهید رجایی از یکدیگر متمایز است (شکل۴).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه ماهیان در اکوسیستم‌های آبی از نظر تکاملی، بوم شناسی، رفتار شناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی، بهره برداری از ذخایر و پرورش آنها حائز اهمیت است (Mostafavi, 2005). به منظور مدیریت منطقی و کارآمد شیلاتی، شناسایی ساختار ذخیره‌ای گونه‌ای از ماهی که مورد بهره برداری قرار می گیرد، اهمیت بسزایی دارد چرا که هر ذخیره باید به طور جداگانه مدیریت شود تا بهره برداری از آن گونه در حد بهینه قرار گیرد (Tzeng, 2004؛ Akbarzadeh *et al.*, 2007 ؛ Erguden & Turan, 2005).

اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه‌های بومی، مورد مطالعه قرار گرفته و اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژاد ها است، که‌این امر از نظر مدیریت شیلاتی و برنامه ریزی های حفاظتی گونه‌ها حائز اهمیت است (Coad, 1980).

احتمالا از دلایل اصلی جدایی جمعیت‌های سیاه ماهی در رودخانه تجن ساری به علت جدایی جغرافیایی این گونه (در اثر ساخت سد) است به طوریکه Turan و همکاران (2004) چنین نظریه‌ای را در جداسازی ماهیان کفال (*Liza abu* (Heckel, 1834) در دریای سیاه، اژه و مدیترانه و نیز Khara (2008) برای جداسازی جمعیت‌های سیم(*Abramis brama orientalis*) تالاب انزلی، دریای خزر، جمهوری آذربایجان و دریاچه سد ارس عنوان نمودند. حال که این دو جمعیت بالا دست و پایین دست از نظر مولکولی از یکدیگر جدا شده است، فاصله زمانی ١٠-١۵ سال برای این امر کفایت می‌کند؟ به طور کل ماهیان در مقایسه با سایر مهره داران حساسیت بیشتری نسبت به تغییرات ناشی از محیط دارند و بیشتر دچار تغییرات درون و بین گونه‌ای می‌شوند (Smith, 1966؛ Lindsey, 1998؛ Turan, 2000؛ Turan., et al., 2004, 2006). از طرف دیگر شرایط محیطی متفاوت (دما، کدورت، دسترسی به غذا، عمق آب و جریان آب) سبب جدایی جمعیت‌های ماهیان از یکدیگر می‌شود (Samaee et al., 2006؛ Yamamoto et al., 2007). شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در رودخانه‌های مختلف به دلیل جدایی جغرافیایی و نداشتن ارتباط از یکدیگر متمایز شده‌است (Bianco & Banarescu, 1982؛ Samaee et al., 2006؛ Samaee et al., 2009).

Yamamoto و همکاران در سال ٢٠٠۶ با استفاده از مارکر ریز ماهواره اثبات نمودند ساخت سد (کوچک) با قدمت ٢٠ سال توانست جمعیت‌های ماهی آزاد (*Salvelinus leucomaenis*) را از یکدیگر متمایز نماید. همچنین Dakin و همکاران در سال ٢٠٠٧ با استفاده از

١- Unweighted Pair-Group using Arhimetic Average

www.SID.ir

Archive of SID

مارکر ریز ماهواره اثبات نمودند ساخت سد جمعیت‌های ماهی باس(*Micropterus cataractae*) را از یکدیگر متمایز نمود. Jager و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ بیان نمودند که ساخت سد سبب جدایی جمعیتی استروژن سفید (*Acipenser transmontanus*) شده است. در این مطالعه برای بررسی تنوع و تمایز سیاه ماهیان از مارکر RAPD استفاده شد. این سوال نیز مطرح است، که آیا مارکر RAPD می‌تواند جمعیت‌ها را از یکدیگر متمایز نماید؟ در این بررسی به علت عدم وجود اطلاعات کافی از توالی اولیه DNA سیاه ماهی، از مارکر RAPD استفاده شد. مولفان زیادی عنوان کردند که تکنیک RAPD بیش از تکنیک های دیگر می‌تواند جمعیت‌های ماهی را به زیر گونه، نژاد و حتی جمعیت‌های مشابه ماهی متمایز کند (Mamuris, 1998, 1999; Gomes, 1998). Bardakci و Skibinski (1994) بیان کردند که تکنیک RAPD بسیار حساس تر از آنالیز های دیگر مرتبط با mtDNA در مطالعات درون جمعیتی است. Gharaei و همکاران (2005) نیز با استفاده از این مارکر بیان نمودند که تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) دو گونه مجزا از یکدیگر می باشند.

در این مطالعه فاصله ژنتیکی از روی ماتریکس تشابه بر اساس ضریب جاکارت به طور میانگین ۴۸/۷۷ درصد به‌دست آمد که عدد بسیار بالایی است و از آنجا که حد بالا و پایین، اختلاف ۵۰ درصدی، معیار تشخیص گونه و زیر گونه است (Gharaei *et al.*, 2005) می‌توان بیان نمود که‌این دو جمعیت تا حد بسیار بالایی از یکدیگر متمایز شده‌اند. در رسم پراکنش افراد جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس آنالیز PCOA، دو جمعیت سیاه ماهی از یکدیگر متمایز است. با توجه به مرور منابع صورت گرفته، معمولا رسم دندروگرام UPGMA در مطالعات ژنتیکی جواب نهایی به اثبات وجود و یا عدم وجود تمایز در جمعیت‌ها است (Rehnuma *et al.*, 2003 ؛ Alam & Khan, 2001 ؛ Lakra *et al.*, 2007 ؛ Brahmane *et al.*, 2006 ؛ Rahman *et al.*, 2009 ؛ Brahmane *et al.*, 2008). با توجه به این‌که در این بررسی دو جمعیت وجود دارد، بهتر است که دندروگرام تمام افراد جمعیت رسم شود (Rehnuma *et al.*, 2003). در این مطالعه دندروگرام UPGMA بر اساس ضریب جاکارت رسم شد (El-Zaeem *et al.*, 2006). مطابق دندروگرام UPGMA، تمام افراد ایستگاه پایین دست در یک کلاستر و تمام افراد ایستگاه بالا دست به جز دو نمونه در کلاستر دیگر حضور دارد بنابراین با توجه به نتایج آنالیز PCOA و آنالیز کلاستر می‌توان ادعا نمود که مارکر RAPD می تواند این دو جمعیت را با درصد شباهت بالا از یکدیگر جدا نماید.

میزان جریان ژنی (Nm) به‌دست آمده در این مطالعه عدد به نسبه بالایی است. این مقدار جریان ژنی نشان دهنده تبادل ژنتیکی این دو جمعیت است. با این وجود این دو جمعیت به دلیل حضور سد، هیچ گونه آمیزشی با یکدیگر ندارند. بنابراین متمایز دو جمعیت و مقدار بالای تبادل ژنی، مربوط به طول عمر سد (۱۰-۱۵سال) است. به عبارت دیگر جریان ژنی شناسایی‌ی شده مربوط به زمانی است که‌این دو جمعیت یکی بودند (یعنی زمان قبل از احداث سد). به بیان ساده تر این دو جمعیت با وجود تبادل ژنی بالا، با توجه به نتایج آنالیز PCOA، مقدار فاصله ژنتیکی و رسم دندروگرام UPGMA از یکدیگر متمایز شده‌اند و این مقدار تبادل ژنی مشاهده شده مربوط به زمان قبل از احداث سد است و سد شهید رجایی توانسته‌این دو جمعیت را از یکدیگر ایزوله نماید. با مقایسه مقدار تنوع ژنی (N) Nei(1973) و شاخص اطلاعاتی شانن (I) در جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در ایستگاه‌های بالا دست و پایین دست سد شهید رجایی در رود تجن این نتیجه حاصل می شود که در جمعیت دوم مقدار تنوع بالا تر است زیرا این دو شاخص در جمعیت دوم مقدار بالا تری را به خود اختصاص داده و این به دلیل شرایط متغییری است که به سبب ساخت سد، ایستگاه دوم نسبت به‌ایستگاه اول دارد.

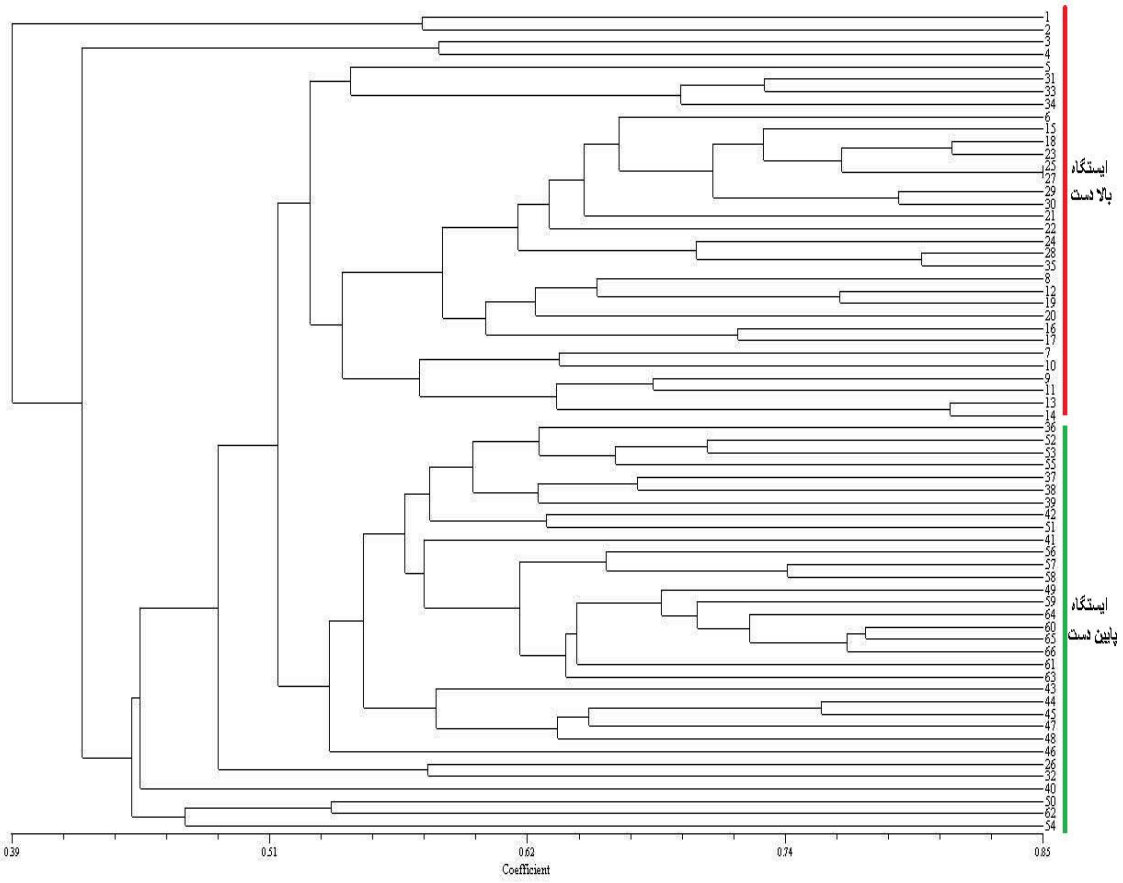
مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان دریای خزر نشان-دهنده این واقعیت است که بسیاری از ماهیان روند گونه زایی را طی نموده و میکروپروسه ایجاد جمعیت‌ها، همچنان ادامه دارد به طوری‌که گونه‌های خزری و دریای سیاه-

www.SID.ir

Archive of SID

خزری، زیر گونه‌ها و جمعیت‌هایی را در مناطق مختلف دریای خزر تشکیل داده‌اند (Gholiev, 1997; Kazancheev, 1981). تحقیق حاضر برای نخستین بار است که اثر سد را با استفاده از روش ژنتیکی در ایران مورد بررسی قرار می‌دهد. در مجموع نتایج بدست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در ایستگاه‌های بالا دست و پایین دست سد شهید رجایی در رود تجن از یکدیگر متمایز می باشند و انگشت نگاری RAPD روشی مناسب برای تعیین تمایز ژنتیکی سیاه ماهی است.

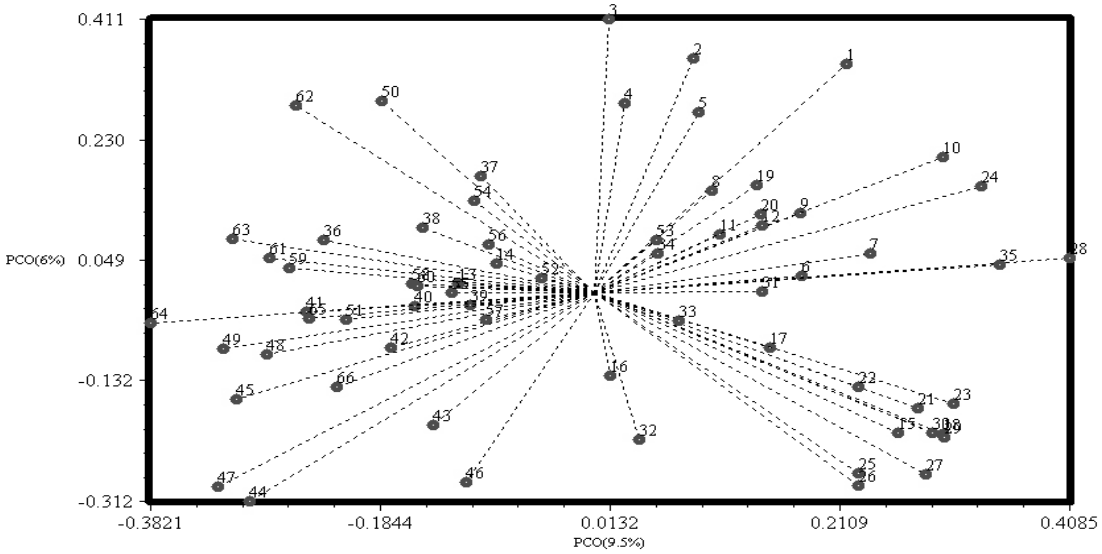
با توجه به‌اینکه در این بررسی جدایی جمعیتی این گونه از لحاظ ژنتیکی توسط مارکر RAPD به اثبات رسید، پیشنهاد می‌شود که مطالعات ژنتیکی دیگری با استفاده از مارکر های دیگر مانند Microsatellite و RFLP صورت گیرد تا بتوان با قطعیت بیشتر، جدایی جمعیتی این ماهی را بیان نمود. همچنین با توجه به نتایج این مطالعه بر سیاه ماهی به عنوان یک مدل اکولوژیک، یک سری راهکار های مدیریتی مانند ایجاد گذرگاه ماهی یا ساخت آسانسور پیشنهاد می‌شود تا بتوان جریان ژنی را در بالا دست و پایین دست سدها برقرار نمود.



شکل ٣- دندروگرام UPGMA حاصل از آنالیز RAPD برای جمعیت‌های سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* در هر دو ایستگاه بالا دست و پایین دست سد شهید رجایی در رودخانه تجن ساری

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- نمودار پراکنش سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* رودخانه تجن ساری در دو ایستگاه بالا دست (نمونه‌های ۳۵-۱) و پایین دست (نمونه‌های ۶۶-۳۶) سد شهید رجایی بر اساس نتایج بدست آمده از آنالیز مولفه‌های اصلی مختصات (PCOA)

منابع

- Akbarzadeh, A., Karami, M., Nezami, S.A., Igdari, S., Bakhtiyari M. and Khara, H., 2007. Analysis of Population Structure of Pikeperch (*Sander lucioperca*), in Iranian Waters of Caspian Sea and Anzali wetland using Truss System. Journal of the Iranian Natural Res. 60, 127–139. [in Farsi].
- Alam, M.D.S. and khan, M.R., 2001. Intraspecific genetic Variation in the Japanese Loach(*Misgurnus anguillicaudatus*) Revealed by Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Pakistan J. of Biological scences 4, 877–880.
- Anvarifar, H. and Farahmand, H., 2009. Use of RAPD Fingerprinting for Identification Discriminating Between Both Population and Species of Fishes. The First Students Congress of Fishery, Agriculture University of Sari, 20 may 2009. [in Farsi].
- AnvariFar, H., 2010. The Influence of Shahid-Rajaei Dam Construction on the Genetic and Morphometric Structure of *Capoeta capoeta gracilis* (Keyserling, 1861) in Tajan River, Iran. M.Sc. thesis, Supervisors:Farahmand, H. and Nematollahi, M.A., Advisor: Rahmani, H. and Karami, M., Fisheries and Environmental Sciences group, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. [in Farsi].
- Bardakci, F. and Skibinski, D.O.F., 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity 73, 117–123.
- Bianco, P.G., Banarescu, P., 1982. A contribution to the knowledge of the Cyprinidae of Iran (Pisces, Cypriniformes). Cybium 6, 75–96.
- Brahmane, M.P., Das, M.K., Sinha, M.R., Sugunan, V.V., Mukherjee, A., Singh, S.N., Prakash, S., Maurye, P. and Hajra, A., 2006. Use of RAPD fingerprinting for delineating populations of hilsa shad *Tenualosa ilisha* (Hamilton 1822). Genet Mol Res 31,643–652.
- Brahmane, M.P., Mitra, K. and Mishra, S.S., 2008. RAPD fingerprinting of the ornamental fish *Badis badis* (Hamilton 1822) and Dario dario (Kullander and Britz 2002) (Perciformes, Badidae) from West Bengal, India. *Genetics and Molecular Biology* 31, 789–792.
- Coad, B.W., 1980. Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological conservation 10, 51–80.
- Craig, J.F., 2001. Large Dams and Freshwater Fish Biodiversity. World Commission on Dams, 59 pp.
- Dakin, E.E., Porter, B.A., Freeman, B.J. and Long, J.M., 2007. Genetic integrity of an isolated population of shoal bass (*Micropterus cataractae*) in the upper Chattahoochee River basin. Natural Resource Technical

www.SID.ir

Archive of SID

Report NPS/NRWRD/NRTR–2007/366. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado.

- Dynesius, M. and Nilsson, C., 1994. Fragmentation and flow regulation of river systems in the northern third of the world. Science (Washington D.C.) 266, 753–762.

- El-Zaeem, S.Y., Bahy, A.A., and Mohamed, M.M.A., 2006. Random Amplified Polymorphic DNA Finger Print and Genetic Similarity among Four Genera and Between Two Phenotypes of Cultured Carps in Egypt. *Int. J. Agri. Biol. 8,* 111–115.

- Erguden, D. and Turan, C., 2005. Examination of genetic and morphological structure of Sea-Bass (*Dicentrarchus labrax* L. ,1785) populations in Turkish Coastal waters. Turkish Journal of Vertebrate Animal Sciences, 29, 727–733.

- Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E. and Chourrout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5, 295–298.

- Gertsev, V.I. and Gertseva, V.V. 1999. A model of sturgeon distribution under a dam of a hydro-electric power plant. *Ecological Modelling* 119, 21–28.

- Gharaei, A., Pourkazemi, M., Rezvani, S. and Mojazi-Amiri, B., 2005. Genetic difference and resemblance between *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstadtii* by means of RAPD technique. Iranian science fisheries journal 14, 91–102. [in Farsi].

- Gholiev, F., 1997. Cypriniformes and Perciformes in Caspian Sea. (Translated by Adeli, Y.) Iranian Fisheries Research and Training Organization. 61 pp. [in Farsi].

- Gomes, C., Dales, R.B.G. and Oxenford, H.A., 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flying fish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. Mol. Ecol., 7, 1029–1039.

- Jager H.I., Chandler J.A., Lepla K.B. & Winkle W.V. 2001. A theoretical study of river fragmentation by dams and its effect on white sturgeon populations. Environ. Biol. Fish 60,347–361.

- Kazancheev, E.N. 1981. The fishes of Caspian Sea. Moscow, 166 pp. (Translated by Abolghasem Shariaty, Iranian Fisheries, Tehran). [in Farsi].

- Khara, H., Keivan, A., Porkazemi, M., Rezvani, S., Nezami, S.A., Ramin, M., Sarpanah, A. and Ghenatparast, A., 2008. Comparative study morphometric and Morphology of Abramis brama orientalis in Caspian Sea and Anzali wetland. The Journal of Applied Research in animals and fisheries, 73, 178–187. [in Farsi].

- Kumar, R., Singh, P.J., Nagpure, N.S., Kushwasha, B., Srivastava, S.K and Lakra, W.S., 2007. A non-invastive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. Indian journal of Experimental Biology 45, 992–997.

- Lakra, W.S., Goswami, M., Mohindra, V., Lal, K.K. and Punia, P., 2007. Molecular identification of five Indian sciaenids (pisces: perciformes, sciaenidae) using RAPD markers. Hydrobiologia 583, 359–363.

- Lindsey, C.C., 1988. Factors controlling meristic variation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology, vol. 11-B. Academic Press, San Diego, CA, pp. 197–274.

- Liu, Z.J. and Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1–37.

- Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Theodorou, A.J. and Triantaphyllidis, C., 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullet barbatus*). Mar. Biol. 132, 171–178.

- Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Panagiotaki, P., Theodorou, A.J., and Triantaphyllidis, C., 1999. Morphological variation between red mullet populations in Greece. Journal of Fish Biology 52, 107–117.

- Mazandaran Regional Water Company, 2001. Studies of environmental management plans ecosystems of Tajan river basin. The first part, Volume I and II. [in Farsi].

- McAllister, D.E., Craig, J.F., Davidson, N., Delany S. and Seddon, M., 2001. Biodiversity Impacts of Large Dams. Background Paper Nr. 1, Prepared for IUCN / UNEP / WCD, 47 pp.

- Mostafavi, H., 2005. Biodiversity in Talar river fishes. Environmental biology 40, 127–135. [in Farsi].

- Mostafavi, H. and Abdoli, A., 2005. A Preliminary Survey on Diet of *Capoeta capoeta gracilis* in Talar and Yasalegh Rivers from the Southern Basin of Caspian Sea. Environmental science 7, 53–62. [in Farsi].

www.SID.ir

Archive of SID

- Nazariha, M. and Alinezhad, S., 1999. Planning for improvement and decrease negative impacts of Shahid-Rajaei dam. Environmental biology 30, 9–18. [in Farsi].
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70,3321–3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distances from small number of individuals. Genetics 89,583–590.
- Poddubny, AG. and Galat, D.L, 1995. Habatat associations of upper Volga River fishes: effects of reservoirs. *Regulated Rivers: Research and Management* 11, 67–84.
- Rahman, Z.S.M., Khan, M.R., Islam, M.D.S. and Alam, M.D.S., 2009. Genetic variation of wild and hatchery populations of the catla Indian major carp (*Catla catla* Hamilton 1822: Cypriniformes, Cyprinidae) revealed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology. 32,197–201.
- Rehnuma, S., Anwara, B. and Hassena, K., 2003. Use of RAPD fingerprinting for discriminating two population of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha* Ham.) from inland Rivers of Bangladesh. Journal of Biochem. Mol. Bio. 36, 462–467.
- Saeidi, M., Karbasi, A.R., Nabi Bid-hendi, G.R. and Mehrdadi, N., 2007. Impacts of human activities on accumulation of heavy metals in Tajan river water on Mazandaran province. Environmental biology 40, 41–50. [in Farsi].
- Samaee, S.M.R., B. Mojazi-Amiri and S. M., Hosseini-Mazinani, 2006. Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. Folia Zool. 55, 323–335.
- Samaee, M., Patzner, R.A. and Mansour, N., 2009. Morphological differentiation within the population of Siah Mahi, *Capoeta capoeta gracilis*, (Cyprinidae, Teleostei) in a river of the south Caspian Sea basin: a pilot study. J. Appl. Ichthyol. 25, 583–590.
- Smith, G.R., 1966. Distribution and evolution of the North American catostomid fishes of the subgenus Pantosteus, genus Castostomus, *Miscellaneous ublications*. Museum of Zoology, University of Michigan,p. 129.
- Tudela, S., 1999. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. Fisheries Research 42, 229-243.
- Turan, C., 2000. Otolith shape and meristic analysis of Herring (*Clupea harengus*) in the northeast Atlantic. Arch. Fish. Mar. Res. 48, 283–295.
- Turan, C. and ErgÜden, D., 2004. Genetic and morphometric structure of *Liza abu* (Heckel, 1834) population from the Rivers Orontes, Euphrates and Tigris. Turk J. Vet. Anim. Sci. 28, 729–734.
- Turan, C., Oral, ztu¨rk, B.O. and Du¨zgu¨nes, E., 2006. Morphometric and meristic variation between stocks of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and northeastern Mediterranean Seas. Fisheries Research 79,139–147.
- Turan, C., 2008. Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species compolex inferred from mitochondrial 16s rDNA sequence data. Acta zoological, 51, 1–14.
- Tzeng, T.D., 2004. Morphological variation between populations of spotted mackerel *Scomber australasicus* off Taiwan. *Fisheries Research*. Vol. 68: 45- 55.
- Valipor, A.R., 2003. Feeding investigation of *Capoeta capoeta* in reservoirs of Maco dam. Iranian science fisheries journal 2, 163–176. [in Farsi].
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuchi, R., 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnique* 10,506–513.
- Welsh, J. and McClenlland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18, 7213–7218.
- Williams, J.G.K., Kuvelik, A.R., Livak, K.j., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18, 6531–6535.
- Yamamotoa, S., Maekawa, K., Tamate, T., Koizumi, I., Hasegawa, K., Kubota, H., 2006. Genetic evaluation of translocation in artificially isolated populations of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). Fisheries Research 78, 352–358.

www.SID.ir