

تنوع و تمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری

دریای خزر (*Clupeonella cultriventris* Nordmann, 1840) سواحل جنوبی دریای خزر

مهرنوش نوروژی^{(۱)*}؛ علی ناظمی^(۲)؛ محمد پور کاظمی^(۳)؛ محمد هادی سمیعی^(۴)؛ فاطمه دانشور^(۵)

و آمنه امیر جنتی^(۶)

mnoroozi@toniau.ac.ir

۱، ۴، ۵، ۶- گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دامن، رشت، صندوق پستی: ۴۶۶۴-۱۶۳۵

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۱

چکیده

تعداد ۱۲۰ نمونه ماهی بالغ کیلکای معمولی خزری (*Clupeonella cultriventris*)، در فصول بهار و تابستان از حوضه جنوبی دریای خزر (بندر انزلی و بابلسر) جمع‌آوری گردید. از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای شگ ماهیان روی DNA ژنومی ماهی کیلکا استفاده گردید. سپس فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، شاخص‌های R_{ST} و F_{IS} محاسبه شد. پنج جفت از پرایمرها جایگاه‌های چند شکلی تولید کردند که از آنها برای آنالیز تنوع ژنتیکی ماهیان بالغ کیلکای معمولی استفاده گردید. میانگین آللی در جایگاه‌ها ۱۳/۱ (دامنه آللی ۵ تا ۲۲ آلل در جایگاه‌ها، $N_e=9/5$) بود. تمامی مناطق و فصول نمونه‌برداری دارای آللهای اختصاصی بودند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار بترتیب ۰/۳۴۸ و ۰/۸۷۷ بدست آمد. انحراف از تعادل هاردی وینبرگ در بیشتر موارد دیده شد. براساس تست AMOVA در بررسی شاخص‌های R_{ST} و F_{ST} و جریان ژنی و همچنین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، نشان از وجود جمعیت‌های مجزا می‌باشد. مطالعه حاضر، اطلاعات اولیه ای در خصوص تنوع و تمایز ژنتیکی در جمعیت‌های ماهی کیلکای معمولی در فصول و دو منطقه مختلف دریای خزر نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: ژنتیک جمعیت، میکروستلایت، شگ ماهیان

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه، ذخایر کیلکا ماهیان دریای خزر به میزان محسوسی بر اثر صید بی‌رویه، افزایش آلودگی، ورود مهاجم شانه‌دار به دریای خزر و تغییرات محیطی این دریا کاهش یافته‌اند (Velikova et al., 2012). آگاهی از ویژگی‌های ساختار جمعیت ماهی کیلکای معمولی موجب درک بهتر اثرات عوامل تهدید کننده آن است و بینش جدیدی در مورد نگهداری و مدیریت کارآمد ذخایر کیلکا ماهیان ارائه می‌دهد.

بطور کلی ماهیان پلاژیک غالباً تمایز ژنتیکی کمی در مناطق مختلف جغرافیایی نشان می‌دهند که ناشی از نبودن موانع فیزیکی و مبادله ژنتیکی بالا و همچنین ویژگی‌های بیولوژیک مانند اندازه بزرگ جمعیت و دوره زندگی پلانکتونیک در مراحل اولیه زندگی است (Liu et al., 2006; Zhan et al., 2009). در میان مارکرهای مولکولی، مارکرهای میکروستلایت یکی از بهترین روش‌های شناسایی ساختار جمعیت در ماهیان پلاژیک می‌باشند. زیرا آنها به فراوانی در طول ژنوم پراکنده‌اند، سطوح بالایی از پلی مورفیسم را نشان می‌دهند و براحتی با واکنش PCR تکثیر می‌شوند (Sekar et al., 2009). همچنین از مارکرهای میکروستلایت طراحی شده برای یک گونه، می‌توان در گونه‌های نزدیک و خویشاوند، اغلب با موفقیت استفاده کرد (Chistiakov et al., 2005).

پیشتر، مطالعات مولکولی زیادی روی خانواده شگ ماهیان با استفاده از مارکرهای میکروستلایت انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به ماهی هرینگ اقیانوس اطلس (Shaw et al., 2001; McPherson et al., 1999)، ساردین (Gonzalez & Pereyra et al., 2007; Zardoya, 2007)، ساردین اقیانوس آرام (Miller et al., 2001, 2004)، هرینگ اقیانوس آرام (Semenova et al., 2012) و شاد آمریکایی (Barton, 2007) اشاره نمود. مطالعه حاضر، با استفاده از جایگاه‌های میکروستلایتی به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی حوضه جنوبی دریای خزر در فصول مختلف می‌پردازد. از آنجاییکه فصل، بعنوان یک فاکتور مهم در ترکیب جمعیت خانواده شگ ماهیان است (Maes et al., 2004)؛ این فرضیات در نظر گرفته شد که این ماهی دارای جمعیت‌های مختلف در فصول متفاوت است و فراوانی ژنوتیپی و آلی هر یک از جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت است. نمونه‌برداری از دو فصل مختلف در بندر انزلی و 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.

مواد و روش کار

نمونه برداری از بندر انزلی (37° 29' N, 49° 17' E) و بابلسر (36°42' N, 52°39' E) در دو فصل بهار و تابستان و در هر فصل ۳۰ نمونه (در مجموع ۱۲۰ نمونه)، از قسمت باله ی دمی ماهی کیلکای معمولی انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶ درصد فیکس گردید و در نهایت به آزمایشگاه ژنتیک انتقال یافت و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد، تا شروع مرحله‌ی استخراج نگهداری شدند. استخراج DNA از بافت باله‌ی دمی ماهی کیلکای معمولی با استفاده از کیت (شرکت روچ آلمان، کد ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱) انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

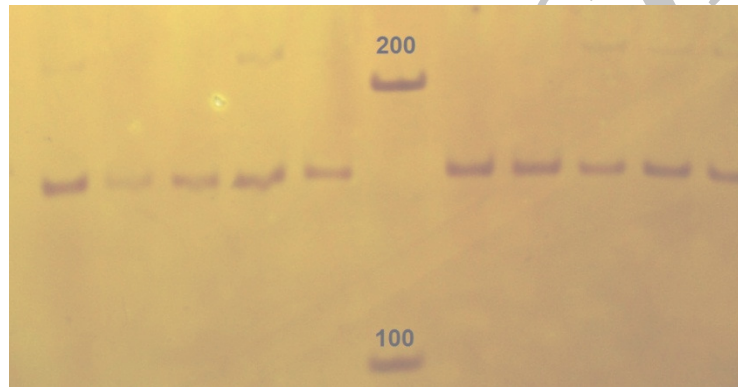
برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی از ۱۵ جفت پرایمر میکرو ستلایت طراحی شده برای جنسهای *Alosa* شامل پرایمرهای (Julian; AsaC051, 059, 249, 334) و *Clupea* شامل پرایمرهای (Cpa6, 8, & Barton, 2007)، (Miller; 100, 104, 107, 120, 134, 125) و همکاران، ۲۰۰۱؛ (McPherson et al., 2001, 1235, 1014) و ساردین (SAR1.12, Gonzalez & Zardoya, 2007a) استفاده گردید (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs ۰/۲ میلی مولار؛ پرایمر ۰/۲ تا ۰/۴ میکرولیتر؛ DNA، ۲۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی مرزهاست استارت ۰/۴ - ۰/۳ واحد، PCR بافر ۱ x؛ 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 زنجیره‌ای پلیمرز بترتیب مرحله جدا سازی ۹۴-۹۵ 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، مرحله بسط پرایمر ۷۲- ۷۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه و ۳۵ تا ۳۸ چرخه بهینه سازی گردید. محصول PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت. سپس تصویر ژلها با استفاده از نرم افزار Uvitec

مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری شامل: فراوانی آللی، تعداد آللی (Na) و تعداد آللهای موثر (Ne) در جایگاههای میکروستلایتی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، مقادیر R_{ST} ، F_{IS} و F_{ST} ، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی براساس Nei (1972) و تعادل هاردی وینبرگ براساس X^2 ، در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار GeneAlex (Peakall & Smouse, 2006) انجام شد. همچنین تمایز ژنتیکی بر اساس تست AMOVA (Analysis of Molecular Variance) و غنی سازی آللی (Allelic Richment) (Arlequin 3.5) (Excoffier & Lischer, 2005) با استفاده از ۱۰۰۰۰ شبیه سازی در هر مورد نیز محاسبه گردید.

میانگین تعداد آلل واقعی و موثر بترتیب ۱۳/۱ و ۹/۵ و دامنه آللی از ۵ تا ۲۲ آلل بدست آمد. دامنه آللی در جایگاه Cpa104 از ۱۵ تا ۱۷ آلل ($A_R = 25/5$)، Cpa6 از ۱۳ تا ۱۸ آلل ($A_R = 27/8$) تا ۱۰ تا ۲۲ آلل ($A_R = 20/1$)، Cpa125 از ۱۰ تا ۱۷ آلل ($A_R = 21/5$)، AcaC051 از ۵ تا ۷ آلل ($A_R = 7/1$) و کاهش آن در نمونههای بابلسر (بهار و تابستان) مشاهده گردید (جدول ۲). مجموعاً ۲۳ آلل اختصاصی یافت شد. تعداد آلل اختصاصی در نمونههای بهار و تابستان انزلی ۳ و ۴ آلل و بهار و تابستان بابلسر ۷ و ۹ آلل بود که این آللهای در هیچ یک از دیگر فصول و مناطق نمونه برداری شناسایی نشد.



شکل ۱: محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی کیلکای معمولی با استفاده از پرایمر AsaC051

جدول ۱: نام جایگاه، توالی تکراری، اندازه باندی (جفت باز)، شماره بانک ژنی و دمای اتصال به همراه تعداد چرخه در ماهی کیلکای معمولی

منبع	توالی تکراری	شماره بانک ژ	اندازه باندی (جفت باز)	دمای اتصال و تعداد چرخه (درجه سانتیگراد)	جایگاه
Miller et al. (2001)	(GATA)14	F309801	۱۰۴-۲۹۱	۴۰/۵۲	Cpa6
	(GACA)27	F309804	۱۰۴-۲۱۶	۴۰/۵۲	Cpa8
	(TG)54	F309791	۳۱۲-۴۰۲	۴۰/۵۱/۵	Cpa104
	(GA)32i(GT)26	F309796	۲۱۶-۲۸۰	۴۰/۵۹	Cpa125
ilian & Barton, 2007	AAAT)7(GTAT)13	F014992	۱۵۶-۱۸۴	۴۰/۵۴	AsaC051

نتایج

بدست آمده از ۱۰۴ تا ۴۰۲ جفت باز بود (جدول ۱). در کل ۱۳۳ آلل در ۱۲۰ نمونه شناسایی شد. در نمونه های بهار انزلی ۳۵ آلل، تابستان انزلی ۳۲ آلل، بهار بابلسر ۳۵ آلل و تابستان بابلسر ۳۶ آلل در فراوانی بیشتر از ۰/۰۵ شناسایی گردید. جایگاه AsaC051 بیشترین میزان فراوانی آللی را از ۰/۰۶۷ تا ۰/۳۶۷ نشان داد.

در این مطالعه از ۱۵ جایگاه مورد بررسی فقط پنج جایگاه در PCR تکثیر شدند و پلی مورف بودند (Cpa4, Cpa8, Cpa104, Cpa125, AcaC051). در هنگام شمارش الگوی بانندی در تمامی جایگاهها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است (شکل ۱). اندازه آللی

جدول ۲: تنوع ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه ماهی کیلکای معمولی خزری که در آن تعداد نمونه، تعداد آللی (Na)، تعداد آلل موثر (Ne)، غنی سازی آللی (AR)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He)، ضریب خویشاوندی (F_{IS}), انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ (HW معنی دار نیست، ns ؛ **** P < ۰/۰۰۱ ؛ *** P < ۰/۰۱ ؛ ** P < ۰/۰۵) در ۵ جایگاه میکروستلایت نشان داده شده است.

	انزلی		بابلسر		میانگین
	بهار	تابستان	بهار	تابستان	
تعداد نمونه/جایگاه	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	
Cpa6					
Na (Ne)	۱۸ (۱۲/۴)	۱۶ (۱۰/۱)	۱۴ (۹/۷)	۱۳ (۹/۷)	۱۵/۲
Ho (He)	۰/۲۶۷ (۰/۹۱۹)	۰/۴۰۰ (۰/۹۰۱)	۰/۹ (۰/۸۹۷)	۰/۹۶۷ (۰/۸۹۷)	۰/۶۳۳ (۰/۹۰۴)
A _R	۱۸	۱۶	۱۴	۱۳	۲۷/۸
Fis (Signif _{HW})	*** ۰/۷۱۰	*** ۰/۵۵۶	* -۰/۰۰۳	* -۰/۰۷۷	۰/۲۹۹
Cpa8					
Na (Ne)	۱۶ (۱۱/۶۵)	۲۲ (۱۷/۸)	۱۰ (۷/۲)	۱۳ (۹/۸۹)	۱۵/۲
Ho (He)	۰/۲ (۰/۹۱۳)	۰/۲ (۰/۹۴۴)	۰/۷ (۰/۸۲۶)	۰/۹ (۰/۸۹۹)	۰/۵ (۰/۹۰۴)
A _R	۱۶	۲۲	۱۰	۱۳	۲۰/۱
Fis (Signif _{HW})	*** ۰/۷۸۱	*** ۰/۷۸۸	* ۰/۱۸۸	ns - ۰/۰۰۱	۰/۴۴۷
Cpa104					
Na (Ne)	۱۷ (۱۱/۶)	۱۶ (۱۰/۲)	۱۵ (۱۲/۷)	۱۷ (۱۲/۳)	۱۶/۲
Ho (He)	۰/۱۳۳ (۰/۹۱۴)	۰/۰۶۷ (۰/۹۰۲)	۰/۲۰۰ (۰/۹۲۲)	۰/۱۶۷ (۰/۹۱۹)	۰/۱۴۲ (۰/۹۱۴)
A _R	۱۷	۱۶	۱۵	۱۷	۲۵/۵
Fis (Signif _{HW})	*** ۰/۸۵۴	*** ۰/۹۲۶	*** ۰/۷۸۳	*** ۰/۸۱۹	۰/۸۴۵
Cpa125					
Na (Ne)	۱۰ (۷/۷)	۱۷ (۱۳/۵)	۱۱ (۶/۵)	۱۴ (۹/۰۴۵)	۱۳
Ho (He)	۰/۰۶۷ (۰/۸۷۱)	۰/۲۰۰ (۰/۹۲۶)	۰/۴۶۷ (۰/۸۴۸)	۰/۳۶۷ (۰/۸۹۹)	۰/۲۷۵ (۰/۸۸۴)
A _R	۱۰	۱۷	۱۱	۱۴	۲۱/۵
Fis (Signif _{HW})	*** ۰/۹۲۳	*** ۰/۷۸۴	*** ۰/۴۵۰	*** ۰/۵۸۸	۰/۶۸۹
AsaC051					
Na (Ne)	۵ (۴/۲)	۶ (۵)	۶ (۴/۷)	۷ (۴)	۶
Ho (He)	۰ (۰/۷۶۲)	۰ (۰/۸۰۰)	۰/۳۰۰ (۰/۷۹)	۰/۴۶۷ (۰/۷۵۲)	۰/۱۹۲ (۰/۷۷۶)
A _R	۵	۶	۶	۷	۷/۱
Fis (Signif _{HW})	*** ۱	*** ۱	*** ۰/۶۲۱	* ۰/۳۸۰	۰/۷۵۳
تعداد کل آللی (فراوانی < ۰/۰۵)	۳۵	۳۲	۳۵	۳۶	
میانگین					
Na (Ne)	۱۳/۲ (۹/۵)	۱۵/۴ (۱۱/۳)	۱۱/۲ (۸/۲)	۱۲/۸ (۹)	۱۳/۱ (۹/۵)
Ho (He)	۰/۱۳۳ (۰/۸۷۶)	۰/۱۷۳ (۰/۸۹۵)	۰/۵۱۳ (۰/۸۶۴)	۰/۵۷۳ (۰/۸۷۱)	۰/۳۴۸ (۰/۸۷۷)
Fis	۰/۸۵۴	۰/۸۱۱	۰/۴۰۸	۰/۳۴۱	۰/۶۰۷ (±۰/۱)

مربوط به نمونه های جمع آوری شده از تابستان بابلسر می باشد. کمترین مقدار He، ۰/۷۵۲ در جایگاه Asac051 مربوط به نمونه های تابستان بابلسر و بیشترین آن، ۰/۹۴۴ در جایگاه Cpa8 در نمونه های تابستان بندر انزلی می باشد (جدول ۲). در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاهها خارج از

در این بررسی دامنه Ho در تمامی جایگاهها از صفر تا ۰/۹۶۷ با میانگین ۰/۳۴۸ و دامنه He از ۰/۷۵۲ تا ۰/۹۴۴ با میانگین ۰/۸۷۷ بود (جدول ۲). کمترین مقدار Ho، عدد صفر در جایگاه Asac051 در نمونه های جمع آوری شده از تابستان بندر انزلی بدست آمد و بیشترین مقدار ۰/۹۶۷ در جایگاه Cpa6

براساس فراوانی آلی دامنه F_{ST} از ۰/۰۱۹ تا ۰/۰۳۶ و جریان ژنی ۶/۶ تا ۱۳/۰۲ بدست آمد (جدول ۳)، که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می باشد (Balloux & Lugan, 2002). میزان F_{ST} ، R_{ST} و جریان ژنی براساس تست AMOVA، معنی دار بود ($P < 0.01$) و نشان دهنده جدا شدن جمعیت‌ها می‌باشد. در تمامی موارد میزان R_{ST} بین جفت جمعیت‌ها بالاتر از میزان F_{ST} بدست آمد. دامنه فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۲)، ۰/۴۳۰ تا ۰/۷۰۱ و دامنه شباهت ژنتیکی ۰/۳۵۵ تا ۰/۸۴۳ بدست آمد (جدول ۴).

تبادل بودند ($P \leq 0.01$). فقط در جایگاه Cpa8 در نمونه‌های تابستان بابلسر انحراف از تعادل دیده نشد (جدول ۲). در تمامی موارد انحراف از تعادل و کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به قابل انتظار بدست آمد. ضریب آمیزش خویشاوندی (F_{IS}) در تمامی جایگاه‌های میکروستلایتی مثبت بود و دامنه آن از ۰/۲۹۹ در جایگاه Cpa6 تا ۰/۸۴۵ در جایگاه Cpa104 با میانگین ۰/۶۰۷ محاسبه گردید (جدول ۲). مقادیر مثبت F_{IS} نشان دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Cpa6 با کمترین میزان F_{IS} بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاهها نشان داد.

جدول ۳: شخاص تمایز (F_{ST}) و جریان ژنی (Nm) ماهی کیلکای معمولی خزری در جمعیت‌های شناسایی شده

	F_{ST}				
	نمونه ها	بهار بندرانزلی	تابستان بندرانزلی	بهار بابلسر	تابستان بابلسر
Nm	بهار بندر انزلی	----	۰/۰۱۹	۰/۰۳۳	۰/۰۳۵
	تابستان بندر انزلی	۱۳/۰۲	----	۰/۰۳۵	۰/۰۳۶
	بهار بابلسر	۷/۴۳	۶/۹۳	----	۰/۰۳
	تابستان بابلسر	۶/۹۵	۶/۶۱	۷/۹۸	----

جدول ۴: شباهت و فاصله ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری در جمعیت‌های شناسایی شده

	شباهت ژنتیکی				
	نمونه ها	بهار بندر انزلی	تابستان بندر انزلی	بهار بابلسر	تابستان بابلسر
فاصله ژنتیکی	بهار بندر انزلی	----	۰/۷۰۱	۰/۵۴۰	۰/۵۰۱
	تابستان بندر انزلی	۰/۳۵۵	----	۰/۴۶۷	۰/۴۳۰
	بهار بابلسر	۰/۶۱۶	۰/۷۶۲	----	۰/۵۸۶
	تابستان بابلسر	۰/۶۹	۰/۸۴۳	۰/۵۳۴	----

بحث

ماهی هرینگ اقیانوس آرام، ماهی هرینگ اقیانوس اطلس و ژنومی ماهی کیلکای DNA ساردین طراحی شده بود، بر روی معمولی استفاده گردید. اما از کل پرایمرهای مورد استفاده فقط تکثیر شدند. با وجود اینکه PCR $\Delta 5$ جفت آن در میکروستلایت‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری

اگرچه مارکرهای میکروستلایت بعنوان ابزاری مهم در مدیریت شیلات و آبی‌پروری می‌باشد، کاربرد اطلاعات ژنتیک جمعیت در مدیریت ماهی کیلکای معمولی دریای خزر در مراحل اولیه است و اطلاعات کمی در مورد ساختار ژنتیک اهمیت بالای وجود جمعیت و زیر تقسیمات آن وجود دارد. با این مطالعات متأسفانه تاکنون پرایمر اختصاصی میکروستلایت برای این گونه طراحی نگردیده است. از اینرو در این بررسی از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت که برای ماهی شاد آمریکایی و

اطلس (۰/۶۵ تا ۰/۹۸، Shaw *et al.* 1999)، ساردین اقیانوس آرام (۰/۶۶۷ تا ۰/۹۶۷، Pereyra *et al.*, 2004؛ ۰/۵۲۲ تا ۰/۹۰۳، McPherson *et al.*, 2001)، هرینگ اقیانوس آرام (۰/۴۶ تا ۱، Miller *et al.*, 2001)، ساردین (۰/۷۷۲ تا ۰/۵۵۲، Julian & Barton, 2007، ۰/۹۰۳ تا ۰/۵۵۲)، میزان هتروزیگوسیتی در مطالعه حاضر پایین تر است. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار و ضریب آمیزش خویشاوندی مثبت، همگی نشان دهنده وجود تنگنای ژنتیکی و کاهش تنوع ژنتیکی است. احتمالاً تنگناهای ژنتیکی در این گونه، صید بی‌رویه و حمله شانه‌دار مهاجم است، که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می‌شود. شانه‌دار مهاجم دریای خزر به جهت میل شدید به تغذیه و تولید مثل بسیار سریع، رقیب اصلی غذایی ماهیان پلاژیک پلانکتون‌خوار محسوب می‌گردد. در این میان کیلکا ماهیان، بیشترین رقابت تغذیه‌ای را با این شانه‌داران دارند. با توجه به منبع غذایی مشترک بین این دو گونه، کاهش شدید جمعیت کیلکا ماهیان پس از تهاجم شانه‌دار مهاجم به خزر مشاهده شده است (غفارزاده و هنر بخش، ۱۳۸۶). از طرفی کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده (Shen & Gong, 2004) و در صورت تداوم وضع موجود این احتمال وجود دارد که شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود. البته کاهش هتروزیگوسیتی به علت نمونه‌برداری از افراد خویشاوند، ترکیب جمعیت‌ها (اثر وهلند) و وجود آلل‌های نول نیز می‌تواند باشد.

در بررسی حاضر روی ماهی کیلکای معمولی، هر دو فصل نمونه‌برداری تقریباً همه جایگاهها خارج از تعادل هاردی-وینبرگ بودند ($P \leq 0.001$). چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی وجود آلل‌های نول باشد که پهلوگیری در آنها صورت نمی‌پذیرد و بروز آن در توارث میکروستلایت در شگ ماهیان تایید شده است (Julian & Barton, 2007; Gonzalez & Zardoya, 2007; Miller *et al.*, 2001; Pereyra *et al.*, 2004). در بررسی حاضر به نظر می‌رسد، مهاجرت و اختلاط جمعیت‌ها و استفاده از پرایمرهای غیراختصاصی مهمترین عاملی است که سبب می‌گردد تعادل هاردی-وینبرگ برقرار نباشد.

میکروستلایت‌هاست که محل باند شدن با پرایمرها می‌باشد (Cui *et al.*, 2005).

تعداد آللی و هتروزیگوسیتی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیک جمعیت‌ها در مواجه شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankham, 2008) و ویژگی‌هایی مانند رقابت و توانایی برای بقای یک موجود در زیستگاههای طبیعی را تعیین می‌سازد (Hakansson & Jensen, 2005). در مقایسه دامنه آللی ماهی کیلکای معمولی با دیگر گونه‌های خانواده شگ ماهیان مانند ماهی هرینگ اقیانوس اطلس (۱۸ تا ۴۱ آلل، Shaw *et al.*, 1999)، ساردین اقیانوس آرام (۴ تا ۲۴ آلل، Pereyra *et al.*, 2004)، ساردین (۲۲ تا ۴۵ آلل، Gonzalez & Zardoya, 2007) و ماهی شاد آمریکایی (۸ تا ۳۲ آلل و میانگین ۱۵/۴ آلل، Julian & Barton, 2007)، در مطالعه حاضر، دامنه آللی (۵ تا ۲۲ آلل) و میانگین آللی (۱۴/۴) بدست آمد که در دامنه آللی سایر گونه‌های شگ ماهیان قرار دارد. اما در این مطالعه تعداد زیادی آلل با فراوانی پایین دیده شد. وجود آللهای زیاد با فراوانی پایین نشان‌دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon *et al.*, 2004). ممکن است علت آن، استرس وارده به جمعیت ناشی از صید بی‌رویه و صدمه خوردن به جمعیت‌های جوان کیلکا، ظهور و گسترش جمعیت شانه‌داران باشد که ذخایر این ماهیان را به شدت کاهش داده است (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۰؛ غفارزاده و هنر بخش، ۱۳۸۶).

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ بعنوان 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). در مقایسه میزان هتروزیگوسیتی دو منطقه، میزان آن در بابل‌سر بالاتر از انزلی بود (جدول ۲). تنوع ژنتیکی نسبتاً پایین، در ساختار جمعیت بویژه در نمونه‌های منطقه انزلی نشان‌دهنده تخریب ذخایر این ماهی باشد. نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۳۴۸±۰/۰۶۷) کمتر از مقدار اعلام شده (۰/۷۹±۰/۰۲۶) برای ماهیان دریایی در مطالعات سایر محققین است (DeWoody & Avis, 2000).

در مقایسه میزان هتروزیگوسیتی ماهی کیلکای معمولی با دیگر گونه‌های خانواده شگ ماهیان مانند ماهی هرینگ اقیانوس

۴ Wahlund effect

طول دهه اخیر اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را روشن می‌سازد. شناسایی ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی می‌تواند در صنعت شیلات و پیشبرد برنامه‌های مدیریتی آینده و حفاظت از ذخایر آن سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام پذیرفت. از تمامی همکاران گرامی در آزمایشگاه ژنتیک از جمله آقای مهندس اسکندری و آقای مهندس روایی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

اسماعیلی ساری، ع.؛ ابطحی، ب.؛ سیف آبادی، ج.؛ خدابنده، ص.؛ طلائی، ر.؛ درویشی، ف. و ارشاد، ه.، ۱۳۸۰. مهاجم شانه‌دار *Mnemiopsis leidyi* و آینده دریای خزر. نقش مهر. ۱۴۴ صفحه.

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

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

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 differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.

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

شاخص F_{ST} نشان‌دهنده درجه تمایز ژنتیکی است. درجه تمایز ژنتیکی کل (~ هتروزیگوسیتی) جداکننده جمعیت‌هاست. در این بررسی دامنه F_{ST} براساس فراوانی آللی نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux & Lugan, 2002). براساس تست AMOVA میزان F_{ST} و R_{ST} بین مناطق و فصول نمونه‌برداری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). از اینرو به نظر می‌رسد که جمعیت‌های مختلف ژنتیکی در فصول مختلف در مناطق نمونه‌برداری دارد. پایین بودن مقدار F_{ST} به علت پلی مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در میکروستلایت‌ها و مهاجرت این ماهی در مناطق مختلف دریای خزر است که بطور موثری میزان F_{ST} را کاهش می‌دهند (Balloux & Lugan, 2002). به طور کلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند 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 احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است و همچنین ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت (جریان ژنی بالا) در زیر جمعیت‌ها، موجب تمایز ژنتیکی پایین در جمعیت‌های این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thrope و Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جدایی جمعیت‌ها را بطور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۳ تا ۰/۶۱) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/۳۵۵ تا ۰/۸۴۳) و نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

آبزیان دریای خزر، تحت تاثیر فاکتورهای اکولوژیک متفاوت قرار دارند. شوری، نور، درجه حرارت و غلظت مواد غذایی از فاکتورهایی هستند که به صورت فصلی پراکنش آبزیان را در دریای خزر تحت تاثیر قرار می‌دهند. ترکیب گونه‌های فیتوپلانکتونی و زئوپلانکتونی در فصول مختلف متفاوت است. این احتمال وجود دارد که جمعیت ماهیان تغذیه کننده از این پلانکتونها نیز در فصول مختلف، متفاوت باشد. بررسی حاضر، مطالعه اولیه‌ای است بر وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی در فصول و مناطق مختلف که در دریای خزر زیست می‌کنند. وجود آللهای اختصاصی، F_{ST} و R_{ST} معنی‌دار در هر یک از جمعیت‌های شناسایی شده، تایید کننده وجود جمعیت‌های ژنتیکی متمایز در مناطق انزلی و بابلسر در فصول مختلف است. احتمال دارد که جمعیت‌های دیگری از این ماهی در دریای خزر وجود داشته باشد که نیازمند به مطالعه و بررسی بیشتری است. کاهش جمعیت‌های گونه کیلکای معمولی در

- 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.
- Dewoody J.A. and Avise J.C., 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Fish Biology, 56:461-473.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S., 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.
- Frankham R., 2008.** Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology, 17:325-333.
- Gonzalez E.G. and Zardoya R., 2007a.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the sardine *Sardina pilchardus* (Clupeiformes: Clupeidae). Molecular Ecology Notes, 7:519–521.
- Gonzalez E. 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: 1471-2148.
- 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.
- Hakansson J. and Jensen P., 2005.** Behavioral and morphological variation between captive populations of red jungle fowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation, 122:431-439.
- Liu JX., Gao TX., Zhuang ZM. and Jin XS., 2006.** Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). Molecular Phylogenetic Evolution, 40:712-723.
- Maes J., Van Damme S., Meire P. and Ollevier F., 2004.** Statistical modeling of seasonal and environmental influences on the population dynamics of an estuarine fish community. Marine Biology, 145:1033-1042.
- Miller K.M., Laberee K., Schulze A.D. and Kaukinen K.H., 2001.** Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasii*). Molecular Ecology Notes, 1:131-132.
- McPherson A.A., O'Reilly P.T., McParland T.L., Jones M.W. and Bentzen P., 2001.** Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*). Molecular Ecology Notes, 1:31-32.
- Nei, M. 1972.** Genetic distance between populations. American Naturalist, 106:283-292.
- Peakall R. and Smouse P.E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6:288-295.
- Pereyra R.T., Saillant E., Pruett Rexroad C.L., Rocha-Olivers C.E. and Gold G.R., 2004.** Characterization of polymorphic microsatellites in the Pacific sardine *Sardinops 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*, pp.27-29.
- Semenova A.V., Andreeva A.P., Stroganov A.N., Rubtsova G.A., Afanasiev K.I. and Markevich A.A., 2012.** Preliminary data on variation of four microsatellite loci in Pacific herring *Clupea pallasii*. *Russian Journal of Genetics*, 48:86-92.
- Shaklee J.B., Tamaru C.S. and Waples R.S., 1982.** Speciation and 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. *Oceanology and Limnology Science*, 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.
- Velikova V.N., Shaudanov A.K., Gasimov A., Korshenko A., Abdoli A., Morozov B., Katunin D.N., Mammadov E., Bokova E. B., Emadi H., Annachariyeva J., Isbekov K., Akhundov M., Milchakova N., Muradov O., Khodorevskaya R., Shahifar R., Shiganova T., Zarbaliyeva T. S., Mammadli T., Velikova V., Barale V. and Kim Y. 2012.** Review of the environment and bio resources in the Caspian Sea ecosystem 2000-2010. *CaspEco Report*, 423P.
- Waples R.S., 1987.** A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 41: 385- 400.
- Wright S., 1978.** *Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations.* The University of Chicago Press, Chicago.
- Zhan A., Hu J., Hu X. and Zhou Z., 2009.** Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Do local marine currents drive geographical differentiation?. *Marine Biotechnology*, 11:223-235.

**Genetic variability and differentiation of common Kilka fish
(*Clupeonella cultriventris* Nordmann, 1840) in the southern coasts
of Caspian Sea**

**Norouzi M.^{(1)*}; Nazemi A.⁽²⁾; Pourkazemi M.⁽³⁾; Samiei M.H.⁽⁴⁾; Daneshvar F.⁽⁵⁾
and Amirjanati A.⁽⁶⁾**

mnoroozi@toniau.ac.ir

1,4,5&6- Department of Marine Biology and Fisheries Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, P.O.Box: 1616 Tonekabon, Iran

2-Department of Biology Sciences, Islamic Azad University- Tonekabon Branch, P.O.Box: 1616 Tonekabon, Iran

3-International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran

Received: October 2012

Accepted: April 2013

Keywords: Population genetic, Microsatellite, Clupeidae

Abstract

A total of 120 samples of adult common Kilka fish (*Clupeonella cultriventris*) were collected during spring and summer from the southern coasts of Caspian Sea (Bandar Anzali and Babolsar). Fifteen sets of microsatellite primers were developed from Clupeidae being tested on genomic DNA of common Kilka. Allele frequency, observed and expected heterozygosity, F_{ST} , R_{ST} , F_{IS} index were determined. Five primer sets as polymorphic loci were used to analyze the genetic variation in adults of the common Kilka population. Results revealed that average alleles per locus was 13.1 (range 5 to 22 alleles per locus in regions, $N_e=9.5$). All sampled regions contained private alleles. Average observed and expected heterozygosity was 0.348 and 0.877, respectively. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed in most cases. F_{ST} , R_{ST} and gene flow estimates in AMOVA and the genetic distance between populations indicated that the genetic difference among the studied populations was pronounced. The data generated in this study provide primary information on the genetic variation and differentiation in populations of Caspian common Kilka.

*Corresponding author