بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه خزر *Rutilus rutilus caspicus* در مناطق قره سو و گمیشان به روش مایکروستلایت

حدیثه کشیری*، علی شعبانی و بهاره شعبانپور

گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده شیلات، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

چکیده

ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) یکی از گونه های تجاری با ارزش دریای خزر محسوب می گردد که علی رغم کاهش ذخایر این ماهی در سالهای اخیر و همچنین اهمیت بالای آن، اطلاعات راجع به این گونه در سطح مولکولی محدود می باشد. در این تحقیق، به منظور بررسی ساختار ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق قره سو و گمیشان از ۱۰ لکوس مایکروستلایتی استفاده شد که همگی پلی مورف بودند. طبق نتایج حاصله، متوسط میزان Fst، ۰/۰۱۶ به دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیتهای مورد بررسی می باشد. در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، نمونه ها در اکثر لکوسها انحراف از تعادل را نشان دادند که دلیل عمده آن را می توان به وجود اللهای نول و تکثیر مصنوعی نسبت داد. تعداد اللها در محدوده ۲۱-۴ و هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب در دامنه ۱- ۰/۲۹ (میانگین: ۰/۷) و ۰/۹۳-۰/۷۲ (میانگین ۰/۸۴) به دست آمد که بیانگر این مطلب می باشد که جمعیتهای مورد بررسی از غنای اللی و تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار می باشند. همچنین آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیتها وجود داشته و بخش عمده تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیتها می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فاصله ژنتیکی نیز حاکی از جدایی جمعیتهای ماهی کلمه در مناطق مورد بررسی می باشد.

واژه های کلیدی: ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)، مایکروستلایت، تنوع ژنتیکی، تمایز ژنتیکی.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۴۴۲۴۱۵۵-۰۱۷۱، پست الکترونیکی:hadiskashiri@gmail.com

مقدمه

ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) یکی از گونه های بومی دریای خزر با ارزش تجاری بالا می باشد که در سالهای اخیر به دلایل مختلفی از جمله آلودگی آبها، تخریب رودخانه ها، ایجاد سد بر مسیر مهاجرت و همچنین صید قاچاق میزان ذخایر آن به شدت کاهش یافته به طوری که این ماهی جزء گونه های در معرض تهدید منطقه محسوب می گردد (۱۸). حفاظت و بازسازی ذخائر این ماهی ارزشمند در ایران از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی لاروها در آبهای طبیعی صورت می گیرد. برنامه-های بازسازی که به منظور تقویت ذخایر وحشی صورت می پذیرد می تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، تغییر در ذخایر ژنی بومی و در نهایت انقراض جمعیتهای محلی گردد (۲۱). بررسی انجام شده توسط Blanchet و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی آزاد ماهی اقیانوس اطلس نیز نشان داد که با وجود مزایای تکثیر مصنوعی، تغییرات ژنتیکی بارزی بین نمونه‌های تکثیر مصنوعی و وحشی دیده می‌شود و این روش در طولانی مدت ممکن است منجر به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در ذخایر ژنی بومی گردد (۷). تنوع ژنتیکی منابع دریایی اهمیتی حیاتی برای مدیریت و

Archive of SID

www.SID.ir

حفاظت از آنها داشته و به عنوان اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیتها در شرایط محیطی در حال تغییر محسوب می گردد (۱۲). لذا اطلاعات در مورد تاریخچه جمعیتها و ساختار ژنتیکی آنها برای پیشبرد برنامه‌های مربوط به حفاظت از گونه‌های در معرض خطر سودمند خواهد بود (۳۴).

در حال حاضر کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا توجه محققین را به اعمال روشهای دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب نموده است (۱۹). در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه ها و جمعیتها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک صورت می گرفت اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و اثرات منفی دست کاری در نشانه گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده های حاصل از آن، علم استفاده از مارکرهای مولکولی همچون مایکروستلایت، آلوزایم و راپید جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت. در این میان، نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده تری نسبت به سایر نشانگرها دارند. در واقع این نشانگرها ارزش بالایی داشته به طوری که علاوه بر فراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرار شونده در آنها بالاست که دلیل آن را می توان به نرخ بالای جهش در این نشانگرها نسبت داد. از طرفی به علت هم بارز بودن، هتروزایگوسیتی و جهش را بهتر نشان داده، لذا می توان اذعان نمود که این نشانگرها در بررسیهای جمعیتی ماهیان بر برخی معایب روشهای دیگر غلبه دارند (۳۱). Bartfai و همکاران (۲۰۰۳) نیز مایکروستلایت ها را به عنوان کارآمدترین نشانگرها در آنالیز تنوع ژنتیکی در بین سایر نشانگرها معرفی نموده اند، لذا در این بررسی از نشانگرهای مایکروستلایت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه استفاده گردید (۶).

انتخاب ماهی کلمه در این بررسی به دلیل اهمیت آن در بحث بازسازی ذخایر و انتخاب مولدین می باشد. در واقع، آگاهی از میزان ذخایر توارثی و تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد می باشد. متأسفانه علی رغم اهمیت موضوع، اطلاعات محدودی در خصوص ساختار ژنتیکی این گونه ارزشمند وجود داشته و تنها تحقیق صورت گرفته مربوط به آنالیز ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق خلیج گرگان و انزلی با استفاده از ۶ لکوس مایکروستلایت می باشد (۱۷). با درنظر گرفتن این موضوع که تکثیر طبیعی ماهی کلمه طی سالهای اخیر کاهش یافته و درحال حاضر بخشی از ذخائر این گونه باارزش از تکثیر مصنوعی حاصل می گردد و اثر روشهای تکثیر مصنوعی نیز بر ذخائر ژنتیکی آبزیان اثبات شده، داشتن اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی کلمه در مناطق قره سو و گمیشان که جزء مناطق مهم پراکنش و رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی این ماهی محسوب می گردند، ضروری می باشد. هدف از این تحقیق، ارائه اطلاعاتی در زمینه ساختار جمعیتی ماهی کلمه در سطح مولکولی در مناطق قره سو و گمیشان می باشد. استفاده از اطلاعات حاصل از این تحقیق می تواند در بهبود و اجرای روشهای مدیریتی مناسب در بخش بازسازی ذخائر ماهی کلمه سودمند واقع گردد.

مواد و روشها

نمونه برداری و استخراج DNA : نمونه برداری از ۵۴ عدد ماهی کلمه از مناطق تالاب گمیشان و رودخانه قره سو (به طور متوسط ۲۷ نمونه از هر منطقه) در بهار سال ۱۳۸۶ صورت پذیرفت. حدود ۳-۲ گرم از باله پشتی هر ماهی جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرار داده شد. استخراج DNA، با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام پذیرفت (۱۶). DNA

Archive of SID

www.SID.ir

استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایشهای مربوطه در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. کیفیت و کمیت DNA استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید (۲۸).

تجزیه و تحلیلهای مایکروستلایت: ۱۰ جفت آغازگر مایکروستلایت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

CA1، CA3 (۱۱) CypG3، CypG24، CypG27 CypG30 (۲) Lid1، Rru2، Rru4 (۴) و Z21908 (http://zfin.org). واکنشهای زنجیری پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای الحاق برای هر یک از آنها به دست آمد. حجم واکنش PCR، ۲۵ مایکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۵/. مایکرومولار از هر پرایمر، ۴۰۰ مایکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تگ DNA پلیمراز، بافر PCR(1X) ، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. همچنین چرخه های حرارتی شامل ۳ سیکل: ۱ سیکل ۳ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه (واسررشته سازی اولیه)، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسررشته 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 پلیمراز روی ژل پلی‌آکریل-آمید ۱۰ درصد (غیر یونیزه) جداسازی و ژلها به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند (۲۸). پس از تهیه تصاویر ژلها توسط دستگاه مستند ساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD)، از نرم افزار کوانتیتی وان برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس آزمون مربع کای با استفاده از نرم افزار Genepop 3.1 (۲۶) محاسبه گردید. برای تعیین شاخص F_{IS}، N_m و F_{ST} بین جمعیتها بر اساس فراوانی و تنوع ژنتیکی بر اساس آزمون AMOVA از نرم-افزار Gene Alex (۲۵) استفاده شد. همچنین از نرم افزار POPGENE (۳۳) به منظور تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی (۲۳) و رابطه فیلوژنیک بین جمعیتها (ترسیم درخت UPGMA) استفاده گردید.

نتایج

در مجموع ۱۰ لکوس در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که همگی پلی مورف بودند. تعداد اللهای مربوط به تمامی جایگاههای پلی مورف در جدول (۲) نشان داده شده است. متوسط میزان اللهای مشاهده شده در مناطق قره سو و گمیشان به ترتیب ۱۱/۴ و ۱۰/۲ به دست آمد. همچنین کمترین و بیشترین میزان اللها به ترتیب در جایگاههای Z21908 (۴ الل) و Ca3 (۲۱ الل) مشاهده شد. اللهای مؤثر نیز در محدوده ۱۴/۴۳- ۳/۶۶ به دست آمد که در این میان، پایین ترین میزان در جایگاه Rru4 (۳/۶۶) و بالاترین آن در جایگاه Ca3 (۱۴/۴۳) قرار داشت. هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) در محدوده ۱- ۰/۲۹ (میانگین: ۰/۷) به دست آمد به طوری که پایین ترین مقدار مربوط به لکوس Z21908 (گمیشان) و بالاترین آن مربوط به جایگاههای Ca1 (هر دو منطقه) و Rru1 (گمیشان) بود. متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار نیز (He) ۰/۸۴ به دست آمد که بالاترین (۰/۹۳) و پایین ترین (۰/۷۲) میزان آن به ترتیب در جایگاههای Ca3 و Rru4 در منطقه قره سو مشاهده شد. همچنین از نظر تعداد اللها و میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، بین نمونه های مناطق مورد بررسی اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$). بررسی نمونه ها از نظر تعادل هاردی- واینبرگ نیز نشان داد که نمونه های منطقه قره سو در لکوسهای Ca1، Rru1 وCypG27 و نمونه های منطقه گمیشان در لکوسهایCypG27 ، Lid1 وRru4 در تعادل قرار داشتند و در سایر لکوسها انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند (جدول۲).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- ویژگی ده لکوس مورد استفاده

لکوس	وزن (جفت باز)	توالی	دمای اتصال
Ca1	۱۰۴ – ۱۳۲	F: AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC R: CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA	۵۵
Ca3	۲۳۶ – ۳۰۰	F: GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC R: TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG	۵۲
CypG3	۱۶۰ – ۲۲۸	F: AGT AGG TTT CCC AGC ATC ATT GT R: GAC TGG ACG CCT CTA CTT TCA TA	۵۹
CypG24	۱۶۴ – ۲۱۲	F: CTG CCG CAT CAG AGA TAA ACA CTT R: TGG CGG TAA GGG TAG ACC AC	۵۸
CypG27	۲۴۴ – ۳۰۸	F: AAG GTA TTC TCC AGC ATT TAT R: GAG CCA CCT GGA GAC ATT ACT	۴۹
CypG30	۱۸۰ – ۲۰۸	F: GAA AAA CCC TGA GAA ATT CAA AAG A R: GGA CAG GTA AAT GGA TGA GGA GAT A	۵۲
Lid1	۲۲۰ – ۲۵۶	F: TAA AAC ACA TCC AGG CAG ATT R: GGA GAG GTT ACG AGA GGT GAG	۵۱
Rru2	۱۰۸ – ۱۴۴	F: TTC CAG CTC AAC TCT AAA GA R: GCA CCA TGC AGT AAC AAT	۴۶
Rru4	۱۸۴ – ۲۲۰	F: TAA GCA GTG ACC AGA ATC CA R: CAA AGC CTC AAA AGC ACA A	۵۴
Z21908	۱۶۰ – ۱۸۰	F: ATT GAT TAG GTC ATT GCC CG R: AGG AGT CAT CGC TGG TGA GT	۵۹

جدول۲- تنوع ژنتیکی لکوسهای مورد استفاده در جمعیتهای مورد بررسی

لکوس / منطقه		Ca1	Ca3	CypG3	CypG24	CypG27	CypG30	Lid1	Rru1	Rru4	Z21908
قره سو	N_a	۷	۲۱	۱۶	۱۳	۱۲	۱۶	۸	۸	۷	۶
	N_e	۵/۵۶	۱۴/۴۳	۹/۲۲	۹/۷۲	۷/۸۳	۱۱/۷۵	۶/۵۰	۶/۴۵	۳/۶۶	۴/۰۵
	H_0	۱/۰۰	۰/۸۸	۰/۶۶	۰/۷۴	۰/۸۱	۰/۵۹	۰/۵۵	۰/۸۵	۰/۴۴	۰/۳۳
	H_e	۰/۸۲	۰/۹۳	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۸۷	۰/۹۱	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۷۲	۰/۷۵
	pHw	ns	*	***	***	Ns	**	***	ns	***	***
گمیشان	N_a	۸	۱۷	۱۴	۱۳	۱۱	۱۳	۸	۷	۷	۴
	N_e	۵/۱۳	۱۲/۴۶	۹/۶۵	۸/۶۷	۷/۲۵	۹/۷۸	۵/۷۸	۴/۵۷	۳/۹۹	۳/۹۷
	H_0	۱/۰۰	۰/۸۵	۰/۴۴	۰/۸۸	۰/۶۳	۰/۶۳	۰/۶۶	۱/۰۰	۰/۵۵	۰/۲۹
	H_e	۰/۸۰	۰/۹۲	۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۸۶	۰/۸۹	۰/۸۲	۰/۷۸	۰/۷۵	۰/۷۴
	pHw	*	**	***	**	Ns	***	Ns	*		***

N_a: تعداد اللهای مشاهده شده، N_e: تعداد اللهای موثر H_o: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، H_e: هتروزایگوسیتی مورد انتظار

pHw: تست احتمال تعادل هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، $P\leq$۰/۰۵: *، $P\leq$۰/۰۱: **، $P\leq$۰/۰۰۱: ***)

جدول۳ - میزان ضرایب تمایز(F_{ST})، درون آمیزی(F_{IS}) و جریان ژنی (N_m) در سطح لکوسهای مورد بررسی

لکوس / شاخص	Ca1	Ca3	CypG 3	CypG 24	CypG 27	CypG 30	Lid1	Rru1	Rru4	Z2190 8	میانگین
F_{St}	۰/۰۲۳	۰/۰۰۷	۰/۰۱۲	۰/۰۱۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۳۷	۰/۰۲۷	۰/۰۶	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶
F_{IS}	-۰/۲۳	۰/۰۵۹	۰/۰۳۷	۰/۰۸۵	۰/۱۶۷	۰/۳۲۶	۰/۲۷۰	-۰/۱۳	۰/۳۲۳	۰/۵۸۱	۰/۱۸۲
Nm	۱۰/۳۹	۳۴/۵۹	۲۱/۰۲	۱۹/۳۸	۳۸/۳۱	۳۴/۷۷	۶/۵۵	۸/۹۸	۳۸/۴۴	۱۳/۸۵	۱۵/۶۹

Archive of SID
www.SID.ir

متوسط شاخص درون آمیزی (F_{IS}) و جریان ژنی (N_m) به ترتیب ۰/۱۸ و ۱۵/۶۹ به دست آمد. متوسط میزان F_{ST} بین نمونه های مناطق مورد بررسی بر اساس فراوانی اللها، ۰/۰۱۶ به دست آمد (جدول ۳). بررسی نتایج F_{ST} حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹ درصد نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۹ درصد) درون جمعیتها و تنوع پایینی (۱ درصد) بین جمعیتها وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از تست RST نیز حاکی از تنوع درون جمعیتی بالا (۹۷ درصد) و تنوع بین جمعیتی پایین (۳ درصد) در مناطق مورد بررسی می باشد. در بررسی شباهت و فاصله ژنتیکی (۲۳)، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو منطقه به ترتیب ۰/۸۳ و ۰/۱۸۶ به دست آمد. دندوگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند.

بحث

ماهی کلمه یکی از گونه های با ارزش دریای خزر بوده که در سالهای اخیر جمعیت آن دست خوش تغییراتی گردیده به طوری که جزء ماهیان در معرض تهدید محسوب می گردد. حفاظت از این ماهی در ایران از طریق تکثیر و رهاسازی این گونه در آبهای طبیعی صورت می گیرد. متأسفانه علی رغم اهمیت موضوع، اطلاعات راجع به تنوع ژنتیکی این گونه در سطح مولکولی محدود می باشد. تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می شود و می توان آن را توسط نشانگرهای ژنتیکی اندازه گیری کرد (۳۰). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی آبزیان در راستای حفاظت از ذخایر آنها از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. امروزه مارکرهای مایکروستلایت جهت تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت آبزیان کاربرد گسترده ای دارند (۳). در این بررسی جهت تعیین ساختار ژنتیکی ماهی کلمه در رودخانه قره سو و تالاب گمیشان که از مناطق مهم پراکنش این ماهی می باشند، از ۱۰ لکوس مایکروستلایتی استفاده شد که همگی پلی مورف بودند.

چکمه دوز و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی مایکروستلایتی تنوع جمعیتهای بهاره و پاییزه ماهی سفید (*Rutilus frisii kuttum*) در دریای خزر، تعداد متوسط الل واقعی و مؤثر را به ترتیب ۹/۴ و ۵/۲۶ و دامنه هتروزایگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار را به ترتیب در محدوده ۰/۹۶-۰/۲۱ گزارش نمودند که بالا بودن دامنه هتروزایگوسیتی در ماهی سفید دریای خزر را بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این ماهی دانستند(۱). در بررسی ژنتیکی جمعیتهای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در ۳ منطقه Iznik، Sapanca و Bafra در ترکیه با استفاده از ۴ لکوس مایکروستلایتی، تعداد اللها در سطح لکوس و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به ترتیب در محدوده ۸ -۶/۷۵ و ۰/۸۱۷-۰/۵۷۵ گزارش گردید. در این میان، جمعیت ماهی کپور در منطقه Sapanca با دارا بودن بالاترین میزان متوسط الل در هر لکوس و هتروزایگوسیتی، تنوع مایکروستلایتی بالاتری را نشان داد (۲۲). Keyvanshokuh *et al.*, 2007 در آنالیز ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق خلیج گرگان و انزلی با استفاده از ۶ لکوس مایکروستلایتی، تعداد الل در هر لکوس و هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۷/۸-۷/۱ و ۰/۶۰-۰/۵۶ گزارش نمودند و عنوان داشتند که بین جمعیتها تفاوت معنی داری از لحاظ تعداد الل و هتروزایگوسیتی وجود ندارد (۱۷). در این بررسی نیز تفاوت معنی داری از این حیث بین جمعیتها مشاهده نشد. در مطالعه صورت گرفته، میانگین تعداد الل در هر لکوس ۱۰/۸ و میانگین تعداد الل مؤثر نیز ۷/۵۲ به دست آمد. اللهای مؤثر (Ne) بیانگر تعداد اللهایی است که هتروزایگوسیتی یکسان ایجاد می کنند. تعداد اللهای واقعی در هر لکوس می تواند تحت تاثیر اندازه نمونه قرار گیرد به طوری که با تعداد نمونه های مختلف تعداد اللهای واقعی مختلف در هر جایگاه مایکروستلایتی به دست می آید. کاهش تعداد اللهای مشاهده شده در سطح جمعیت می تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (۲۰). در واقع ارزیابی غنای اللی نسبت به هتروزایگوسیتی در بررسیهای تنوع ژنتیکی دارای ارزش

Archive of SID
www.SID.ir

بالاتری بوده به طوری که هتروزایگوسیتی بیشتر مبتنی بر تغییرات تصادفی در فراوانی ژنی می باشد (۱۲). در این تحقیق، تعداد اللهای مشاهده شده در برخی از لکوسها بیشتر از تعداد اللی بود که قبلا توسط Hamilton & Tylor (2007) گزارش گردید (۱۴). این اختلاف ممکن است در نتیجه تفاوت در تعداد نمونه ها باشد اما می تواند حاکی از تنوع ژنتیکی بالاتر در جمعیتهای کلمه در مناطق مورد بررسی نیز باشد. با این وجود تعداد اللها در برخی لکوسها در این تحقیق با تعداد به دست آمده توسط Hamilton & Tylor (2007) در تشابه بود(۱۴). هتروزایگوسیتی مشاهده شده و تعداد اللها به ترتیب در محدوده ۱- ۰/۲۹ (میانگین: ۰/۷) و ۲۱-۴ (میانگین: ۱۰/۸) قرار داشت که می تواند بیانگر این موضوع باشد که علی رغم مسائلی همچون تکثیر مصنوعی، فشار صید بالای این گونه و همچنین جمعیت بسته دریای خزر تنوع ژنتیکی این گونه هنوز هم در حد قابل توجهی قرار دارد. به نظر می رسد تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به طبیعت تاکنون اثر قابل توجهی روی سطح تنوع ژنتیکی ماهی کلمه نداشته است. متأسفانه علی رغم مزایای تکثیر مصنوعی، این روش در دراز مدت می تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی ذخائر ژنی بومی گردد (۷). معمولاً به دلیل مشکلات و محدودیتهای موجود در کارگاههای تکثیر همچون استفاده از تعداد محدودی مولد برای تولید لارو، فعالیتهای این مراکز در غالب موارد منجر به از دست رفتن تنوع ژنتیکی جوامع وحشی و حتی انقراض جمعیتهای بومی می‌گردد (۸). باتوجه 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 بنظر می رسد.

در این بررسی، میزان هتروزایگوسیتی مورد انتظار به استثناء لکوس Ca1 و Rru1 بیشتر از هتروزایگوسیتی مشاهده شده بود که یک علت عمده این امر را می توان به وجود اللهای نول نسبت داد. وجود این اللها در ماهیان می تواند امری کاملاً عادی باشد. البته کسری هتروزایگوسیتها علاوه بر فرضیه اللهای نول می تواند تحت تأثیر عوامل دیگری همچون تحت به گزینی بودن، آمیزش خویشاوندی و به تبع آن افزایش خلوص ژنتیکی نیز باشد (۵). در این تحقیق، نمونه ها در اکثر لکوسها انحراف معنی داری از تعادل هاردی– واینبرگ نشان دادند. انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ در این تحقیق را می توان به وجود اللهای نول در جمعیتهای مورد بررسی کلمه و یا تکثیر مصنوعی این گونه نسبت داد. در واقع وجود اللهای نول در ماهی پدیده ای کاملاً عادی می باشد و وجود این اللها در توارث مایکروستلایت در ماهیان مورد تأیید قرار گرفته است (۲۷). در حضور اللهای نول، هتروزایگوسیتها می توانند اشتباهاً به عنوان هموزایگوتهایی برای الل دیگر در نظر گرفته شوند که می تواند علتی برای کسری هتروزایگوسیتها در جمعیت باشد. Keyvanshokuh *et al* (2007) نیز در بررسی جمعیتهای ماهی کلمه در مناطق انزلی و خلیج گرگان دلیل عمده انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ را به کسری هتروزایگوسیتها به دلیل حضور اللهای نول، نسبت دادند(۱۷). در تحقیق حاضر، متوسط شاخص F_{IS}، ۰/۱۸ به دست آمد و چون متوسط این مقدار بیش از صفر است، می تواند دال بر آمیزش خویشاوندی و اختلاط بین جمعیتها باشد (۳۲). آمیزش خویشاوندی از جمله خطرات اصلی در جمعیتهای ماهیان به شمار می رود که می‌تواند باعث کاهش هتروزایگوسیتی، کاهش میزان بقاء و عدم مقاومت در برابر بیماریها و در نهایت به خطر انداختن جمعیتهای بومی گردد (۱۳). متوسط شاخص N_m در جمعیتهای مورد بررسی، ۱۵/۶۹ به دست آمد. در صورتی که هیچ جریان ژنی و یا جریان ژنی اندکی بین جمعیتها باشد، بین آنها تفاوت ژنتیکی قابل ملاحظه ای به وجود خواهد آمد (۱۰). با افزایش میزان مهاجرت، میزان شباهت ژنتیکی بین جمعیتها افزایش می یابد (۲۴). همچنین زمانی که جریان ژنی ۱۰ درصد و

Archive of SID

www.SID.ir

یا کم تر باشد، می توان ذخایر مورد بررسی را مجزا از هم درنظر گرفت (۹). محاسبه جریان ژنی در این تحقیق نشان می دهد که بین جمعیتهای مورد بررسی کلمه، جریان ژنی بالایی(۱۵/۶۹) وجود داشته و تفاوت ژنتیکی بین این جمعیتها نیز پایین می باشد. در این بررسی بالاترین میزان F_{ST} بین نمونه های مناطق مورد بررسی ۰/۰۱۶ بدست آمد که با توجه به فاصله مناطق مذکور و جریان ژنی بالای بین این دو منطقه، به سادگی قابل توجیه می باشد. با تبادل افراد، تبادل ژنها نیز پیش می‌آید و تبادل بیشتر منجر به کم شدن تمایز ژنتیکی بین جمعیتها می‌گردد. با این وجود اگرچه میزان Fst به دست آمده در این بررسی پایین می باشد، اما ممکن است تمایز ژنتیکی مهمی را نمایان سازد که این موضوع قبلا توسط Hartel & Clarck (1997) تاکید شده است (۱۵). به نظر محققین نامبرده، تمایز ژنتیکی پایین‌تر از ۰/۰۵ را هم نمی توان به هیچ عنوان نادیده گرفت. نتایج آزمون AMOVA نیز حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در داخل گروهها و در عین حال تنوع ژنتیکی پایین بین جمعیتها می باشد. همچنین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی ۰/۱۸۶ به دست آمد. Keyvanshokuh *et al*., 2007 نیز میزان فاصله ژنتیکی را در نمونه‌های مورد بررسی ماهی کلمه (خلیج گرگان و تالاب انزلی) ۰/۲۹ گزارش نمودند (۱۷). Thrope & Sol-cava, 1994 عنوان داشتند که مقادیر فاصله ژنتیکی Nei (1972) (۲۳) برای جمعیتهایی با گونه‌های مشابه و گونه-های هم‌جنس به ترتیب در محدوده ۰/۰۰۲–۰/۰۷ و ۰/۰۳–۰/۶۱ و برای جنسهای هم خانواده از ۰/۵۸ تا ۱/۲۱ می‌باشد (۲۹). میزان فاصله ژنتیکی به دست آمده در این بررسی در محدوده گونه های هم‌جنس قرار می‌گیرد که مقدار آن پایین می‌باشد. بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی و دندروگرام UPGMA به دست آمده در این تحقیق می توان عنوان نمود که احتمالاً جمعیتهای ماهی کلمه در مناطق مورد بررسی مجزا از هم می باشند.

منابع

۱- چکمه دوز، ف.، پورکاظمی، م.، زمینی، دع.، یارمحمدی، م.، رضوانی، س.، عزیززاده، ل. ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از مارکرهای مایکروستلایتی. مجموعه خلاصه مقالات نخستین همایش ملی منابع شیلاتی در پای خزر. صفحه ۲.

2- Baerwald, M.R. and 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. Molecular Ecology Notes. 4: 385–390.

3- Ballox, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population differentiation with

microsatellite markers. Molecular Ecology. 11: 155-165.

4- Barinova, A., Yadrenkina, E., Nakajima, M. and Taniguchi, N. 2004. Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in ide *Leuciscus idus* and Siberian roach *Rutilus rutilus*. Molecular Ecology Notes. 4: 86–88.

5- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H. and Traub-Cseko, Y.M. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of Brycon opalinus (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. Aquaculture. 247: 51– 65.

6- Bartfai, R., Egedi, S., Yue, G.H., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L. and Orban, L. 2003. Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers Aquaculture. 219: 157–167.

7- Blanchet, S., Paez, D., Bernatchez, L. and Dodson, J. 2008. An integrated comparison of captive-bred and wild Atlantic salmon (*salmo salar*): Implications for supportive breeding programs. Biological Conservation. 141: 1989-1999.

8- Busack, C. A. and Currens, K. P. 1995. Genetic risks and hazards in hatchery operations: fundamental concepts and issues. Schramm and Piper. 71-80.

9- Carvalho, G. R. and Hauser, L. 1995. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. G. R. Carvalho and T. J. Pitcher, (Eds.), Molecular

Archive of SID
www.SID.ir

Genetics in Fisheries. London, Chapman and Hall. 55-80.

10- Chakraborty, R. and Leimar, O. 1987. Genetic variation within a subdivided population. N. Ryman and F. M. Utter (Eds), Population Genetics and Fishery management. Washington: University of Washington. 89-120.

11- Dimsoski, P., Toth, GP. and Bagley, MJ. 2000. Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). Molecular Ecology. 9: 2187–2189.

12- Diz, P.A. and Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. 287: 278–285.

13- Fergusen, M. 1995. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. G. R. Carvalhoand, T. J. Pitcher (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries. London: Chapman and Hall. 81-104.

14- Hamilton, P. B. and Tylor, C. R. 2007. Identification of microsatellite loci for parentage analysis in roach (*Rutilus rutilus*) and eight other cyprinid fish by cross-species amplification and a novel test for detecting hybrids between roach and other cyprinids. Molecular Ecology Notes.

15- Hartl, D.L. and Clark, A.G. 1997. Principles of Population Genetics, 3nd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.

16- Hillis, D.M., Mortiz, C. and Mable, B.K. 1996. Molecular systematic. Signature associated.

17- Keyvanshokooh, S., Ghasemi, A., Shahriari-Moghadam, M., Nazari, R.M. and Rahimpour, M. 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran by microsatellite markers. Aquaculture Research, 38, 953-956.

18- Kiabi B.H., Abdoli A. and Naderi M. 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian basin of Iran. Journal of Zoology in the Middle East.18: 57-65.

19- Lin, Y. S., Y.P. Poh, S.M. Lin, and C.S. Tzeng. 2002. Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological Studies. 41(4):421-430.

20- Lind, C.U., Evans, B.S., Knauer, J., Taylor, J.J.U. and 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.

21- Machado-schiaffino, G., Depico, E. and Garcia-vazquez, E. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. Aquaculture. 264: 59–65.

22- Memis, D., and Kohlmann, K. 2006. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey. Aquaculture. 258: 257–262.

23- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283- 92.

24- Neigel, J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology and Systematics. 28: 105-128.

25- 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.

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

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

28- Sambrok, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press. 743-745.

29- Thorpe, J.P. and Sol-cava, A.M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. Zoologica scripta. 23: 3-18.

30- Utter, F. M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology. 39: 1-20.

31- Verspoor, E. and Jordan, W. C. 1989. Genetic variation at the Me-2locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. Fish Biology. 35: 205-213.

32- Wright, B. S. 1951. The genetical structure of populations. Annual Eugenics. 15: 323-354.

33- Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-bases Freeware for population Genetic Analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.

Archive of SID

www.SID.ir

34- Zhang, Y.P., Wang, X.X., Ryder, O.A., Li, H.P., Zhang, H.M., Yong, Y. and Wang, P.Y. 2002. Genetic diversity and conservation in endangered animal species. Pure Applied Chemistry. 74: 575-584.

Genetic diversity of caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in gharesou and gomishan regions using microsatellite

Kashiri H., Shabani A. and Shabanpoor B.

Fisheries Faculty, University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, IR. Of IRAN

Abstract

Caspian roach (*Rutilus rutilus caspius*) is regarded as one of the important commercial species in Caspian Sea, despite the decrease in roach stock in recent years as well as the high importance of this fish, information at the molecular level is scare. In this study, the genetic diversity of *Rutilus rutilus caspius* from Gharesou and Gomishan regions was investigated by 10 polymorphic microsatellite loci. According to the results, the Fst value was 0.016 which indicates the low genetic differentiation between the populations. Most of the loci showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium which can attribute it to the presence of null alleles and artificial reproduction. The number of alleles, observed and expected heterozygosity were, 4-21, 0.29-1(the average: 0.7) and 0.72-0.93 (the average: 0.84), respectively. This indicates the allelic diversity and genetic variation of investigated populations is at favorable level. Also, analysis of molecular variance showed there is low genetic variation among populations and most of the observed variation is within the populations. Results based on genetic distance indicated that roach populations are separate from each other in the investigated regions.

Keywords: roach (*Rutilus rutilus caspicuc*), microsatellite, genetic diversity, genetic differentiation.

Archive of SID

www.SID.ir