مجله تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال دوم، شماره دوم (پیاپی ۳)، تابستان ۱۳۸۹، صفحه ۶۶-۵۵
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۴/۲۸

چند شکلی ریزماهواره‌ای در جمعیت‌های طبیعی گونه در معرض تهدید ماهی کلمه خزر در سواحل استان گلستان

حدیثه کشیری، گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
علی شعبانی*، گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
بهاره شعبانپور، گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
محمد رضایی، گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ماهی کلمه که یکی از گونه‌های مهم اقتصادی و در معرض تهدید دریای خزر است، ۵۸ نمونه از مناطق گرگانرود و خلیج گرگان جمع‌آوری و با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر ریزماهواره بررسی شد. هر ۱۰ جایگاه ژنی مورد استفاده چند شکلی نشان دادند و دارای ظرفیت اطلاعات چند شکلی ۰/۷۲ تا ۰/۹۳ بودند. نتایج نشان داد که مناطق مورد بررسی از غنای اللی (تعداد الل:۱۰/۳) و ژنی (هتروزیگوسیتی: ۰/۶۷) قابل قبولی برخوردار هستند. در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، ۱۰ نمونه از ۲۰ تست مورد بررسی (۱۰ جایگاه ژنی × ۲ منطقه) انحراف معنی‌داری از تعادل نشان دادند که علت عمده آن را می‌توان ناشی از کسری هتروزیگوسیتی مشاهده شده دانست. دندروگرام UPGMA ترسیم شده بر اساس فاصله ژنتیکی Nei نیز جدایی آشکاری را بین جمعیت‌ها نشان نداد. همچنین، آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۸٪) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: پرایمر، چند شکلی، خلیج گرگان، گرگانرود

مقدمه

تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در میان افراد حاصل می‌شود (Utter, 1991). تنوع ژنتیکی، اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع دریایی دارد و به عنوان اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می‌گردد (Diz and Presa, 2009). آگاهی از میزان ذخایر توارثی و تنوع ژنتیکی در بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است؛ به طوری که بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی

* shabani@gau.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مولکولی ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang *et al*., 2007).

طی سال‌های اخیر، جمعیت‌های بسیاری از گونه‌ها به دلیل دخالت‌های مستقیم یا غیرمستقیم بشر، همچون از دست رفتن زیستگاه‌ها، بهره‌برداری بیش از حد، آلودگی، معرفی گونه‌های شکارچی و رقیب و یا ورود بیماری‌ها دچار تغییرات چشمگیری شده، در معرض خطر انقراض هستند. بنابراین، این گونه‌ها به منظور بقا در طبیعت و محفوظ ماندن از خطر انقراض به تکثیر مصنوعی نیاز دارند (Millennium Ecosystem Assessment, 2005)؛ امروزه، تکثیر مصنوعی روشی معمول برای جلوگیری از انقراض گونه‌های دریایی در معرض تهدید است. با وجود مزایای برنامه‌های تکثیر حمایتی، مشکلات احتمالی قابل پیش‌بینی نیز در آنها وجود دارد. رهاسازی بچه ماهیان حاصل از تکثیر مصنوعی در طبیعت می‌تواند به کاهش تنوع ژنتیکی منجر گردد (Cross *et al*., 1998). در واقع، برنامه‌های بازسازی که به منظور افزایش ذخایر گونه‌های وحشی انجام می‌گیرد، اغلب به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ذخایر ژنی بومی و در نهایت انقراض جمعیت‌های محلی منجر می‌گردد (Machado-schiaffino *et al*., 2007).

ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) از خانواده Cyprinidae، (بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین (Nelson, 1994))، یکی از گونه‌های ارزشمند تجاری و بومی دریای خزر است که متأسفانه در سال‌های اخیر به دلیل دخالت‌های انسانی از جمعیت‌های آن کاسته شد؛ به طوری که این گونه جزو گونه‌های در معرض تهدید در منطقه محسوب می‌گردد (Kiabi *et al*., 1999). بازسازی ذخایر و حفاظت از این ماهی با ارزش از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به آب‌های طبیعی انجام می‌گیرد. در این راستا، از بین رفتن ذخیره ژنی این گونه بومی، از نگرانی‌های اصلی در ادامه روند تکثیر مصنوعی است. بنابراین، با توجه به اینکه اثر روش‌های تکثیر مصنوعی بر ذخایر ژنتیکی آبزیان اثبات شده است و در حال حاضر نیز بیشتر ذخایر ماهی کلمه از طریق تکثیر مصنوعی حاصل می‌گردد، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه بسیار ضروری است.

جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، توالی‌های کوتاه و تکراری DNA هستند که دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی هستند (Angers and Bernatchez, 1998). ریزماهواره‌ها به علت بالا بودن تعداد الل‌هایشان، در بین تمام نشانگرها، بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (Liu, 2007) . این چند شکلی بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (Dunham, 2004). با توجه به اهمیت بالای ماهی کلمه در بحث بازسازی ذخایر و همچنین، اهمیت آن به عنوان یک منبع غذایی و تجاری، در این تحقیق سعی شد با به‌کارگیری ۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

جایگاه ژنی ریزماهواره به بررسی هرچه بهتر ساختار ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق گرگانرود و خلیج گرگان- که از مناطق عمده پراکنش این ماهی هستند- پرداخته گردد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها

تعداد ۵۸ نمونه ماهی کلمه، از مناطق گرگانرود (۲۹ عدد) و خلیج گرگان (۲۹ عدد) در بهار سال ۱۳۸۶ صید گردید. حدود ۲ گرم از باله پشتی هر ماهی جداسازی و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۵٪ نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم (Hillis *et al*., 1996) انجام پذیرفت. DNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر تا زمان انجام مطالعات در فریزر ۲۰- نگهداری شد. کیفیت و کمّیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

واکنش زنجیری پلیمراز و الکتروفورز

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه از ۱۰ جایگاه ژنی CA3، CA1 (Dimsoski *et al*., 2000) CypG3، CypG27، CypG24، CypG30 Lid1 (Baerwald and May, 2004)، Rru2، Rru4 (Barinova *et al*., 2004) و Z21908 (http://zfin.org)- که در تحقیق انجام شده توسط Hamilton و Tylor (۲۰۰۷)، در ماهی کلمه چندشکلی نشان داده شده بودند- استفاده شد (جدول ۱). تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تگ DNA پلیمراز، بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم، انجام گرفت. سیکل دمایی برای هر جایگاه ژنی عبارت بود از: ۱ سیکل ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه (واسر رشته‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه‌ای به مدت ۳۰ ثانیه (واسررشته‌سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه (بسط) و ۱ سیکل ۷۲ درجه‌ای به مدت ۳ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. ژل‌ها به روش نیترات نقره (Bassam *et al*., 1991) رنگ‌آمیزی شدند و پس از تهیه تصویر آنها توسط دستگاه مستندساز ژل، از نرم‌افزار Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید.

آنالیز آماری

ارزیابی تعداد ال در هر جایگاه ژنی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی چند شکلی ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

نرم‌افزار GenAlex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) انجام شد. برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مورد انتظار و تنوع اللی از تست ویلکاکسون غیر پارامتریک در نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد (Zar, 1999). برای تنظیم سطح معنی‌داری تست‌های تکرار شونده نیز ضریب تصحیح بونفرونی استفاده گردید (Rice, 1989). از نرم‌افزار FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) نیز برای تعیین شاخص درون‌آمیزی (Fis) و سطح معنی‌داری آن استفاده شد. از نرم‌افزار Cervus (Marshall *et al.*, 1998) و Microchecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) به ترتیب برای تعیین ظرفیت اطلاعات چند شکلی (PIC) جایگاه‌های ژنی و بررسی امکان وجود الل‌های نول استفاده گردید. تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh *et al.*, 1999) انجام شد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی بر اساس مدل اللی بی‌نهایت (Fst) و مدل جهش پله‌ای (Rst) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی، بسته نرم‌افزاری Genealex استفاده گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های ۱۰ جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	توالی	کد دستیابی در بانک ژن	اندازه اللی (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
Ca1	F: AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC R: CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA	AF277573	۱۰۴ – ۱۳۲	۵۵
Ca3	F: GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC R: TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG	AF277575	۲۳۶ – ۳۰۰	۵۲
CypG3	F: AGT AGG TTT CCC AGC ATC ATT GT R: GAC TGG ACG CCT CTA CTT TCA TA	AY439122	۱۶۰ – ۲۲۸	۵۹
CypG24	F: CTG CCG CAT CAG AGA TAA ACA CTT R: TGG CGG TAA GGG TAG ACC AC	AY439142	۱۶۴ – ۲۱۲	۵۸
CypG27	F: AAG GTA TTC TCC AGC ATT TAT R: GAG CCA CCT GGA GAC ATT ACT	AY439145	۲۴۴ – ۳۰۸	۴۹
CypG30	F: GAA AAA CCC TGA GAA ATT CAA AAG A R: GGA CAG GTA AAT GGA TGA GGA GAT A	AY439148	۱۸۰ – ۲۰۸	۵۲
Lid1	F: TAA AAC ACA TCC AGG CAG ATT R: GGA GAG GTT ACG AGA GGT GAG	AB112732	۲۲۰ – ۲۵۶	۵۱
Rru2	F: TTC CAG CTC AAC TCT AAA GA R: GCA CCA TGC AGT AAC AAT	AB112738	۱۰۸ – ۱۴۴	۴۶
Rru4	F: TAA GCA GTG ACC AGA ATC CA R: CAA AGC CTC AAA AGC ACA A	AB112740	۱۸۴ – ۲۲۰	۵۴
Z21908	F: ATT GAT TAG GTC ATT GCC CG R: AGG AGT CAT CGC TGG TGA GT	G40270	۱۶۰ – ۱۸۰	۵۹

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

نشانگر ریزماهواره، تنوع ژنی و اللی

هر ۱۰ جایگاه ژنی مورد استفاده در این بررسی چند شکلی نشان دادند و دارای ظرفیت اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۷۲ (جایگاه ژنی Z21908) تا ۰/۹۳ (جایگاه ژنی Ca3) بودند (جدول ۲). داده‌های حاصل از ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی (تنوع اللی و ژنی) در جدول ۳ آورده شده است. تعداد متوسط الل‌های مشاهده شده در جمعیت‌های مورد بررسی برای هر جایگاه ژنی در محدوده ۱۷– ۵ به دست آمد که در این میان، جایگاه Ca3 (۱۷ الل) بالاترین و جایگاه Z21908 پایین‌ترین (۵ الل) تنوع اللی را نشان داد. در بررسی تنوع اللی در سطح جمعیتی نیز، جمعیت متعلق به گرگانرود و خلیج گرگان، به ترتیب دارای میانگین اللی ۱۰/۲ و ۱۰/۴ بودند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) در رودخانه گرگانرود به ترتیب، ۰/۶۹ و ۰/۸۳ و در خلیج گرگان نیز ۰/۶۹ و ۰/۸۴ به دست آمد. همچنین، تفاوت معنی‌داری از نظر تنوع اللی و ژنی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

تعادل هاردی - واینبرگ، شاخص درون‌آمیزی و جریان ژنی

نتایج مربوط به بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) در جدول ۳ آورده شده است. از ۲۰ تست ممکن (۱۰ جایگاه ژنی × ۲ منطقه) تنها ۵ مورد در تعادل HW قرار داشتند و بقیه نمونه‌ها انحراف معنی‌داری از تعادل نشان دادند (P≤ ۰/۰۵)، در حالی‌که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، ۱۰ مورد از ۲۰ تست مورد بررسی، به طور معنی‌داری انحراف از تعادل HW داشتند (P≤ ۰/۰۰۵). در بررسی شاخص Fis، جایگاه‌های ژنی CypG3، CypG27، Lid1، Rru4 و Z21908 در منطقه گرگانرود و جایگاه‌های CypG27، CypG30، Rru4 و Z21908 در منطقه خلیج گرگان کسری هتروزیگوسیتی معنی‌داری (P ≤ ۰/۰۰۲) پس از اعمال ضریب تصحیح توسط نرم‌افزار Fstat نشان دادند (جدول ۳). همچنین، جریان ژنی بالایی (میانگین: ۲۵/۰۶) در سطح جایگاه‌های ژنی مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ۲- تعداد کل الل‌های مشاهده شده و ظرفیت اطلاعات چند شکلی (PIC) جایگاه‌های ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	*Ca1*	*Ca3*	*CypG3*	*CypG24*	*CypG27*	*CypG30*	*Lid1*	*Rru2*	*Rru4*	*Z21908*
PIC	۰/۸	۰/۹۳	۰/۹۱	۰/۸۸	۰/۸۵	۰/۹	۰/۸۴	۰/۷۷	۰/۷۶	۰/۷۲
تعداد کل الل	۸	۱۹	۱۷	۱۳	۱۲	۱۷	۹	۷	۸	۶

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی

جایگاه ژنی / منطقه		Ca1	Ca3	CypG3	CypG24	CypG27	CypG30	Lid1	Rru2	Rru4	Z21908
گرگانرود	Na	۸	۱۴	۱۶	۱۲	۹	۱۵	۹	۷	۷	۵
	Ne	۶/۱۷	۱۰/۲۶	۸/۶۷	۴/۸۶	۶/۸۷	۱۰/۶۴	۶/۶۸	۶	۳/۶۸	۳/۵۹
	Ho	۱/۰۰	۰/۹۶	۰/۵۵	۰/۸۸	۰/۳۷	۰/۷۴	۰/۵۵	۰/۸۸	۰/۴۴	۰/۱۸
	He	۰/۸۳	۰/۹	۰/۸۸	۰/۷۹	۰/۸۵	۰/۹۰	۰/۸۵	۰/۸۳	۰/۷۲	۰/۷۲
	Fis	−۰/۱۷	−۰/۰۴	**۰/۳۸**	−۰/۱	**۰/۵۷**	۰/۲	**۰/۳۶**	−۰/۰۴	**۰/٤**	**۰/۷۵**
	P	۰/۰۳۳	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۷۶	۰/۰۴۳	۰/۱۴۱	**۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰
خلیج گرگان	Na	۸	۱۷	۱۵	۱۱	۹	۱۵	۹	۷	۷	۶
	Ne	۵/۸۷	۱۳/۶۲	۱۰/۷۲	۸/۳۷	۵/۳۲	۸/۶۷	۷/۵۱	۵/۴	۴/۴۱	۴/۲۵
	Ho	۰/۹۲	۰/۸۸	۰/۷۴	۰/۸۸	۰/۵۵	۰/۵۹	۰/۷۷	۰/۸۸	۰/۲۵	۰/۴
	He	۰/۸۳	۰/۹۲	۰/۹	۰/۸۸	۰/۸۱	۰/۸۸	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۷۶
	Fis	−۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۲	۰/۰۱	**۰/۳۳**	**۰/۳٤**	۰/۱۲	−۰/۰۷	**۰/٦۷**	**۰/٤۸**
	P	۰/۱۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۱۲۷	۰/۲۲۳	۰/۰۰۰	**۰/۰۰۱**

Na: تعداد الل‌های مشاهده شده؛ Ne: تعداد الل‌های مؤثر؛ Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ P: تست احتمال هاردی- واینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی (pb: 0.005)، Fis: شاخص درون‌آمیزی) (مقادیر معنی‌دار به صورت پُر رنگ مشخص هستند).

جدول ۴- میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (Fst) در سطح ۱۰ جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	Ca1	Ca3	CypG3	CypG24	CypG27	CypG30	Lid1	Rru2	Rru4	Z21908	میانگین
Nm	۱۲۱/۶	۱۱/۶۹	۱۵/۷۳	۶/۶	۶/۰۷	۱۶/۱۱	۱۳/۰۴	۴۴/۵	۵/۸۲	۹/۴۲	۲۵/۰۶
Fst	۰/۰۰۲	۰/۰۲۱	۰/۰۱۶	۰/۰۳۶	۰/۰۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۹	۰/۰۰۶	۰/۰۴۱	۰/۰۲۶	۰/۰۲

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)

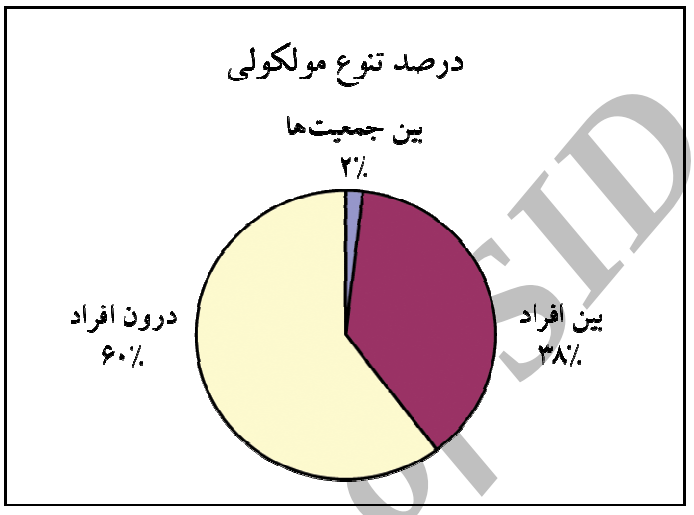
نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در جدول ۵ آورده شده است. مقدار RST و FST به عنوان شاخص‌های تمایز از طریق آنالیز واریانس مولکولی به ترتیب ۰/۰۱۸ و ۰/۰۲ (جدول ۴) محاسبه شد. همچنین، نتایج حاصل از AMOVA نشان داد که ۹۸ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها ۲ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌هاست (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA). df (درجه آزادی)، SS (مجموع مربعات)، Ms (انحرافات میانگین مربع)، Prob (معنی‌دار بودن انحراف پس از ۹۹ جایگزینی تصادفی).

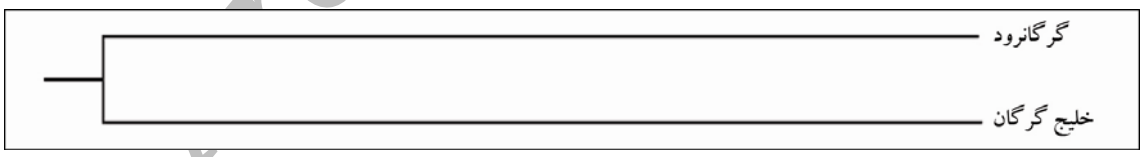
	df	SS	MS	Est.var.	٪	Stat	Value	Prob
بین جمعیت‌ها	۱	۱۰/۱۷	۱۰/۱۷	۰/۱۰۹	۲ درصد			
درون جمعیت‌ها	۱۰۶	۴۵۲/۹۲	۴/۲۷	۴/۲۷	۹۸ درصد	Fst	۰/۰۲	۰/۰۱۰



شکل ۱- توزیع تنوع ژنتیکی تحت معیار R_{ST}

شباهت و فاصله ژنتیکی

بر اساس معیار فاصله ژنتیکی Nei، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو منطقه به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۲۶ به دست آمد. دندروگرام UPGMA ترسیم شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز جدایی آشکاری را بین مناطق مورد بررسی نشان نداد (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام UPGMA برای مناطق مورد بررسی

بحث

تنوع ژنتیکی به عنوان پایه‌ای برای توانایی تکامل جمعیت‌هاست. اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، نقشی اساسی در حفاظت و بهره‌برداری پایدار از آن‌ها دارد. عملیات آبزی‌پروری می‌تواند روی تنوع ژنتیکی یک گونه اثرگذار باشد (Norris *et al.*, 1999). اندازه مؤثر کوچک جمعیت و برنامه‌های کنترل نشده تکثیر مصنوعی، از عوامل عمده

Archive of SID

www.SID.ir

از دست رفتن تنوع ژنتیکی در گونه‌های پرورشی است (Hansen *et al.*, 2000)، بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی باید به عنوان اولویت اصلی در برنامه‌های تکثیر حمایتی د رنظر گرفته شود.

در این تحقیق، از ۱۰ جایگاه ژنی ریزماهواره برای بررسی هرچه بهتر تنوع ژنتیکی ماهی کلمه استفاده گردید. جایگاه‌های Ca3، CypG3، CypG24 و CypG30، ظرفیت اطلاعات چند شکلی و تنوع اللی درخور توجهی را بدون امکان حضور الل‌های نول نشان دادند (جدول ۲). بنابراین، استفاده از این جایگاه‌های ژنی در بررسی‌های ژنتیکی آتی ماهی کلمه توصیه می‌گردد.

کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind *et al.*, 2009). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. در واقع، بالا بودن غنای آللی، نشان‌دهندهٔ بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت بوده، استفاده از غنای آللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های بهگزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسبتر است (Diz and Presa, 2009). در این بررسی، متوسط تعداد الل‌های مشاهده شده ۱۰/۳ به دست آمد (جدول ۳). تعداد الل‌های مشاهده شده در برخی از جایگاه‌های ژنی بیشتر از تعداد گزارش شده برای ماهی کلمه اروپایی با استفاده از پرایمرهای مشابه بود (Hamilton and Tylor, 2007). این اختلاف ممکن است به علت تفاوت در تعداد نمونه‌ها باشد، اما می‌تواند حاکی از تنوع ژنتیکی بالاتر در جمعیت‌های کلمه مورد بررسی در این تحقیق نیز باشد. هتروزیگوسیتی نیز به عنوان معیاری از سنجش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، مورد توجه اکولوژیست‌ها و آبزی‌پروران است (Xu *et al.*, 2001). متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جمعیت‌های مورد بررسی به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۸۴ به دست آمد (جدول ۳).

به طور کلی، تنوع اللی و ژنی در جمعیت‌های مورد بررسی کلمه در این تحقیق، بسیار نزدیک به سطح تنوع موجود برای ماهیان آنادروموس (Dewoody and Avis, 2000) به دست آمد. این مطلب، بیانگر آن است که به‌رغم مسایلی همچون تکثیر مصنوعی ماهی کلمه، فشار صید و جمعیت بسته دریای خزر، تنوع ژنتیکی این ماهی ارزشمند هنوز هم در سطح قابل قبولی قرار دارد. به نظر می‌رسد تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به طبیعت، هنوز اثر درخور توجهی روی سطح تنوع ژنتیکی ماهی کلمه نداشته است. با وجود این، با توجه به این حقیقت که بازسازی ذخایر این ماهی از طریق تکثیر مصنوعی در حال انجام بوده، در آینده نیز ادامه خواهد یافت، ایجاد تدابیری برای حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده و اجتناب از مشکلات حاصل از درون‌آمیزی و برون‌آمیزی ضروری به نظر می‌رسد.

در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini *et al.*, 2006). با توجه به این که تعادل هاردی- واینبرگ بر اساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت است، بنابراین، ما

Archive of SID

www.SID.ir

انتظار عدم تعادل را در در جمعیت‌های پرورشی و یا بهگزینی شده داریم (Dixon *et al*., 2008). در این بررسی، ۱۰ مورد از ۲۰ تست ممکنه (۱۰ جایگاه ژنی × ۲ منطقه) پس از اعمال ضریب تصحیح، انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند (جدول ۳). در این مورد، در بررسی شاخص Fis، جایگاه‌های ژنی CypG3، CypG27، Lid1، Rru4 و Z21908 در منطقه گرگانرود و جایگاه‌های ژنی CypG27، CypG30، Rru4 و Z21908 در منطقه خلیج گرگان کسری هتروزیگوسیتی معنی‌داری نشان دادند (جدول ۳). دلایل بیولوژیک چنین کسری به خوبی شناخته نشده و فاکتورهای زیادی، همچون بهگزینی، اثر وهلاند، درون‌آمیزی و الل‌های نول برای توجیه آن مطرح است. جدا از دلایل بیولوژیک معمول در ایجاد کسری هتروزیگوسیتی، مایکروستلایت‌ها به طور خاص مستعد این پدیده هستند (Diz and Presa, 2009).

Xu و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز وجود الل‌های نول را عامل عمده کسری هتروزیگوسیتی عنوان نمودند. در واقع، وجود الل‌های نول در ماهی پدیده‌ای کاملاً عادی است و وجود این الل‌ها در توارث ریزماهواره‌ها در ماهیان تأیید گردیده است (Rodzen and May, 2002). نتایج حاصل از نرم‌افزار Microchecker نیز امکان وجود الل نول را در اکثر جایگاه‌های ژنی که کسری هتروزیگوسیتی بالا نشان دادند، تأیید نمود. همچنین با توجه به تکثیر مصنوعی ماهی کلمه، درون‌آمیزی و بهگزینی نیز می‌تواند عامل مهمی محسوب گردد. روی هم رفته، انحراف از تعادل را نمی‌توان تنها با یک عامل توجیه نمود و مجموعه‌ای از عوامل که بیشتر ناشی از تکثیر مصنوعی ماهی کلمه در مناطق مورد بررسی هستند، می‌توانند دلایلی برای کسری 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 جمعیت‌هاست (Grassi *et al*., 2004). آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ٪۹۸ تنوع در درون جمعیت‌ها و تنها ٪۲ تنوع در بین جمعیت‌ها وجود دارد (جدول ۵). میزان Fst و Rst نیز به عنوان شاخص‌های تمایز به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۰۱۸ به دست آمد که نشان از وجود تمایز پایین بین مناطق مورد بررسی است. مقادیر Fst و Rst حاصل از آنالیز واریانس مولکولی معمولاً با یکدیگر مشابه بوده، درحالی که Slatkin (۱۹۹۵) عنوان داشت که برای ریزماهواره‌ها، میزان Rst می‌تواند بیشتر از Fst باشد. اما تحت شرایط بالا بودن نرخ مهاجرت، مقادیر این دو شاخص معمولاً نزدیک به هم هستند. پایین بودن شاخص‌های تمایز و تنوع بین جمعیت‌ها نشان‌دهندهٔ وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌هاست (Pinera *et al*., 2007). نتایج این بررسی نیز حاکی از وجود جریان ژنی بالا بین مناطق مورد بررسی است (جدول ۴). در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز فاصله ژنتیکی نسبتاً پایینی بین مناطق مورد بررسی مشاهده شد. در صورت نبود جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها، انتظار می‌رفت تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

بین آنها ایجاد گردد. جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی بین مناطق باشد، اما بالا بودن مقدار آن در این بررسی می‌تواند ناشی از روش رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر نیز باشد که در این روش لاروهای به دست آمده را بدون توجه به محل صید مولدین در مکان‌های مختلف رهاسازی می‌کنند که این امر به ازدیاد جریان ژنی در بین مناطق و کاهش تنوع و تمایز ژنتیکی بین آن‌ها منجر می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار دارد، با وجود این، با توجه به برنامه بازسازی ذخایر ماهی کلمه از طریق تکثیر مصنوعی، ایجاد تدابیری در خصوص حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده و اجتناب از مشکلات درون‌آمیزی و برون‌آمیزی ناشی از تکثیر مصنوعی و درنتیجه کاهش بقای آن‌ها در طبیعت و از دست رفتن تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی ضروری به نظر می‌رسد. در این خصوص بهترین روش، احیای محل‌های تخم‌ریزی طبیعی این گونه ارزشمند و فراهم نمودن شرایط لازم برای ورود مولدین به این مناطق است و در صورت نیاز به تکثیر مصنوعی نیز به کارگیری تدابیری، همچون استفاده از حداکثر تعداد مولدین و همچنین نسبت‌های جنسی برابر به منظور جلوگیری از کاهش اندازه مؤثر جمعیت ضروری است.

منابع

Angers, B. and 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. Molecular Biology Evolution 15: 143-159.

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.

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.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, G. M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Animal Biochemistry 84: 680-683.

Cross, T. F., Galvin, P. and Mcginnitty, P. (1998) Genetic considerations in stocking of Atlantic salmon, *Salmo salar*. In: Stocking and Introduction of Fish (ed. Cowx, I. G.). Hull International Fisheries Institute 355-370.

Dewoody, J. A. and Avise, J. C. (2000) Microsatellite variation in Marin, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. Journal of Fish Biology 56: 461-473.

Archive of SID

www.SID.ir

Dimsoski, P., Toth, G. P. and Bagley, M. J. (2000) Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). Molecular Ecology 9: 2187-2189.

Dixon, T. J., Coman, G. J., Arnold, S. J., Sellars, M. J., Lyons, R. E., Dierens, D., Preston, N. P. and Li, Y. (2008) Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. Aquaculture 283: 1-6.

Diz, P. A. and 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. Canadian Association of Business Incubation Publishing, London.

Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

Grassi, F., Imazio, S., Gomarasca, S., Citterio, S., Aina, R., Sgorbati, S., Sala, F., Patrignani, G. and Labra, M. (2004) Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science 166: 1437-1441.

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 Resources 8(2): 462-465.

Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Nielsen, E. E. and Mensberg, K. D. (2000) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). Molecular Ecology 9: 583-594.

Hillis, D. M., Mortiz, C. and Mable, B. (1996) Molecular systematics. 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland.

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.

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.

Liu, Z. (2007) Aquaculture Genome Technologies. Blackwell Publishing, Oxford.

Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Natali, M. and Panara, F. (2006) Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius*). Fisheries Research 80: 251-262.

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.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 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 D.C.

Nelson J. (1994) Fishes of the World. 3rd ed., John Wiley and Sons, NewYork.

Archive of SID

www.SID.ir

Norris, A. T., Bradley, D. G. and Cunningham, E. P. (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture 180: 247-264.

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.

Pinera, J. A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J. A. (2007) Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations in Spanish Coasts: a preliminary study. Marine Biology 151:2153-2158.

Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223-225.

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

Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462.

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

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535-538.

Wang, C., Yu, X. and Tong, J. (2007) Microsatellite diversity and population genetic structure of redfin culter (*Culter erythropterus*) in fragmented lakes of the Yangtze River. Hydrobiologia 586: 321-329.

Yeh, F. C., Yang, R. C. and Boyle, T. (1999) POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-bases Freeware for population Genetic Analysis. University of Alberta, Canada.

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

Zar, J. H. (1999) Biostatistical analysis, 4th ed., Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey.

Archive of SID

www.SID.ir