تنوع ژنی و رابطه فیلوژنی دو گونه از جنس *Rutilus* در سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس توالی یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی

فریدون چکمه دوز قاسمی*[1]، شهرام بهمنش[1]

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

تاریخ دریافت: ۱۱ اسفند ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۲۰ تیر ۱۳۹۴

چکیده

رابطه فیلوژنی دو گونه مهم و اقتصادی از جنس *Rutilus* متعلق به خانواده کپورماهیان شامل ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) سواحل جنوبی دریای خزر به‌منظور اثبات وجود رابطه خواهری مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری از باله دمی، استخراج DNA به روش PCR با بخشی از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی و روش توالی یابی DNA انجام شد. تعدادی از شاخص‌های تنوع مولکولی و ترسیم درخت‌های فیلوژنی neighbor-joining مدل maximum-likelihood و maximum-parsimony با ۱۰۰۰ تکرار جهت تجزیه و تحلیل، استفاده شد. ۱۴ هاپلوتایپ بدست آمد، تنوع هاپلوتایپی (hd) بین دو گونه ۰/۷۶۱ بود، ۱۱۴ مکان مختلف در کل توالی‌ها به‌دست آمد. میانگین فاصله ژنتیکی بین دو گونه ۰/۰۹ بود. همچنین درخت‌های فیلوژنی ترسیم شده هر دو گونه در دو شاخه مجزا از هم قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که: تنوع ژنتیکی در هر یک از این دو گونه بالا ست و ارتباط نزدیک یا رابطه خواهری بین آنها وجود ندارد.

کلمات کلیدی: سواحل جنوبی دریای خزر، *Rutilus*، تنوع ژنی، رابطه فیلوژنی، ژن سیتوکروم *b*.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). chakmehdouz13@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

مقدمه

خانواده کپورماهیان جزء بزرگترین گروه ماهیان دنیا می باشند. تاکنون حدود ۲۱۰ جنس از این خانواده شناسایی شده و۲۰۱۰ گونه نیز دارای پراکنش جهانی می‌باشند (Nelson, 1994). به دلیل وجود تعداد زیاد جنس و گونه، تعیین یک ساختار فیلوژنی مشخص برای این خانواده مشکل می‌باشد. در گذشته بیشتر مطالعات برای طبقه‌بندی کپورماهیان بر مبنای روش‌های مورفومتریک و مریستیک بوده است ولی با پیشرفت روش‌های ژنتیکی تکنیک‌های مولکولی بر پایه DNA میتوکندریایی جایگزین روش‌های قبلی شده است (Howes, 1991; Zardoya and Doadrio, 1999; Tesigenopoulos *et al*., 2002; Shunping *et al*., 2008) ژنوم میتوکندریایی اکثر جانوران دارای ۳۷ ژن شامل ۱۳ ژن کد کننده پروتئین، ۲ ژن ریبوزومال (rRNA) و ۲۲ ژن انتقال‌دهنده RNA (tRNA) مورد نیاز برای ترجمه پروتئین، می‌باشد (Boore, 1999). میتوکندری همچنین دارای یک ناحیه اصلی غیر کد کننده شامل مکان‌های اولیه برای تکثیر DNA میتوکندریایی و رونویسی RNA میتوکندریایی می باشد. نرخ سریع تکامل میتوکندری تقریبا ۱۰ – ۵ برابر ژنوم هسته‌ای بوده، که از طریق مادری به ارث رسیده و در طول دوره تکاملی با چند استثناء بدون تغییر باقی مانده است (Boore, 1999; Habib *et al*., 2011). بطور کلی نشانگرهای میتوکندریایی بدلیل دستیابی به داده‌ها و قدرت تجزیه و تحلیل آن‌ها برای مطالعات تکاملی بین جانداران و ژنوم آن‌ها بسیار مناسب می‌باشد (Boore, 1999; Curole and Kocher, 1999). جنس *Rutilus* دارای پراکنش جهانی بوده و در دریای خزر دو زیرگونه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) و ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) از این جنس زیست می‌کنند که در بین ذخایر ماهیان استخوانی سواحل جنوبی از گونه‌های با ارزش و اقتصادی محسوب شده و از سال‌های گذشته تا حال به دلیل لذیذ بودن، و کیفیت عالی گوشت در سبد غذایی ساکنین اکثر استان‌های ساحلی و غیرساحلی قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر عواملی مثل ورود آلودگی‌های صنعتی و شهری به رودخانه‌ها، تغییر شرایط زیست محیطی محل های مهاجرت طبیعی، کاهش دبی آب رودخانه‌ها در فصل مهاجرت و عدم توجه به بازسازی ذخایر جمعیت های مختلف، سبب کاهش ذخایر ماهی کلمه شده است. این عوامل در سواحل جنوبی دریای خزر و سایر نقاط جهان سبب شده تاگونه‌های مختلف جنس ماهی کلمه در لیست گونه‌های در معرض خطر انقراض IUCN قرار گیرند (Kiabi *et al*., 1999; Crivelli, 2006; Freyhof and Kottelat, 2008). اعمال مدیریت صحیح ذخایرآبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بودکه ذخایر ژنتیکی گونه‌های بومی منطقه بطور دقیق و بر مبنای اصول ژنتیکی شناسایی گردد (Lin *et al*., 2002) و قبل از اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی ضرورت دارد تا ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مربوطه را شناسایی و با روش‌های مولکولی مورد ارزیابی قرارداده و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن تدوین و اعمال نمود (رضوانی،۱۳۸۰). در میان روش-های مولکولی، توالی‌یابیDNA یکی از روش‌های نوین و دقیق مولکولی می‌باشدکه دراکثرآزمایشگاه‌های شیلاتی وتحقیقاتی جهان به‌منظور بررسی‌های خویشاوندی، جمعیتی و ساختار ژنتیکی انواع گونه‌های ماهیان و سایرآبزیان مورد استفاده قرار

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

می‌گیرد. گروهی از محققین با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی، کاریوتایپی و استخوان‌شناسی کپورماهیان را به زیر گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی نموده‌اند (Berg, 1912-1914; Arai, 1982) اما بسیاری از این تقسیم‌بندی‌ها درستی نظریه تکاملی را تایید نمی‌کنند. همزمان با پیشرفت و توسعه انواع روش‌های مولکولی، طبقه‌بندی ماهیان بخصوص کپورماهیان به‌صورت گسترده‌ای به‌منظور بررسی روند تکاملی آن‌ها انجام گردید که در این مورد می‌توان به مطالعات Gilles و همکاران در سال ۱۹۹۸ با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16SrRNA، بررسی‌های Simons و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش توالی‌یابی ژن cytochrome *b* میتوکندریایی و مطالعات He در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش RAPD ژنوم هسته‌ای بر روی کپورماهیان اشاره نمود.

سواحل جنوبی دریای خزر دارای رودخانه‌های متعددی می‌باشد که اکثرا محل مهاجرت و تخمریزی ماهیان مهاجرمی‌باشند. ماهی سفید و ماهی کلمه در سواحل جنوبی دریای خزر دارای زمان مهاجرتی و تولید مثلی نزدیک به یکدیگر می‌باشند (اواخراسفند الی خرداد) و احتمال تولید هیبریدهای طبیعی بین این دو جنس می‌تواند ایجاد شود. به همین دلیل و به‌منظور اطلاع از این موضوع و با توجه به کاربرد وسیع ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی در بین محققین در جهت بررسی‌های تکاملی گروه‌های مختلف ماهیان (McVeigh and Davidson, 1991; Delin *et al.*, 2006)، ساختار ژنی، رابطه تکاملی و احتمال وجود رابطه خواهری بین جمعیت‌های دو گونه مهم از جنس *Rutilus* مهاجر به رودخانه‌های سواحل جنوبی دریای خزر برای اولین بار از ژن *b* cytochrome میتوکندریایی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ نمونه‌های ماهی کلمه از رودخانه لمیر در قسمت جنوب غربی و بندرترکمن در قسمت جنوب شرقی دریای خزر (جمعا ۱۷ نمونه) و ماهی سفید از رودخانه‌های لمیر، سفیدرود و شیرود (جمعا ۲۹ نمونه) در سواحل جنوبی دریای خزر (شکل ۱) توسط صیادان محلی صید و مقداری از قسمت نرم باله دمی آن‌ها بریده و پس از قرار دادن داخل تیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی الکل ۹۶ درجه به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی بندر انزلی منتقل و قبل از شروع آزمایشات مولکولی به‌منظورعدم حذف احتمالی الکل داخل ویال و چروکیدگی بافت باله ناشی از آن، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

شکل ۱: رودخانه‌های نمونه‌برداری از ماهی کلمه و ماهی سفید

در آزمایشگاه DNA ژنومی بافت باله دمی نمونه‌ها با روش استات آمونیوم (McQuowen *et al.*, 2000) استخراج و مقدار ۱۰۰ میکرولیترآب مقطر استریل به DNA الگو جهت حل شدن اضافه و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور صحت

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

استخراج DNA و بررسی کیفیت آن‌ها از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. از بانک ژن NCBI توالی ثبت شده (AF095610) ژن Cytochrom*b* میتوکندریایی ماهی کلمه انتخاب و یک جفت آغازگر به توالی CCT CCC AAC ACC ATC TAA (forward, F55) و CTG AAT AGT AGT GCG AGG AC (reverse, R880) توسط نرم افزار Gene Runner طراحی شد. به‌طوریکه در چرخه PCR تولید باندهایی در محدوده ۸۵۰ – ۸۰۰ جفت باز نماید. برای هر نمونه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در داخل ویال ۰/۲ میلی‌لیتری روی یخ مواد زیر اضافه شد: DNA ۱۰۰ نانوگرم، PCR Buffer با غلظت 10 X (سیناژن، ایران)، $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، هر آغازگر با غلظت ۱۰ ماکرومول و آنزیم DNA *Taq* پلی-مراز با غلظت ۵u/µl (سیناژن، ایران)، آب مقطر استریل، حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. یک ویال جداگانه به‌عنوان کنترل منفی حاوی تمامی مواد بجزءDNA الگو در کنار بقیه نمونه‌ها PCR شد. واکنش PCR داخل دستگاه ترمال سایکلر BIOER مدل XP cycler (XP cyclergradient, 96 plus, Bioer, China) انجام شد و چرخه‌های حرارتی پس از بهینه سازی شامل: یک سیکل ۵ دقیقه‌ای به‌عنوان واسرشته‌سازی اولیه (initial denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل شامل ۶۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ سانیه دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای اتصال آغازگر (annealing)، ۶۰ ثانیه مرحله بسط (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی ژن تکثیری بود. به‌منظور بررسی تکثیر اندازه باند ژن مورد نظر و نیز کیفیت مناسب آن، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها برداشته و به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Fermentas GmbH, Germany) با ژل آگارز ۱ درصد حاوی ماده رنگی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و پس از مشاهده باند تکثیر شده در دستگاه ژل داکت دوربین‌دار متصل به رایانه، تعداد ۴۶ نمونه از محصول PCR (ماهی کلمه ۱۷ عدد، ماهی سفید ۲۹ عدد) به همراه مقداری از آغازگر forward بسته بندی و به شرکت ماکروژن ارسال شد که از آن‌ها پس از خالص سازی (Purify) به عنوان DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده گردید. واکنش توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر(forward) ژن سیتوکروم *b* با بسته BigDye (BigDye kit v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) و توسط دستگاه DNA analyzer مدل 3730XL (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

جهت تجزیه و تحلیل، اطلاعات نمونه‌های توالی‌یابی شده به‌صورت فایل‌های کروماتوگرام دریافت و تجزیه و تحلیل آماری آنها به‌صورت زیر انجام گردید: نمونه‌های کروماتوگرام با نرم افزار Chromas 2.23 بازنگری و سپس با نرم‌افزار Clustal W (Thompson *et al*., 1997) هم‌ردیف (Aligne) شد. تعداد هاپلوتایپ‌ها، مکان‌های چندشکلی (variablesites)، تنوع هاپلوتایپی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei(1978)، میانگین فاصله ژنتیکی بر اساس مدل ML و ترسیم درخت‌های فیلوژنی neighbor-joining مدل maximum-likelihood (Saitou and Nei, 1987) وmaximum-parsimony با ۱۰۰۰ تکرار (Tamura, 1992) جهت معنی‌دار بودن آنالیز آماری درخت فیلوژنی. آنالیز تمامی داده‌های

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزارهای Mega4، Arlequin 3.1 (Excoffier *et al*., 1992) و Dna SP (Rozas *et al*., 2003) انجام گردید.

نتایج

توالی ۴۶ نمونه ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه و سفید پس از بازنگری در نرم‌افزار Mega4 و تحت شبکه NCBI به اندازه ۷۰۵ باز (bp) هم‌ردیف (Aligne) و توالی ژن یک نمونه از هر منطقه در بانک ژن NCBI ثبت شد (KF056854 کلمه ترکمن، KF056855 کلمه لمیر، KF056856 ماهی سفید شیرود، KF056857 ماهی سفید سفیدرود، KF056858 ماهی سفید لمیر). هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین دو گونه مشاهده نشد و بیشترین تعداد هاپلوتایپی متعلق به گونه کلمه بود (جدول ۱). ۱۱۴ جایگاه ژنی متغییر و تنوع هاپلوتایپی بین دو گونه ۰/۷۶۱ محاسبه گردید، میانگین فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه ۰/۰۹ بود، تنوع هاپلوتایپی مناسب به‌دست آمده نشان از تنوع ژنتیکی بین این دو گونه از جنس *Rutilus* در مناطق مورد مطالعه سواحل جنوبی دریای خزر بود.

جدول ۱: تعداد و پراکنش هاپلوتایپی ژن سیتوکروم *b* بین ماهی کلمه و ماهی سفید

هاپلوتایپ / گونه	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
ماهی کلمه	۱	۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	–	–	–	–
ماهی سفید	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۴	۲۱	۳	۱

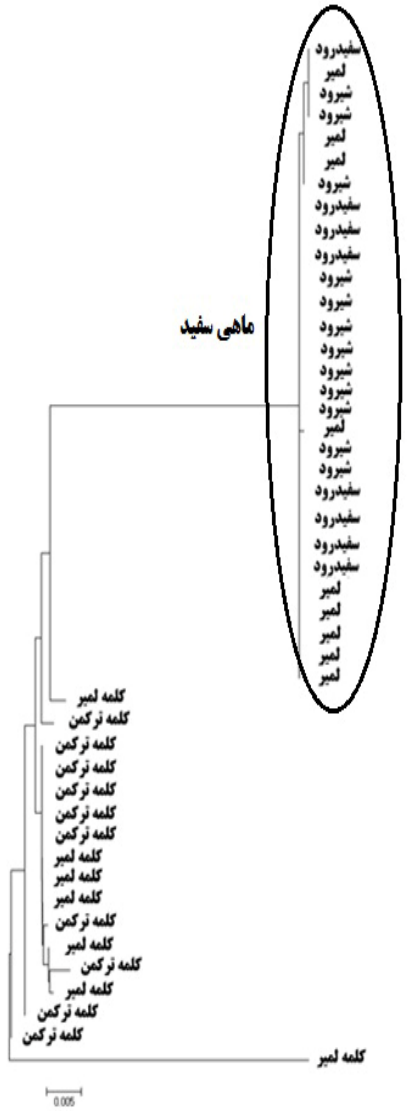
در ترسیم درخت فیلوژنی Neighbor-Joining (شکل ۲) تمامی نمونه‌های ماهی سفید در یک شاخه یا کلادوگرام مجزا و بلندتری از نمونه‌های توالی‌یابی شده ماهی کلمه قرار داشتند. در ترسیم درخت فیلوژنی Maximum parsimony (شکل ۳) حد معنی‌دار بودن آماری، جدا بودن نمونه‌های ماهی سفید از نمونه‌های ماهی کلمه در یک شاخه مجزا، با درصد بسیار بالایی (۱۰۰ درصد) مورد تائید قرار گرفت و این مسئله حاکی از عدم وجود رابطه خواهری بین این دو گونه بود.

بحث

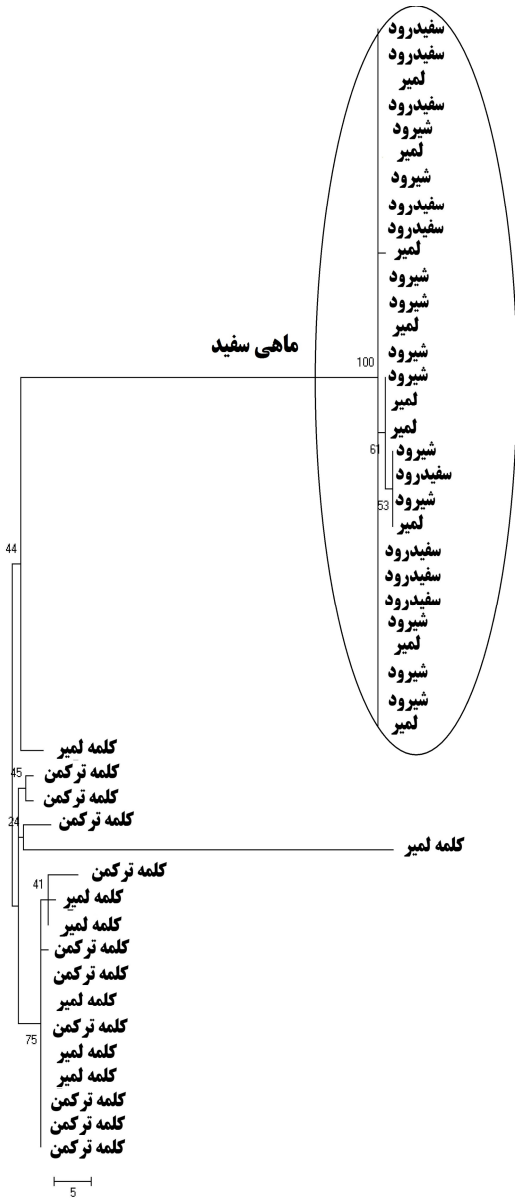
مطالعه حاضر به‌منظور بررسی رابطه فیلوژنی جمعیت‌های دو گونه مهم و اقتصادی ازجنس *Rutilus* که در فاصله زمانی نسبتا نزدیکی جهت تخمریزی به رودخانه‌های سواحل جنوبی دریای خزر مهاجرت می کنند، با بخشی از ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی و روش توالی یابی DNA انجام گردید. دردهه‌های اخیرتحقیقات بر روی ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف آبزیان با استفاده از روش‌های نوین مولکولی در بیشترکشورهای جهان رایج شده و استفاده از نتایج آن‌ها سبب اعمال مدیریت علمی و صحیح در راستای ازدیاد ذخایرآبزیان و نیز افزایش تولید در صنعت آبزی‌پروری شده است. اطلاع و آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی و جمعیتی گونه‌های آبزیان و برخورداری از تکنیک‌های سریع و قابل اعتماد برای تعیین میزان خویشاوندی بین‌گونه‌ای و درون گونه‌ای راه‌گشای بسیار مناسبی جهت تصمیم‌گیری مدیران اجرایی می باشد(Palumbi *et al*., 1991).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]



شکل ۲: درخت فیلوژنی ژن سیتو کروم *b* بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه به روش Neighbor- Joining



شکل۳: درخت فیلوژنی ژن سیتو کروم *b* بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه به روش Maximum parsimony

زمانی‌که گونه خاصی از ماهیان قرار است به‌عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود اطلاع از ساختار ژنتیکی، جمعیتی و رابطه خویشاوندی با سایر گونه‌های هم‌جنس آن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در احیای ذخایر شیلاتی آن‌ها بکار گرفته شود (Seeb *et al.*, 1990). بر اساس نتایج این تحقیق تنوع هاپلوتایپی بسیار بالایی بین این دو جنس به‌دست آمد. تعداد هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده از نمونه‌های دو گونه و عدم اشتراک آنها با یکدیگرمی‌تواند به این دلیل باشد که گونه ماهی سفید مهاجرت تولید مثلی خود به این رودخانه‌ها را زودتر از گونه ماهی کلمه که از اواخراسفند الی اواسط اردیبهشت شروع می‌شود، انجام می‌دهد (Derzhavin, 1934). بطورکلی در دهه‌های گذشته سیاست‌های بازسازی ذخایر ماهی سفید در

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

رودخانه‌ها بر اساس تکثیر مصنوعی بوده و نقش تکثیر طبیعی به صفر رسیده است و این عامل می‌تواند توضیحی مبنی بر عدم وجود هاپلوتایپ‌های مشترک بین این دو گونه و به‌دلیل عدم ایجاد تلاقی طبیعی در رودخانه‌ها و در فصول مهاجرت تولیدمثلی باشد. Ketmeier و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی ساختار ژنتیکی و فایلوژنتیکی جنس *Rutilus* از خانواده کپورماهیان با ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی و روش توالی‌یابی DNA پرداختند. در بررسی آن‌ها با توجه به اینکه مشخصات مورفومتریک و مریستیک متفاوتی بین دو گونه *Rutilus caspicus* و *Rutilus frisii* وجود داشت فاصله ژنتیکی بسیار کمی بین آن‌ها به‌دست آوردند. عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) روابط فیلوژنی باربوس‌ماهیان جنوب ایران را با روش توالی‌یابی ژن سیتوکروم *b* مورد مطالعه قرار دادند. در دندوگرام رسم شده ایشان که به روش‌های Neighbor-Joining و maximum-parsimony انجام شد مشخص گردید که دو گونه *Schizothoraxzarudnyi* و *Schizocyprisaltidorsalis* در ارتباط نزدیک به‌هم یعنی در یک گروه خواهری قرار داشته و هم‌گروه با گونه *Barbussharpeyi* قرار دارند. Miranta و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی ساختار ژنی و روابط تکاملی جنس *Rutilus* در پانزده نواحی جنوبی دریاچه بالکان پرداختند و برای دانستن این مسئله که آیا نمونه‌های کلمه منطقه بالکان با نمونه‌های کلمه دریای خزر قرابت دارند، از هاپلوتایپ‌های جنس *Rutilus* دریای خزر (Ketmaier *et al*., 2008) و دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه ثبت شده در بانک ژن NCBI استفاده نمودند. در ترسیم درخت فیلوژنی گونه‌های ماهی سفید و ماهی کلمه دریای خزر در یک خوشه قرار گرفتند که این مسئله با توجه به اینکه این دو گونه از لحاظ بسیاری از پارامترهای مورفولوژیکی دارای اختلاف می باشند (Kottelat and Freyhof, 2007) برای ایشان تعجب آور بود. ایشان با مشاهده هاپلوتایپ‌های تایید نشده موجود در بانک ژن احتمال دادند که نزدیکی گونه‌های ماهی سفید و کلمه دریای خزر می‌تواند به خاطر ادغام ژنوم میتوکندریایی این دو گونه به دلیل ایجاد هیبریداسیون بین آنها بوده باشد. در واقع وقوع هیبریداسیون و ادغام ژنوم میتوکندریایی در خانواده کپورماهیان یک پدیده معمولی و مشترک می باشد به‌طوری‌که در مطالعه Larmuseau و همکاران (۲۰۰۹) ادغام ژنوم میتوکندریایی ماهی سفید در ماهی کلمه و ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در ماهی کلمه گزارش شده است. در مطالعه حاضر میانگین فاصله ژنتیکی بین این دو گونه که از لحاظ مشخصات مورفولوژیکی دارای تفاوت‌های بسیار زیادی با یکدیگر می باشند کم به‌دست آمد (۰/۰۹) و این عامل با توجه به تنوع هاپلوتایپی بالا بین آنها کمی گیج کننده بوده و نمی توان دلیل قانع کننده‌ای برای آن اعلام نمود. هرچند که نتایج به‌دست آمده از توالی‌های ژن سیتوکروم *b* این بررسی دقیق می باشد ولی این اطلاعات بر اساس بخشی از ژنوم میتوکندریایی است که از طریق مادری به ارث می‌رسد، بدیهی است که برای اثبات این مسئله که آیا این دو گونه از یک دودمان یا دودمان‌های مختلفی هستند، نیاز به بررسی‌های بیشتر با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و سایر مارکرهای مولکولی میتوکندریایی و DNA هسته‌ای در کنار سایر نمونه‌های مناطق مختلف جهان می باشد تا اطلاعات دقیق و جامعی از وضعیت جمعیتی و زیستی آن‌ها به‌دست آمده و مسئولین شیلاتی با اعمال سیاست‌های دقیق‌تر علمی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

مبنی بر حفظ و احیای ذخایر جمعیت‌های این دو گونه منحصر به فرد سواحل جنوبی دریای خزرو درصورت لزوم با ایجاد دو رگه‌های جدید از آن‌ها گونه جدیدی را به صنعت آبزی پروری معرفی نمایند.

Bogutskaya و Lliadou (۲۰۰۶) با استفاده از بررسی‌های مورفولوژیکی نتوانستند دو گونه *Rutilusfrissi* و *Rutiluspigus* را در یک خوشه از دندوگرام فایلوژنتیکی قرار دهند درحالی‌که بنظر می‌رسید این دو گونه از یک زیر جنس (*Pararutilus*) بودند. در دندوگرام حاصل از روش Neighbor-Joining این بررسی، دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه در دو خوشه کاملا مجزا از یکدیگر قرار گرفتند که نشان از عدم ارتباط نزدیک با یکدیگر بود (رابطه خواهری) و دندوگرام حاصل از روش Maximum parsimony با ۱۰۰۰ تکرار و درصد بالایی آن را تائید نمود. در واقع تغییرات اکولوژیکی در سواحل جنوبی دریای خزر و تخریب رودخانه‌های مهم مهاجرت ماهیان، صید بی‌رویه و کاهش ذخایر ماهی کلمه و نیز تاثیر عوامل انسانی مبنی بر بازسازی ذخایر ماهی سفید تنها از طریق تکثیر مصنوعی طی دهه‌های اخیر می‌تواند ناشی از این مسئله باشد. در واقع تاثیر عوامل انسانی در راستای تغییر تنوع ژنتیکی در جنس *Rutilus* بیان شده است (Bianco and Ketmaier, 2001).

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان عنوان نمود که ماهی سفید و ماهی کلمه سواحل جنوبی دریای خزر از تنوع ژنتیکی خوبی برخوردارند، هرچند که هر دو گونه از یک جنس هستند ولی هیچگونه ارتباط نزدیک یا خواهری بین آن‌ها مشاهده نگردید. بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیران شیلاتی مبنی بر احیاء ذخایر این دو گونه مثمر ثمر بوده و در صورت نیاز با ایجاد دورگه‌های آن‌ها گونه جدیدی را به صنعت آبزی‌پروری معرفی نمایند.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. رضوانی گیل کلایی، س.، بابایی، س.ع.،پورکاظمی، م.، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP. مجله علمی شیلات ایران، ۲، ۳۰ – ۱۵.

۲. عزیزی، م.ر.، قرایی، ا.، غفاری، م.، ۱۳۹۱. بررسی روابط فیلوژنی باربوس‌ماهیان جنوب ایران بر اساس توالی ژنی سیتوکرم *b*. ژنتیک نوین، ۸(۳)، ۳۲۰-۳۱۳.

3. Arai, R., 1982. A chromosome study on two Cyprinid Fishes, *Acrossocheiluslabiatus* and Pseudorasbora*pumilapumila*, with notes on Eurasian Cyprinids and their karyotypes. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo Ser. A 8, 131–152.
4. Berg, L.S., 1912–1914. Faune de la Russie, etc.Poissons. St. Petersburg, Petrograd 3 (1–2), 189–288.
5. Bogutskaya, N.G. and Iliadou, K. 2006. *Rutiluspanosi*, a new roach from Western Greece (Teleostei: Cyprinidae). ZoosystematicaRossica, 14, 293–298.
6. Bianco, P.G., Ketmaier, V., 2001. Anthropogenic changes in the freshwater fish fauna of Italy, with reference to the central region and *Barbusgraellsii*, a newly established alien species of Iberian origin. Journal of.Fish Biology, 59,190–208.
7. Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes, Nucleic Acids Res, 27, 1767-1780.
8. Crivelli, A.J., 2006. *Rutilusprespensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01October 2013.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

9. Curole, A.P., Kocher, T.D., 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes, Trends Ecol, 14, 394-398.
10. Delin, Q., Taiping, L., Xinquan, Z., Songchang, G.,Junxiang, L., 2006. Mitochondrial cytochrome *b* Sequence Variation and Phylogenetics of the Highly Specialized Schizothoracine Fishes (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibet Plateau. Biochemical Genetics, 44, 270-285.
11. Derzhavin, J.V., 1934. Freshwater fishes of the southern shore of the Caspian Sea.Nauk SSSR, SektorZoologii, Baku, 7 91-126. In Russian. Abstract to English.
12. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131, 479–49.
13. Freyhof, J., Kottelat, M., 2008.*Rutilusylikiensis*.*Rutiluspanosi*.*Rutilusrutilus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species.Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 October 2013.
14. Gilles, A., Lecointre, G., Faure, E., Chappaz, R.,Brun, G., 1998. Mitochondrial phylogeny of the European cyprinids: implications for their systematics, reticulate evolution, and colonization time. MolecularPhylogenet, E 10(1), 132–143.
15. Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A.S., Singh, A., Khan, A.A., 2011. Evaluation of cytochrome *b*mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channamarulius* (Channidae: Perciformes). Molecular Biology Reports, 38, 841-846.
16. He, S., 2000. The phylogeny of primitive cyprinidae by the method of RAPD, Act. Hydrobiol, 2000, 24(2), 101.
17. Howes, G.J., 1991. Systematics and biogeography: an overview. In: Winfield, I.J., Nelson, J.S. (Eds.), Biology of Cyprinids. Chapman and Hall Ltd., London, 1–33.
18. Ketmaier, V., Bianco, P.G., Durand, J.D., 2008.Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 49, 362–367.
19. Kiabi, B.H., Abdoli, A., 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.
20. Kottelat, M., Freyhof, J., 2007.Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
21. Larmuseau, M.H., Freyhof, D.J., Volckaert, F.A.M., Van Houdt, J.K.J., 2009. Matrilinear phylogeography and demographical patterns of *Rutilusrutilus*: implicationsfor taxonomy and conservation. Journal of Fish Biology, 75, 332–353.
22. Lin, Y.S., Poh, Y.P., Lin., S.M.,Tzeng, C.S., 2002. Molecular techniques to identify freshwater Eels. Zoological studies, 41(4), 421-430.
23. McQuown, E., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., May, B., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in Sturgeon (Acipenseridae): new primer sequence for Scaphirhychus and Acipenser. Trans. American Fish Sociaty, 129, 1380-1388.
24. McVeigh, H.P., Davidson, W.S., 1991. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. Fish Biology, 39, 277-28.
25. Miranta, T., Andreas, G., Ioannis, A. G., Ioannis, L., Apostolos, P. A., 2014. Phylogenetic relationships among Southern Balkan *Rutilus*species inferred from cytochrome *b* sequence analysis: Micro-geographic resolution and taxonomic implications.Biochemical Systematics and Ecology, 54, 172–178.
26. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals.Genetics, 89, 583-590.
27. Nelson, J.S., 1994. Fishes of the World. John Wiley and Sons, Inc., New York.
28. Palumbi, S., Martin, R.A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's Guide to PCR, Version 2. University of Hawaii Zoology Department, Honululu.
29. Rozas, J., Sa´nchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X.,Rozas, R., 2003.DnaSP, DNA polymorphism analyses by thecoalescent and other methods. Bioinformatics, 19, 2496–2497.
30. Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425.
31. Seeb, L.W., Seeb, J.E., Polovina, J.J., 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirusmarginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. Fish Bull, 88, 713–718.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]

32. Simons, A.M., Knott, K.E., Mayden, R.L., 2000. Assessment of monophyly and evolution of nest association in the minnow genus Pteronotropis (Teleostei: Cyprinidae). Copeia 2000, 4, 1068–1075.
33. Shunping, R., Mayden, L., Xuzheng, W., Wei, W., Kevin, L., Tang, W.,Weijen, C.,Yiyu, C., 2008. Molecular hylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal proteincoding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family, Molecular Phylogenetics and Evolution, 46, 818–829.
34. Tamura, K., 1992.Estimation of the number of nucleotidesubstitutions when there are strong transition-transversionand G+C content biases. Molecular Biology and Evolution, 9, 678-687.
35. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid. Res, 24, 4876–4882.
36. Tsigenopoulos, C.S., Rab, P., Naran, D.,Berrebi, P., 2002, Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers, Heredity, 8, 466–473.
37. Zardoya, R., Doadrio, I., 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. Journal of Molecular Evolutionary, 49, 227–237.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.3.3.0]