ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) سواحل جنوبی دریای خزر و دریاچه پشت سد ارس با استفاده از روش توالی‌یابی DNA (DNA sequencing)

مریم شریفی[۱]، پریسا نجاتخواه معنوی[۱]، فریدون چکمه دوز قاسمی*[۲]، شهرام بهمنش[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، صندوق پستی: ۱۹۸۷۹۷۳۱۳۳

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

تاریخ دریافت: ۷ اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۶ مهر ۱۳۹۵

چکیده

ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) دریاچه پشت سد ارس و دو منطقه آستارا در غرب و بندر ترکمن در شرق سواحل جنوبی دریای خزر با ژن سیتوکروم *b* و روش توالی‌یابی DNA انجام شد. روش کار شامل نمونه‌برداری از باله دمی، استخراج DNA، PCR و توالی‌یابی بود. جهت تجزیه و تحلیل، شاخص‌های تنوع مولکولی، شاخص توزیع شکل گاما، شاخص F_{st} که نشان‌دهنده جدایی جمعیت‌ها می‌باشد، آزمون دقیق فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت‌ها، گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی با دو روش تست تاجیما و تست Fu F_s مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۸ هاپلوتایپ به دست آمد، شاخص توزیع شکل گاما ۰/۱۹ و نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه بود. مقدار F_{st} در سطح احتمال ۰/۰۵ بین سه جمعیت ۰/۱۲ بود که تنها جمعیت منطقه دریاچه پشت سد ارس با دو منطقه آستارا و بندر ترکمن معنی‌دار بود و آزمون تفاوت در داخل جمعیت‌ها این مسئله را مورد تأیید قرار داد. تاریخچه جمعیتی ماهی کلمه غیر معین و شبیه به مدل بسط ناگهانی بود و مقدار کم شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱) آن را تأیید نمود. آزمون‌های بی‌طرفی تاجیما و شاخص Fu F_s بین مناطق به‌ترتیب ۲/۳۶- و ۴/۰۴۶- بود که هر دو شاخص منفی و معنی‌دار بودند. نتایج نشان داد که جمعیت ماهی کلمه دریاچه پشت سد ارس یک خزانه ژنی مستقل می‌باشد و با توجه به یکسان بودن جمعیت‌ها در دو منطقه سواحل جنوبی دریای خزر، بایستی مدیریت شیلاتی در راستای افزایش تنوع ژنتیکی و زیستی جمعیت‌های ماهی کلمه این مناطق اعمال گردد.

کلمات کلیدی: ماهی کلمه، سواحل جنوبی دریای خزر، دریاچه پشت سد ارس، ساختار ژنتیکی و جمعیتی، توالی‌یابی DNA.

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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

مقدمه

دریای خزر با وسعت ۳۷۳۳۰۰۰ کیلومتر مربع از بزرگترین دریاچه جهان بوده که یک مخزن آبی مشترک با پنج کشور، جمهوری اسلامی ایران، جمهوری آذربایجان، فدراتیو روسیه، جمهوری قزاقستان و ترکمنستان می‌باشد و دارای بیش از ۱۱۵ گونه و زیر گونه از انواع ماهیان است که از مهمترین آن‌ها ماهیان خاویاری، ماهی سفید، کفال، سیم، سوف، کپور، ماهی آزاد، کیلکا و ماهی کلمه خزر را می‌توان نام برد (کردوانی، ۱۳۷۴). دریاچه پشت سد ارس در ۱۲ کیلومتری جنوب شرقی نخجوان و ۴۰ کیلومتر غرب جلفای آذربایجان در منطقه‌ای به نام قزل قشلاق واقع شده است و ماهیان مختلفی در این منطقه زیست می‌کنند که مهمترین آن‌ها شامل ماهی کلمه، ماهی سوف، ماهی سیم و ماهی کپور می‌باشد (سرپناه، ۱۳۸۰). ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در بین ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر و دریاچه پشت سد ارس از گونه‌های با ارزش و اقتصادی محسوب می‌شوند که از سال‌های گذشته تا حال به دلیل لذیذ بودن، ارزش غذایی بالا و کیفیت عالی گوشت در سبد غذایی ساکنین اکثر استان‌های ساحلی و غیر ساحلی قرار گرفته است. در سال‌های اخیر آلودگی‌های صنعتی و شهری، ماهیگیری غیرمسئولانه، تغییرات زیست محیطی محل‌های مهاجرت طبیعی و کاهش دبی آب رودخانه‌ها در فصل مهاجرت تکثیر سبب کاهش ذخایر ماهی کلمه دریای خزر شده به طوریکه نام آن در لیست گونه‌های در معرض خطر انقراض IUCN قرار گرفته است (Kiabi *et al*., 1999). به همین دلیل بیشترین بازار فروش این گونه در استان‌های ساحلی و غیر ساحلی مربوط به صید از دریاچه پشت سد ارس بوده است. در همین راستا سازمان شیلات ایران جهت حفاظت و بازسازی ذخایر ماهی کلمه اقدام به احداث کارگاه تخصصی در منطقه شرق دریای خزر واقع در بندر ترکمن نموده است و هر ساله مولدین این منطقه بصورت مصنوعی تکثیر و سپس لاروها را به آب‌های طبیعی رهاسازی می‌نمایند درحالیکه اجرای این برنامه‌های بازسازی ذخایر بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی و جمعیتی در دراز مدت بدلیل افزایش ضریب همخونی می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، تغییر در ذخایر ژنی ماهی بومی و در نهایت انقراض جمعیت‌های بومی آن اکوسیستم گردد (Machado-schiaffino *et al*., 2007). اعمال مدیریت صحیح ذخایر آبزیان و توسعه آبزی پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که 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 قرار داد و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن تدوین و اعمال نمود (رضوانی، ۱۳۸۰). بنابراین ضروری است بمنظور افزایش تنوع زیستی این گونه و حفظ ذخایر ژنی آن‌ها در هر یک از رودخانه‌های محل مهاجرت قبل از انجام هر گونه برنامه بازسازی ذخایر، به بررسی تنوع زیستی و جمعیتی آن‌ها اقدام نمود تا از ساختار ژنتیکی آن‌ها اطلاعات لازم بدست آمده و سپس نسبت به تکثیر مصنوعی در جهت رهاسازی به همان منابع آبی در راستای حفظ ذخایر ژنی اقدام گردد. در دهه‌های اخیر محققین علوم شیلاتی بمنظور شناسایی جمعیت‌های مختلف آبزیان و تعیین ساختار

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

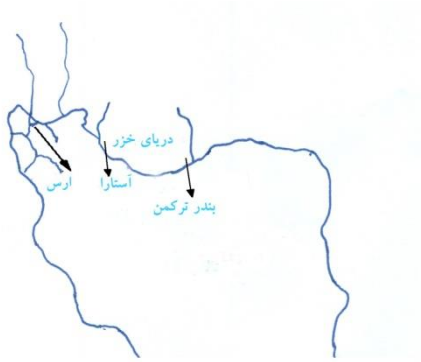
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

ژنتیکی آن‌ها روش‌های نوین مولکولی نظیر PCR-RFLP، RAPD، AFLP، مایکروستلایت و توالی‌یابی DNA را جایگزین استفاده از روش‌های قدیمی مثل بررسی‌های مورفومتریک و مریستیک نموده‌اند. از بین این روش‌های مولکولی، توالی‌یابی DNA یکی از روش‌های نوین و دقیق مولکولی می‌باشد که در اکثر آزمایشگاه‌های شیلاتی و تحقیقاتی جهان بمنظور بررسی‌های خویشاوندی، جمعیتی و ساختار ژنتیکی انواع گونه‌های ماهیان و سایر آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در توالی‌یابی DNA اطلاعات وراثتی هر سلول در مولکول‌های DNA که پلیمری تشکیل شده از چهار مونومر است نگهداری می‌شود. این مونومرها که بازهای آلی هستند به اختصار A ، T، C و G نامیده می‌شوند. به این ترتیب برای نمایش مولکول DNA دانشمندان از یک رشته طولانی از این چهار حرف استفاده می‌کنند. به این رشته طولانی، توالی می‌گویند. در علم ژنتیک و بیوشیمی، توالی‌یابی به معنی تعیین ساختار داخلی DNA و ترتیب نوکلئوتیدهای سازنده آن می‌باشد. در همین راستا هدف از این تحقیق، تعیین ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی کلمه با روش توالی‌یابی DNA و در سطح مولکولی در مناطق دریاچه پشت سد ارس و سواحل جنوبی دریای خزر بوده است و استفاده از اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند در بهبود و اجرای سیاست‌های مدیریتی علمی شیلاتی در بخش بازسازی ذخائر ماهی کلمه سودمند واقع گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ۲۷ ماهی کلمه طی سال ۱۳۹۱ از سه منطقه مورد مطالعه (دریاچه پشت سد ارس ۱۰ نمونه، آستارا ۷ نمونه و بندر ترکمن ۱۰ نمونه) توسط صیادان محلی صید (شکل ۱) و کمی از باله دمی آن‌ها توسط قیچی بریده و داخل الکل ۹۶ درجه قرار گرفت و سپس به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی بندر انزلی انتقال یافت.



شکل ۱: شکل شماتیک مکان‌های نمونه برداری

استخراج DNA، PCR و توالی‌یابی

DNA ژنومی بافت باله دمی نمونه‌ها با روش استات آمونیوم (چکمه دوز، ۱۳۸۴) استخراج و تمپلت DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. قبل از انجام PCR، کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. از بانک ژن NCBI توالی ثبت شده ژن Cytochrom *b* میتوکندریایی ماهی کلمه انتخاب و یک جفت آغازگر به توالی CCT CCC AAC ACC ATC TAA (forward) و CTG AAT AGT AGT GCG AGG AC (reverse) توسط نرم افزار Gene Runner سنتز شد که تولید باندهایی در محدوده ۸۵۰ جفت باز نماید. هر ویال از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شامل ۱ میکرولیتر DNA ۱۰۰ نانوگرم، ۵ میکرولیتر PCR Buffer (10 X)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار،

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

۱ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ ماکرومول) و ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA پلیمراز با غلظت ۵u/µl (سیناژن، ایران) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR داخل دستگاه ترمال سایکلر BIOER مدلXP cycler (XP cycler gradient, 96 plus, Bioer, China) انجام شد و چرخه‌های حرارتی شامل: ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه (initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل شامل ۶۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ سانیه دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای اتصال (annealing)، ۶۰ ثانیه مرحله بسط (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی بود. برای اطمینان از عدم وجود آلودگی در واکنش PCR نمونه‌ها از یک ویال جداگانه کنترل منفی حاوی تمامی مواد بجزء تمپلت DNA استفاده شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ باز (Fermentas GmbH, Germany) در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و بقیه آن‌ها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن، خالص سازی (Purify) و به عنوان تمپلت DNA برای توالی‌یابی استفاده شدند. واکنش‌های توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر forward و reverse 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.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

توالی‌های بدست آمده با نرم افزار Chromas 2.23 بازنگری و با نرم افزار Clustal W (Thompson *et al*., 1997) ردیف (Aligne) شد. شاخص‌های تنوع مولکولی از قبیل تعداد هاپلوتایپ‌ها، مکان‌های چندشکلی (polymorphic sites)، جایگاه‌های انتقالی (transitions)، جایگاه‌های متقاطع (tranvertions)، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei, 1987 ، چندشکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism)، شاخص توزیع شکل گاما (gamma distribution shape parameter) به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان‌های مورد بررسی، واگرایی ژنتیکی بصورت جفتی داخل و بین مناطق نمونه‌برداری یا فاکتور F_{st} (Slatkin, 1991) که نشانه جدایی جمعیت‌ها می‌باشد با ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی بمنظور معنی‌دار یا عدم معنی‌دار بودن، فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت‌ها با استفاده از آزمون دقیق (exact test) بر اساس اختلاف هاپلوتایپی بین جمعیت‌ها، گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی (Historical demographic and spatial expansions) با دو روش ۱- تست تاجیما (D-test of Tajima, 1989) و تست Fu F_s (Fu, 1997)، گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی به همراه پراکنش حاصل از اختلاف جفتی بین توالی‌ها (mismatch distribution) بر اساس سه فاکتور θ_1،θ_0 (θ قبل و بعد از رشد جمعیتی) و t (زمان واحد نرخ جهش) با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 (Excoffier *et al*., 1992) و نرم افزار Dna SP (Rozas *et al*., 2003) محاسبه گردید.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

نتایج

توالی ۲۷ نمونه ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه به اندازه ۷۱۷ باز (bp) ردیف (Aligne) و از هر منطقه توالی ژن یک نمونه در بانک ژن NCBI ثبت شد (KF056853 ارس، KF056854 ترکمن و KF056855 آستارا). ۱۸ هاپلوتایپ بدست آمد که ۱۵ هاپلوتایپ منحصر به فرد (unique) بود. هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین سه منطقه وجود نداشت و فقط هاپلوتایپ شماره ۹ بین آستارا و بندر ترکمن مشترک بود و دریاچه پشت سد ارس هیچگونه هاپلوتایپ مشترکی با دو منطقه دیگر نداشت (جدول ۱) و شاخص توزیع شکل گاما بین مکان‌های مورد بررسی ۰/۱۹ محاسبه شد که نشان‌دهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه بود. نتایج تنوع مولکولی شامل ۶۳۷ جایگاه تک شکلی (مونومورف)، ۸۰ جایگاه ژنی چندشکلی (پلی مورف)، ۱۷ جایگاه انتقالی (transitions)، ۱۷ جایگاه متقاطع (tranvertions)، عدم مشاهده چندشکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism) و۸۳ موتاسیون بود.

جدول ۱: تعداد و پراکنش هاپلوتایپی ژن سیتوکروم *b* در سه جمعیت ماهی کلمه

هاپلوتایپ	سد ارس	بندر ترکمن	آستارا	جمع
H1	۱	-	-	۱
H2	۱	-	-	۱
H3	۳	-	-	۳
H4	۱	-	-	۱
H5	۱	-	-	۱
H6	۲	-	-	۲
H7	۱	-	-	۱
H8	-	۱	-	۱
H9	-	۴	-	۴
H10	-	۱	۳	۴
H11	-	۱	-	۱
H12	-	۱	-	۱
H13	-	۱	-	۱
H14	-	۱	-	۱
H15	-	-	۱	۱
H16	-	-	۱	۱
H17	-	-	۱	۱
H18	-	-	۱	۱
جمع	۱۰	۱۰	۷	۲۷

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

میزان تنوع هاپلوتایپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi)برای تمامی توالی‌ها به‌ترتیب ۰/۰۱۵ ± ۰/۹۲۹ و ۰/۰۳۰ ±۰/۰۱۲ محاسبه شد. همچنین تنوع ژنتیکی هاپلوتایپ‌های به دست آمده در داخل هر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 محاسبه شد که تنوع هاپلوتایپی (Hd) برای تمامی مناطق بالا بود (۰/۹۱۱ – ۰/۸۵۷) ولی مقدار تنوع نوکلئوتیدی (Pi) در بین مناطق مختلف بود که کمترین میزان متعلق به دریاچه سد ارس (۰/۰۰۴) و بیشترین مقدار متعلق به منطقه آستارا بود (۰/۰۲۵). کمترین و بیشترین جایگاه پلی‌مورف یا چندشکلی در داخل هر منطقه به‌ترتیب متعلق به دریاچه سد ارس (۱۰) و منطقه آستارا (۶۲)، کمترین و بیشترین تفاوت جفتی در بین مناطق به‌ترتیب متعلق به دریاچه سد ارس (۳) و منطقه آستارا (۱۸) بود (جدول ۲).

جدول ۲: اطلاعات تنوع مولکولی ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه

ناحیه / پارامتر	دریاچه سد ارس	بندر ترکمن	آستارا
تعداد نمونه‌های مورد بررسی	۱۰	۱۰	۷
جایگاه‌های مورد بررسی	۷۱۷	۷۱۷	۷۱۷
تعداد جایگاه‌های چند شکلی	۱۰	۱۸	۶۲
چند شکلی اضافه و حذف(InDels)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتایپ	۷	۷	۵
تنوع نوکلئوتیدی (Pi)	۰/۰۰۳± ۰/۰۰۴	۰/۰۰۴± ۰/۰۰۶	۰/۰۱۵ ± ۰/۰۲۵
تنوع هاپلوتایپی (Hd)	۰/۰۷۷ ±۰/۹۱۱	۰/۱۰۷ ±۰/۸۶۷	۰/۱۳۷± ۰/۸۵۷
فراوانی هاپلوتایپ	۱± ۰/۸	۱± ۰/۸	۰/۶± ۰/۸
میانگین تفاوت جفتی	۱/۷۰۸±۳/۰۰۰	۲/۳۹۳±۴/۴۴۴	۹/۲۶۰±۱۸/۲۸۶

مقدار F_{st} محاسبه شده بین سه جمعیت ۰/۱۲ با جریان ژنی ۱/۷۵ بود که بیشترین فاصله جمعیتی بین مناطق آستارا و سد ارس با ۰/۱۱۴ و کمترین فاصله جمعیتی بین مناطق آستارا و بندر ترکمن ۰/۰۴۰ – بدست آمد. در سطح احتمال ۰/۰۵ جمعیت منطقه دریاچه پشت سد ارس با دو منطقه آستارا و بندر ترکمن معنی‌دار (P≤ ۰/۰۵) و دو منطقه دیگر با یکدیگر معنی‌دار نبود (P≥ ۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول۳: میزان F_{st} بر اساس فراوانی هاپلوتایپی (مثلث پایین) و میزان p-value (مثلث بالا) ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه

نواحی نمونه برداری	دریاچه سد ارس	بندر ترکمن	آستارا
دریاچه سد ارس	✸	۰/۰۱	۰/۰۱
بندر ترکمن	۰/۰۱۱	✸	۰/۹۹
آستارا	۰/۱۱۴	-۰/۰۴۰	✸

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

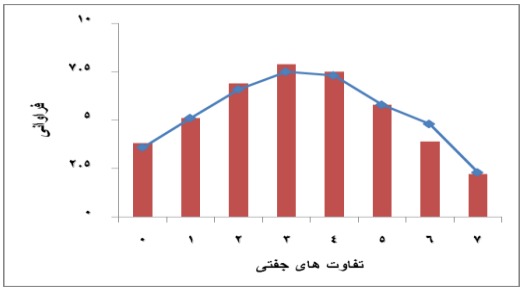
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

آزمون تفاوت جمعیت‌ها (non-differentiation exact p values) در داخل جمعیت‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد نیز معنی‌دار بود و میزان آن بین تمامی نمونه‌ها p = ۰/۰۰۴ بود و این میزان فاکتور F_{st} و آزمون تفاوت بین جمعیت‌ها که هر دو معنی‌دار بودند (P≤۰/۰۵) باعث مردود بودن فرضیه صفر و قبول فرضیه ۱ مبنی بر وجود تفاوت بین جمعیت‌ها بودند(جدول ۴).

جدول ۴: میزان p-value آزمون تفاوت ژن سیتوکروم b جمعیت‌های ماهی کلمه بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	دریاچه سد ارس	بندر ترکمن	آستارا
دریاچه سد ارس	✸		
بندر ترکمن	۰/۰۰۲ ±۰/۰۰۹	✸	
آستارا	۰/۰۰۲ ±۰/۰۲۶	۰/۰۰۰ ±۱	✸

تاریخچه جمعیتی(demographic history) ماهی کلمه با استفاده از آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی(mismatch distribution) که تفاوت ژنتیکی جفتی بین هاپلوتایپ‌ها می‌باشند و بر اساس بسط و گسترش ناگهانی (sudden expansion) تا حدود زیادی غیر معین (unimodal) و شبیه مدل بسط ناگهانی بود (شکل ۲).



شکل ۲ :تفاوت‌های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن سیتوکروم b ماهی کلمه

مقدار کم محاسبه شده شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱)، غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را مورد تأیید قرار داد (جدول ۵).

مقدار زمان بسط و گسترش جمعیتی محاسبه شده توسط نرم افزار Arlequin t = ۲۵/۰۵ بود بنابراین زمان بسط و گسترش جمعیت‌ها از قبل از زمان حاضر حدود ۴۲۳۳ سال و بر اساس نرخ جهش یا موتاسیون محاسبه شده ژن سیتوکروم b این بررسی می‌باشد. آزمون‌های بی‌طرفی (neutrality tests) تاجیما همانند شاخص Fu F_s برای ۲۷ توالی بین مناطق به‌ترتیب ۲/۳۶- و ۴/۰۴۶- محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی‌دار بودند (P≤ ۰/۰۱).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

جدول ۵: تست توزیع و پراکندگی عدم تطابق ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه

منطقه	Tajima's *D*		Fu's F_S		Mismatch distribution			Goodness-of-fit tests			
	D	*P*	F_S	*P*	θ_0	θ_1	t	Ragg✸	*P*	*P*	*SSD*
دریاچه پشت سد ارس	۰/۲۸	-۰/۶۷	۰/۰۷۵	-۲/۰۵۰	۰/۰۰	۱۲/۸۹	۴/۰۸	۰/۰۶۱	۰/۵۷	۰/۴۰	۰/۰۲۵
بندر ترکمن	۰/۰۹	-۱/۴۰	۰/۲۴۶	-۱/۰۲۳	۰/۰۰	۵/۴۵	۱۳/۴۰	۰/۰۳۱	۰/۹۸	۰/۸۶	۰/۰۱۹
آستارا	۰/۰۱	-۱/۶۱	۰/۸۹۰	۲/۹۸۱	۰/۰۰	۴/۵۴	۵۷/۶۶	۰/۰۸۳	۰/۸۰	۰/۷۵	۰/۰۶۱
جمع	P < 0.01	-۲/۳۶	۰/۰۱۲	-۴/۰۴۶	۰/۰۰	۷/۶۳	۲۵/۰۵	۰/۰۶۱	۰/۸۰	۰/۶۸	۰/۰۳۵

✸ شاخص راجرز هارپندینگ، مجموع مربع انحرافات =*SSD*

بحث

ماهیان دریایی عموماً بدلیل پراکنش زیاد در زمان لاروی یا بزرگسالی، عدم وجود موانع فیزیکی در مسیر مهاجرت و عدم جدایی مکان جغرافیایی دارای سطح اندکی از تمایز و اختلاف ژنتیکی می‌باشند (Hewitte, 2000). دریای خزر از مکان‌های اصلی زیست کلمه خزری است که متاسفانه در دهه‌های اخیر بسیاری از رودخانه‌های محل مهاجرت ماهی کلمه در سواحل جنوبی دریای خزر تخریب شده و بزرگسالان این گونه ناگزیر از مهاجرت در تمامی نوار ساحلی دریای خزر می‌باشند. با توجه به تخریب رودخانه‌های محل مهاجرت و تخمریزی در نواحی غربی و شرقی و کاهش ذخایر ماهی کلمه در سواحل جنوبی دریای خزر احتمال تکثیر مولدین بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی و جمعیتی آن‌ها وجود داشته که می‌تواند سبب افزایش ضریب همخونی در جمعیت‌های آن گردد. این روند در درازمدت تأثیرات سویی به دنبال دارد و به صورت تدریجی می‌تواند سبب تخریب ذخایر ژنتیکی و نابودی تدریجی خزانه ژنی گونه‌ها و جمعیت‌ها گردد که از عوارض آن می‌تواند کاهش سرعت رشد، کاهش میانگین طول، کاهش درصد هم‌آوری و افزایش لاروهای ناقص‌الخلقه در یک دوره ۲۵ الی ۴۰ ساله باشد (پورکاظمی، ۱۳۷۹). زمانیکه یک گونه خاص از ماهیان قرار است به عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود توانایی ارزیابی ژنتیکی و دسترسی به ساختار ژنتیکی جمعیت آن‌ها می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند در حفظ تولیدات شیلاتی آن‌ها بکار گرفته شود (Seeb *et al.*,1990). جدایی جغرافیایی دریاچه پشت سد ارس از دریای خزر و وجود ذخایر زیاد ماهی کلمه در این منطقه، کاهش ذخایر ماهی کلمه دریای خزر بخصوص در غرب دریای خزر سبب شده تا به بررسی و مطالعه ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی کلمه دریای خزر با ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی و روش توالی‌یابی DNA پرداخته شود.

تعداد هاپلوتایپ‌های بدست آمده از نمونه‌های دریاچه پشت سد ارس و عدم اشتراک آن‌ها با دو منطقه دیگر بدلیل ایزوله بودن این منطقه و جدایی جغرافیایی آن با دریای خزر می‌باشد. هرچند که موانع فیزیکی برای جدایی مناطق غرب و شرق دریای خزر وجود ندارد و مهاجرت و جریان ژنی بین ماهی کلمه در این مناطق می‌تواند صورت گیرد ولی نمونه‌های دو منطقه (آستارا و بندر ترکمن) دارای تعداد هاپلوتایپ زیاد بودند. شاخص F_{st} بر اساس تست AMOVA به روشنی نشان داد که جمعیت ماهی کلمه دریاچه پشت

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

سد ارس مستقل از جمعیت دو منطقه دیگر می‌باشد درحالیکه اختلاف آماری معنی‌داری بین نمونه‌های سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس این شاخص بدست نیامد و این مسئله نیز توسط آزمون دقیق (exact test) جمعیتی مورد تائید قرار گرفت. مقدار معنی دار *p* حاصل از تست دقیق بین نمونه‌های دریاچه پشت سد ارس و نمونه‌های سواحل جنوبی دریای خزر نشان داد که جمعیت ماهی کلمه دریاچه پشت سد ارس دارای یکسری توانایی‌های منحصر بفردی در توالی ژنوم خود می‌باشد. نتایج این دو آزمون نشان داد که ماهی کلمه مناطق غربی و شرقی دریای خزر جمعیت واحدی می‌باشند. متاسفانه مطالعات ژنتیک مولکولی بر روی ماهی کلمه سواحل جنوبی دریای خزر با روش توالی‌یابی DNA موجود نیست تا بتوان نتایج آن‌ها را با نتایج حاصل از این بررسی مقایسه نمود. Keyvanshokooh و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعات خود (روش مایکروستلایت) نشان دادند که اختلاف آماری قابل ملاحظه‌ای بر اساس میانگین تعداد الل در هر جایگاه ژنی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین ماهی کلمه تالاب انزلی و خلیج گرگان وجود ندارد ولی بر اساس شاخص F_{st} و فاصله ژنتیکی معنی‌دار عنوان نمودند که جمعیت ماهی کلمه دو منطقه هر یک جمعیت مستقلی هستند ولی رضوانی و همکاران (۱۳۸۹) ساختار ژنتیکی اندک و یکسان بودن جمعیت ماهی کلمه منطقه انزلی و خلیج گرگان در شرق دریای خزر با استفاده از روش مایکروستلایت را مطرح نمودند. در حال حاضر تنها کارگاه تخصصی بازسازی ذخایر ماهی کلمه در شرق دریای خزر و در منطقه بندر ترکمن واقع می‌باشد (کارگاه بازسازی ذخایر ماهی کلمه سیچوال) و با توجه به کاهش ذخایر این گونه در غرب دریای خزر احتمال انتقال مولدین از شرق دریای خزر به ناحیه غربی آن به منظور تکثیر و ترمیم ذخایر در این منطقه وجود داشته و درنتیجه رانش ژنتیکی، نتایج به دست آمده یکی بودن جمعیت‌های ماهی کلمه در دو منطقه غربی و شرقی سواحل جنوبی دریای خزر را مورد تأیید قرار داد.

نتایج هر دو آزمون بی‌طرفی (تاجیما و Fu F_s) و آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی (mismatch distribution) نشان از بسط و گسترش بین ماهی کلمه در سه منطقه مورد مطالعه بود، مقدار بالای تنوع هاپلوتایپی (۰/۰۱۵ ± ۰/۹۲۹) و مقدار متوسط تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۳۰ ± ۰/۰۱۲) احتمالاً می‌تواند ناشی از همین بسط و گسترش جمعیتی (پس از یک دوره زمانی که اندازه مؤثر جمعیتی کم بوده است) باشد که این مسئله با نتایج این آزمون‌ها مطابقت دارد. زمان محاسبه شده بسط و گسترش جمعیتی ماهی کلمه قبل از زمان حاضر حدود ۴۲۳۳ سال مطابق با دوره پلیوستوسن بوده است. در واقع در دوره یخبندان پلیوستوسن یک چرخه تکاملی گسترده‌ای اتفاق افتاده است به طوریکه بسیاری از گونه‌ها از مکان‌های اصلی خود جدا و پراکنده شده‌اند (Hewitt, 1996; Carstens and Knowles, 2007). در مجموع کم بودن ساختار ژنتیکی بین این گونه در مناطق مورد مطالعه می‌تواند به سبب بسط جمعیت‌ها در اثر فعالیت‌های انسانی در یک دوره زمانی کوتاه مدت و در سال‌های گذشته مخصوصاً در سواحل جنوبی دریای خزر اتفاق افتاده و زمان برای رسیدن جمعیت‌ها به تعادل ژنتیکی کافی نبوده باشد.

این بررسی برای اولین بار با روش توالی‌یابی DNA برای مقایسه تنوع ژنتیکی بین ماهی کلمه سواحل جنوبی دریای خزر و دریاچه پشت سد ارس انجام

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

گردید و متاسفانه مطالعه دیگری با این روش در سایر گونه‌های مشابه ماهیان استخوانی دریای خزر وجود ندارد تا بتوان نتایج حاصل از این بررسی را با نتایج آن‌ها مورد مقایسه قرار داد. در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که جمعیت ماهی کلمه دریاچه پشت سد ارس یک جمعیت مجزا از دو منطقه دیگر می‌باشد و هیچگونه شاهدی مبنی بر جدا و مستقل بودن جمعیت‌های ماهی کلمه مناطق غربی و شرقی سواحل جنوبی دریای خزر بدست نیامد ولی نتیجه‌گیری نهایی در این باره منوط به بکارگیری سایر ژن‌های میتوکندریایی در کنار سایر روش‌های مولکولی نظیر مایکروستلایت، RFLP، AFLP می‌باشد. از آنجاییکه کاهش شدید جمعیت‌ها درنتیجه فقدان تنوع ژنتیکی می‌باشد، ارزیابی نتایج این بررسی و بکارگیری نتایج آن درآینده می‌تواند راهگشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح جمعیت‌ها، افزایش تنوع ژنی و ذخایر اینگونه با ارزش گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از آقایان مهندس رضایی خواه نرگسی، مهندس عباسی و آقای نوروزی به جهت جمع‌آوری نمونه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱. کردوانی، پ.، ۱۳۷۴. اکوسیستم‌های آبی (دریای مازندران). نشر قوس، تهران.

۲. پورکاظمی، م.، ۱۳۷۹. مدیریت و بازسازی ذخایر پایدار. مجموعه مقالات بازسازی ذخایر. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج. تهران، ۳۰ – ۱۷.

۳. سرپناه، ع. ن.، ۱۳۸۰. پایش (مونتورینگ)دریاچه سد ارس، مطالعات ماهی شناسی مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر، بندر انزلی، ۷۳ صفحه.

۴. 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.

۵. رضوانی گیل کلائی، س.، ۱۳۸۹. گزارش نهایی پروژه بررسی مولکولی ساختار جمعیتی گونه ماهی سفید و ماهی کلمه از خزر جنوبی و سوکلا و راشگو معمولی از خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۷۵ صفحه.

۶. چکمه دوز قاسمی، ف. (۱۳۸۴). مقایسه روش‌های استخراج DNA در آبزیان و دستورالعمل کاربردی آن. پایان نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان (رشت)، ۵۳ صفحه.

7. Carstens, B.C., Knowles, L.L., 2007. Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. Molecular Ecology, 16, 619–627.
8. 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.
9. Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147,915–925.
10. Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biol J Linn Soc, 58, 247–276.
11. Hewitt, G.M., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature, 405, 907–913.
12. Keyvanshokooh, S., Ghasemi, A., Shahriari-Moghadam, M., Nazari, R.M., Rahimpour, M., 2007.Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]

by microsatellite markers. Aquacultur Research, 38, 953-956.
13. 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 MiddleEast,18, 57-65.
14. Lin, Y. S., Y.P. Poh, S.M. Lin., Tzeng, C.S., 2002. Molecular techniques to identify freshwater Eels. Zoological studies, 41(4):421-430.
15. Machado-schiaffino, G., Depico, E., Garciavazquez, E., 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. Aquaculture, 264, 59–65.
16. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals.Genetics, 89, 583-590.
17. 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.
18. Seeb, L.W., Seeb, J.E., Polovina, J.J., 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster Panulirus marginatus populations from the Hawaiian Archipelago. Fish Bull, 88, 713–718.
19. Slatkin, M., Hudson, R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129, 555–562.
20. Tajima, F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutationhypothesis by DNA polymorphism. Genetics, 123, 585–595.
21. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997 The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid. Res, 24, 4876–4882.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1395.10.4.11.7]