تنوع و تمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری (*Clupeonella cultriventris* Nordmann, 1840) سواحل جنوبی دریای خزر

مهرنوش نوروزی[1]*؛ علی ناظمی[2]؛ محمد پورکاظمی[3]؛ محمد هادی سمیعی[4]؛ فاطمه دانشور[5] و آمنه امیر جنتی[6]

mnoroozi@toniau.ac.ir

۱،٤،٥و٦-گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن صندوق پستی:١٦١٦

۲- گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، صندوق پستی:١٦١٦

۳-انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، صندوق پستی:٣٤٦٤-٤١٦٣٥

تاریخ دریافت:مهر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش:فروردین ۱۳۹۱

چکیده

تعداد ۱۲۰ نمونه ماهی بالغ کیلکای معمولی خزری (*Clupeonella cultriventris*)، در فصول بهار و تابستان از حوضه جنوبی دریای خزر (بندر انزلی و بابلسر) جمع‌آوری گردید. از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای شگ ماهیان روی DNA ژنومی ماهی کیلکا استفاده گردید. سپس فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، شاخص‌های F_{ST}،R_{ST} و F_{IS}محاسبه شد. پنج جفت از پرایمرها جایگاههای چند شکلی تولید کردند که از آنها برای آنالیز تنوع ژنتیکی ماهیان بالغ کیلکای معمولی استفاده گردید. میانگین آللی در جایگاه‌ها ۱۳/۱ (دامنه آللی ۵ تا ۲۲ آلل در جایگاهها، Ne=۹/۵) بود. تمامی مناطق و فصول نمونه‌برداری دارای آللهای اختصاصی بودند. میانگین هترزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار بترتیب ۰/۳٤۸ و ۰/۸۷۷ بدست آمد. انحراف از تعادل هاردی وینبرگ در بیشتر موارد دیده شد. براساس تست AMOVA در بررسی شاخص‌های F_{ST}،R_{ST} و جریان ژنی و همچنین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، نشان از وجود جمعیت‌های مجزا می‌باشد. مطالعه حاضر، اطلاعات اولیه ای در خصوص تنوع و تمایز ژنتیکی در جمعیت‌های ماهی کیلکای معمولی در فصول و دو منطقه مختلف دریای خزر نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: ژنتیک جمعیت، میکروستلایت، شگ ماهیان

*نویسنده مسئول

مقدمه

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

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

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

مواد و روش کار

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

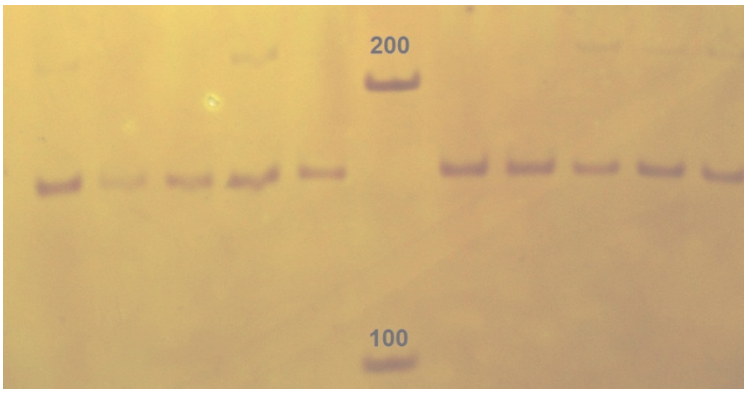
برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی از ۱۵ جفت پرایمر میکرو ستلایت طراحی شده برای جنسهای *Alosa* شامل پرایمرهای (Julian، AsaC051, 059, 249, 334 &Barton, 2007)، *Clupea* شامل پرایمرهای (Cpa6, 8, 100, 104, 107, 120, 134, 125؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۱ ؛ 1235,1014، McPherson *et al.* 2001) و ساردین (SAR1.12,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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs،۰/۲ میلی مولار ؛ پرایمر ۰/۲ تا ۰/۴ میکرولیتر؛ DNA، ۲۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی مرازهات استارت ۰/۴ – ۰/۳ واحد، PCR بافر x ۱؛ کلرید منیزیم ۴/۵ – ۲/۵ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر درpH ۸/۷ انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بترتیب مرحله جدا سازی ۹۵–۹۴ درجه سانتیگراد از ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۱/۵ تا ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه تا ۲ دقیقه، مرحله بسط پرایمر ۷۲- ۷۰ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه و ۳۵ تا ۳۸ چرخه بهینه سازی گردید. محصول PCR روی ژل پلی اکریل آمید۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت. سپس تصویر ژلها با استفاده از نرم افزارUvitec

مورد بررسی قرار گرفت.

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

میانگین تعداد آلل واقعی و موثر بترتیب ۱۳/۱ و ۹/۵ و دامنه آللی از ۵ تا ۲۲ آلل بدست آمد. دامنه آللی در جایگاه Cpa104 از ۱۵ تا ۱۷ آلل (A_R =۲۵/۵)، Cpa6 از ۱۳ تا ۱۸ آلل (A_R =۲۷/۸)، Cpa8 از ۱۰ تا ۲۲ آلل (A_R =۲۰/۱)، Cpa125 از ۱۰ تا ۱۷ آلل (A_R =۲۱/۵)، AcaC051 از ۵ تا ۷ آلل (A_R =۷/۱) و کاهش آن در نمونه‌های بابلسر (بهار و تابستان) مشاهده گردید (جدول ۲). مجموعا ۲۳ آلل اختصاصی یافت شد. تعداد آلل اختصاصی در نمونه‌های بهار و تابستان انزلی ۳ و ۴ آلل و بهار و تابستان بابلسر ۷ و ۹ آلل بود که این آللها در هیچ یک از دیگر فصول و مناطق نمونه‌برداری شناسایی نشد.



شکل ۱: محصول PCR وآرایش باند DNA ماهی کیلکای معمولی با استفاده از پرایمر AsaC051

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

جایگاه	دمای اتصال و تعداد چرخه (درجه سانتیگراد)	اندازه باندی (جفت باز)	شماره بانک ژ	توالی تکراری	منبع
Cpa6	٤٠/٥٢	١٠٤-٢٩١	،F309801	(GATA)14	
Cpa8	٤٠/٥٢	١٠٤-٢١٦	،F309804	(GACA)27	
Cpa104	٤٠/٥١/٥	٣١٢-٤٠٢	،F309791	(TG)54	Miller *et al.*(2001)
Cpa125	٤٠/٥٩	٢١٦-٢٨٠	،F309796	(GA)32i(GT)26	
AsaC051	٤٠/٥٤	١٥٦-١٨٤	:F014992	ɜAAT)7(GTAT)13	ılian &Barton, 2007

نتایج

در این مطالعه از ۱۵ جایگاه مورد بررسی فقط پنج جایگاه در PCR تکثیر شدند و پلی مورف بودند (Cpa4، Cpa8، Cpa104، Cpa125 وAcaC051). در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاهها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است (شکل ۱). اندازه آللی بدست آمده از ۱۰۴ تا ۴۰۲ جفت باز بود (جدول ۱). در کل ۱۳۳ آلل در ۱۲۰ نمونه شناسایی شد. در نمونه های بهار انزلی ۳۵ آلل، تابستان انزلی ۳۲ آلل، بهار بابلسر ۳۵ آلل و تابستان بابلسر ۳۶ آلل در فراوانی بیشتر از ۰/۰۵ شناسایی گردید. جایگاه AsaC051 بیشترین میزان فراوانی آللی را از ۰/۰۶۷ تا ۰/۳۶۷ نشان داد.

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

	بابلسر		انزلی		
	میانگین	تابستان	بهار	تابستان	بهار
تعداد نمونه/جایگاه		۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
Cpa6					
Na (Ne)	۱۵/۲	۱۳(۹/۷)	۱٤(۹/۷)	۱٦(۱۰/۱)	۱۸ (۱۲/٤)
Ho (He)	۰/٦۳۳(۰/۹۰٤)	۰/۹٦۷(۰/۸۹۷)	۰/۹(۰/۸۹۷)	۰/٤۰۰(۰/۹۰۱)	۰/۲٦۷(۰/۹۱۹)
A_R	۲۷/۸	۱۳	۱٤	۱٦	۱۸
Fis ($Signif_{HW}$)	۰/۲۹۹	*-۰/۰۷۷	* -۰/۰۰۳	*** ۰/۵۵٦	*** ۰/۷۱۰
Cpa8					
Na (Ne)	۱۵/۲	۱۳(۹/۸۹)	۱۰(۷/۲)	۲۲(۱۷/۸)	۱٦(۱۱/٦۵)
Ho (He)	۰/۵(۰/۹۰٤)	۰/۹(۰/۸۹۹)	۰/۷(۰/۸۲٦)	۰/۲(۰/۹٤٤)	۰/۲(۰/۹۱۳)
A_R	۲۰/۱	۱۳	۱۰	۲۲	۱٦
Fis($Signif_{HW}$)	۰/٤٤۷	ns-۰/۰۰۱	* ۰/۱۸۸	***۰/۷۸۸	***۰/۷۸۱
Cpa104					
Na (Ne)	۱٦/۲	۱۷(۱۲/۳)	۱۵(۱۲/۷)	۱٦(۱۰/۲)	۱۷(۱۱/٦)
Ho (He)	۰/۱٤۲(۰/۹۱٤)	۰/۱٦۷(۰/۹۱۹)	۰/۲۰۰(۰/۹۲۲)	۰/۰٦۷(۰/۹۰۲)	۰/۱۳۳(۰/۹۱٤)
A_R	۲۵/۵	۱۷	۱۵	۱٦	۱۷
Fis ($Signif_{HW}$)	۰/۸٤۵	***۰/۸۱۹	***۰/۷۸۳	***۰/۹۲٦	***۰/۸۵٤
Cpa125					
Na (Ne)	۱۳	۱٤(۹/۰٤۵)	۱۱(٦/۵)	۱۷(۱۳/۵)	۱۰(۷/۷)
Ho (He)	۰/۲۷۵(۰/۸۸٤)	۰/۳٦۷(۰/۸۸۹)	۰/٤٦۷(۰/۸٤۸)	۰/۲۰۰(۰/۹۲٦)	۰/۰٦۷(۰/۸۷۱)
A_R	۲۱/۵	۱٤	۱۱	۱۷	۱۰
Fis ($Signif_{HW}$)	۰/٦۸۹	***۰/۵۸۸	***۰/٤۵۰	***۰/۷۸٤	***۰/۹۲۳
AsaC051					
Na (Ne)	٦	۷(٤)	٦(٤/۷)	٦(۵)	۵(٤/۲)
Ho (He)	۰/۱۹۲(۰/۷۷٦)	۰/٤٦۷(۰/۷۵۲)	۰/۳۰۰(۰/۷۹)	۰(۰/۸۰۰)	۰(۰/۷٦۲)
A_R	۷/۱	۷	٦	٦	۵
Fis ($Signif_{HW}$)	۰/۷۵۳	*۰/۳۸۰	***۰/٦۲۱	***۱	***۱
تعداد کل آللی (فراوانی > ۰/۰۵)		۳٦	۳۵	۳۲	۳۵
میانگین Na (Ne)	۱۳/۱(۹/۵)	۱۲/۸(۹)	۱۱/۲(۸/۲)	۱۵/٤(۱۱/۳)	۱۳/۲(۹/۵)
میانگین Ho (He)	۰/۳٤۸(۰/۸۷۷)	۰/۵۷۳(۰/۸۷۱)	۰/۵۱۳(۰/۸٦٤)	۰/۱۷۳(۰/۸۹۵)	۰/۱۳۳(۰/۸۷٦)
میانگین Fis	۰/٦۰۷(±۰/۱)	۰/۳٤۱	۰/٤۰۸	۰/۸۱۱	۰/۸۵٤

در این بررسی دامنه Ho در تمامی جایگاهها از صفر تا ۰/۹۶۷ با میانگین ۰/۳۴۸ و دامنه He از ۰/۷۵۲ تا ۰/۹۴۴ با میانگین ۰/۸۷۷ بود (جدول ۲). کمترین مقدار Ho، عدد صفر در جایگاه Asac051 در نمونه‌های جمع‌آوری شده از تابستان بندر انزلی بدست آمد و بیشترین مقدار ۰/۹۶۷ در جایگاه Cpa6 مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده از تابستان بابلسر می‌باشد. کمترین مقدار He، ۰/۷۵۲ در جایگاه Asac051 مربوط به نمونه‌های تابستان بابلسر و بیشترین آن، ۰/۹۴۴ در جایگاه Cpa8 در نمونه‌های تابستان بندر انزلی می‌باشد (جدول ۲). در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاهها خارج از

تعادل بودند (P≤۰/۰۰۱). فقط در جایگاه Cpa8 در نمونه‌های تابستان بابلسر انحراف از تعادل دیده نشد (جدول ۲). در تمامی موارد انحراف از تعادل و کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به قابل انتظار بدست آمد. ضریب آمیزش خویشاوندی (F_{IS}) در تمامی جایگاهای میکروستلایتی مثبت بود و دامنه آن از ۰/۲۹۹ در جایگاه Cpa6 تا ۰/۸۴۵ در جایگاه Cpa104 با میانگین ۰/۶۰۷ محاسبه گردید (جدول ۲). مقادیر مثبت F_{IS} نشان دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Cpa6 با کمترین میزان F_{IS} بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاهها نشان داد.

براساس فراوانی آللی دامنه F_{ST} از ۰/۰۱۹ تا ۰/۰۳۶ و جریان ژنی ۶/۶ تا ۱۳/۰۲ بدست آمد (جدول ۳)، که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می باشد (Balloux & Lugan, 2002). میزان F_{ST}، R_{ST} و جریان ژنی براساس تست AMOVA، معنی‌دار بود (P <۰/۰۱) و نشان دهنده جدا شدن جمعیت‌ها می‌باشد. در تمامی موارد میزان R_{ST} بین جفت جمعیت‌ها بالاتر از میزان F_{ST} بدست آمد. دامنه فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۲)، ۰/۴۳۰تا ۰/۷۰۱ و دامنه شباهت ژنتیکی ۰/۳۵۵ تا ۰/۸۴۳ بدست آمد (جدول ۴).

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

	Fst			
نمونه ها	بهار بندرانزلی	تابستان بندرانزلی	بهار بابلسر	تابستان بابلسر
بهار بندر انزلی	----	۰/۰۱۹	۰/۰۳۳	۰/۰۳۵
تابستان بندر انزلی	۱۳/۰۲	----	۰/۰۳۵	۰/۰۳۶
بهار بابلسر	۷/۴۳	٦/۹۳	----	۰/۰۳
تابستان بابلسر	٦/۹۵	٦/٦۱	۷/۹۸	----

Nm

جدول ٤: شباهت و فاصله ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری در جمعیت‌های شناسایی شده

	شباهت ژنتیکی			
نمونه ها	بهار بندر انزلی	تابستان بندر انزلی	بهار بابلسر	تابستان بابلسر
بهار بندر انزلی	----	۰/۷۰۱	۰/٥٤۰	۰/٥۰۱
تابستان بندر انزلی	۰/۳٥٥	----	۰/٤٦۷	۰/٤۳۰
بهار بابلسر	۰/٦۱٦	۰/۷٦۲	----	۰/٥۸٦
تابستان بابلسر	۰/٦۹	۰/۸٤۳	۰/٥۳٤	----

فاصله ژنتیکی

بحث

اگرچه مارکرهای میکروستلایت بعنوان ابزاری مهم در مدیریت شیلات و آبزی‌پروری می‌باشد، کاربرد اطلاعات ژنتیک جمعیت در مدیریت ماهی کیلکای معمولی دریای خزر در مراحل اولیه است و اطلاعات کمی در مورد ساختار ژنتیک اهمیت بالای وجود جمعیت و زیر تقسیمات آن وجود دارد. با این مطالعات متأسفانه تاکنون پرایمر اختصاصی میکروستلایت برای این گونه طراحی نگردیده است. از اینرو در این بررسی از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت که برای ماهی شاد آمریکایی و ماهی هرینگ اقیانوس آرام، ماهی هرینگ اقیانوس اطلس و ژنومی ماهی کیلکای DNAساردین طراحی شده بود، بر روی معمولی استفاده گردید. اما از کل پرایمرهای مورد استفاده فقط تکثیر شدند. با وجود اینکه ۵PCR جفت آن در میکروستلایت‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری

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

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

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ بعنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است (Beardmore *et al.*, 1997). در مقایسه میزان هتروزیگوسیتی دو منطقه، میزان آن در بابلسر بالاتر از انزلی بود (جدول ۲). تنوع ژنتیکی نسبتاً پایین، در ساختار جمعیت بویژه در نمونه‌های منطقه انزلی نشان‌دهنده تخریب ذخایر این ماهی باشد. نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۳۴۸±۰/۰۶۷) کمتر از مقدار اعلام شده (۰/۷۹±۰/۲۶) برای ماهیان دریایی در مطالعات سایر محققین است (DeWoody & Avis , 2000).

در مقایسه میزان هتروزیگوسیتی ماهی کیلکای معمولی با دیگر گونه‌های خانواده شگ ماهیان مانند ماهی هرینگ اقیانوس اطلس (۰/۶۵ تا ۰/۹۸، Shaw *et al.* 1999)، ساردین اقیانوس آرام (۰/۶۶۷ تا ۰/۹۶۷، Pereyra *et al.*, 2004؛ ۰/۵۲۲ تا ۰/۹۰۳، McPherson *et al.*, 2001)، هرینگ اقیانوس آرام (۰/۴۶ تا ۱، Miller *et al.*, 2001)، ساردین (۰/۷۷۲ Gonzalez & Zardoya, 2007،) و ماهی شاد آمریکایی (۰/۵۵۲ تا ۰/۹۰۳، Julian & Barton, 2007)، میزان هتروزیگوسیتی در مطالعه حاضر پایین‌تر است. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار و ضریب آمیزش خویشاوندی مثبت، همگی نشان‌دهنده وجود تنگنای ژنتیکی و کاهش تنوع ژنتیکی است. احتمالا تنگناهای ژنتیکی در این گونه، صید بی‌رویه و حمله شانه‌دار مهاجم است، که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می‌شود. شانه‌دار مهاجم دریای خزر به جهت میل شدید به تغذیه و تولید مثل بسیار سریع، رقیب اصلی غذایی ماهیان پلاژیک پلانکتونخوار محسوب می‌گردد. در این میان کیلکا ماهیان، بیشترین رقابت تغذیه‌ای را با این شانه‌داران دارند. با توجه به منبع غذایی مشترک بین این دو گونه، کاهش شدید جمعیت کیلکا ماهیان پس از تهاجم شانه‌دار مهاجم به خزر مشاهده شده است (غفارزاده و هنر بخش، ۱۳۸۶). از طرفی کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده (Shen & Gong, 2004) و در صورت تداوم وضع موجود این احتمال وجود دارد که شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود. البته کاهش هتروزیگوسیتی به علت نمونه‌برداری از افراد خویشاوند، ترکیب جمعیت‌ها (اثر وهلند[۴]) و وجود آلل‌های نول نیز می‌تواند باشد.

در بررسی حاضر روی ماهی کیلکای معمولی، هر دو فصل نمونه‌برداری تقریبا همه جایگاهها خارج از تعادل هاردی-وینبرگ بودند ($P\leq$۰/۰۰۱). چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی وجود آللهای نول باشد که پهلوگیری در آنها صورت نمی‌پذیرد و بروز آن در توارث میکروستلایت در شگ ماهیان تایید شده است (Julian & Barton, 2007; Gonzalez & Zardoya, 2007; Miller *et al.*, 2001; Pereyra *et al.*, 2004). در بررسی حاضر به نظر می‌رسد، مهاجرت و اختلاط جمعیت‌ها و استفاده از پرایمرهای غیراختصاصی مهمترین عاملی است که سبب می‌گردد تعادل هاردی – وینبرگ برقرار نباشد.

[۴] Wahlund effect

شاخص F_{ST} نشان‌دهنده درجه تمایز ژنتیکی است. درجه تمایز ژنتیکی کل (~ هتروزیگوسیتی) جداکننده جمعیت‌هاست. در این بررسی دامنه F_{ST} براساس فراوانی آللی نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux & Lugan, 2002). براساس تست AMOVA میزان F_{ST} و R_{ST} بین مناطق و فصول نمونه‌برداری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). از اینرو به نظر می‌رسد که جمعیت‌های مختلف ژنتیکی در فصول مختلف در مناطق نمونه‌برداری دارد. پایین بودن مقدار F_{ST} به علت پلی مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در میکروستلایت‌ها و مهاجرت این ماهی در مناطق مختلف دریای خزر است که بطور موثری میزان F_{ST} را کاهش می‌دهند (Balloux & Lugan, 2002). به طور کلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند و در ماهیان بین مقدار F_{ST} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (Waples, 1987). طبق این فرضیه و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالا ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است و همچنین ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت (جریان ژنی بالا) در زیر جمعیت‌ها، موجب تمایز ژنتیکی پایین در جمعیت‌های این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thrope و Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جدایی جمعیت‌ها را بطور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۰۳ تا ۰/۶۱) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/۳۵۵ تا ۰/۸۴۳) و نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

آبزیان دریای خزر، تحت تاثیر فاکتورهای اکولوژیک متفاوت قرار دارند. شوری، نور، درجه حرارت و غلظت مواد غذایی از فاکتورهایی هستند که به صورت فصلی پراکنش آبزیان را در دریای خزر تحت تاثیر قرار می‌دهند. ترکیب گونه‌های فیتوپلانکتونی و زئوپلانکتونی در فصول مختلف متفاوت است. این احتمال وجود دارد که جمعیت ماهیان تغذیه کننده از این پلانکتونها نیز در فصول مختلف، متفاوت باشد. بررسی حاضر، مطالعه اولیه‌ای است بر وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی در فصول و مناطق مختلف که در دریای خزر زیست می‌کنند. وجود آللهای اختصاصی، F_{ST} و R_{ST} معنی‌دار در هر یک از جمعیت‌های شناسایی شده، تایید کننده وجود جمعیت‌های ژنتیکی متمایز در مناطق انزلی و بابلسر در فصول مختلف است. احتمال دارد که جمعیت‌های دیگری از این ماهی در دریای خزر وجود داشته باشد که نیازمند به مطالعه و بررسی بیشتری است. کاهش جمعیت‌های گونه کیلکای معمولی در طول دهه اخیر اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را روشن می‌سازد. شناسایی ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی می‌تواند در صنعت شیلات و پیشبرد برنامه‌های مدیریتی آینده و حفاظت از ذخایر آن سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

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

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

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

Alarcon J.A., Magoulas A., Georgakopoulos T., Zouros E. and Alvarez M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 230:65–80.

Balloux F. and Lugon-Moulin N., 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11:155-165.

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

Chistiakov D.A., Hellemans B., Haley C.S., Law A.S., Tsigenopoulos C.S., Kotoulas G., Bertotto D., Libertini A. and Volckaert F.A., 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Genetics, 170:1821–1826.

Cui J.Z., Shen X.Y., Yang G.P., Gong Q.L. and Gu Q.Q., 2005. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus* . Aquaculture, 250:129– 137.

Dewoody J.A. and Avise J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Fish Biology, 56:461-473.

Excoffier L., Laval G. and Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.

Frankham R., 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology, 17:325-333.

Gonzalez E.G. and Zardoya R., 2007a. Isolation and characterization of polymorphic micro-satellites for the sardine *Sardina pilchardus* (Clupeiformes: Clupeidae). Molecular Ecology Notes, 7:519–521.

Gonzalez E. and Zardoya R., 2007. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). BMC Evolutionary Biology, 7: 1471-2148.

Julian Sh.E. and Barton M.L., 2007. Microsatellite DNA markers for American shad (*Alosa sapidissima*) and cross-species amplification within the family Clupeidae. Molecular Ecology Notes, 7:805-807.

Hakansson J. and Jensen P., 2005. Behavioral and morphological variation between captive populations of red jungle fowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation, 122:431-439.

Liu JX., Gao TX., Zhuang ZM. and Jin XS., 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). Molecular Phylogenetic Evolution, 40:712-723.

Maes J., Van Damme S., Meire P. and Ollevier F., 2004. Statistical modeling of seasonal and environmental influences on the population dynamics of an estuarine fish community. Marine Biology, 145:1033-1042.

Miller K.M., Laberee K., Schulze A.D. and Kaukinen K.H., 2001. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasi*). Molecular Ecology Notes, 1:131-132.

McPherson A.A., O'Reilly P.T., McParland T.L., Jones M.W. and Bentzen P., 2001. Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*). Molecular Ecology Notes, 1:31-32.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106:283-292.

Peakall R. and Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6:288-295.

Pereyra R.T., Saillant E., Pruett Rexroad C.L., Rocha-Olivers C.E. and Gold G.R., 2004. Characterization of polymorphic microsatellites in the Pacific sardine *Sardinops sagaxsagax* (Clupeidae). Molecular Ecology Notes, 4:739-741.

Sekar M., Suresh E., Kumar N.S., Nayak S.K. and Balakrishna C., 2009. Microsatellite DNA markers a fisheries perspective Part 1: The nature of microsatellites. Genetics and Biodiversity, pp.27-29.

Semenova A.V., Andreeva A.P., Stroganov A.N., Rubtsova G.A., Afanasiev K.I. and Markevich A.A., 2012. Preliminary data on variation of four microsatellite loci in Pacific herring *Clupea pallasii*. Russian Journal of Genetics, 48:86-92.

Shaklee J.B., Tamaru C.S. and Waples R.S., 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science, 36:141-157.

Shaw P.W., Turan C., Wright J.M., O'Connell M. and Carvalho G.R., 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*) with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. Heredity, 83:490–499.

Shen X.Y. and Gong Q.L., 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. Oceanology and Limnology Science, 35:332–341.

Thorpe J.P. and Sole-Cava A.M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zoologica Scripta, 23:3-18.

Velikova V.N., Shaudanov A.K., Gasimov A., Korshenko A., Abdoli A., Morozov B., Katunin D.N., Mammadov E., Bokova E. B., Emadi H., Annachariyeva J., Isbekov K., Akhundov M., Milchakova N., Muradov O., Khodorevskaya R., Shahifar R., Shiganova T., Zarbaliyeva T. S., Mammadli T., Velikova V., Barale V. and Kim Y. 2012. Review of the environment and bio resources in the Caspian Sea ecosystem 2000-2010. CaspEco Report, 423P.

Waples R.S., 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution, 41: 385– 400.

Wright S., 1978. Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago.

Zhan A., Hu J., Hu X. and Zhou Z., 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Do local marine currents drive geographical differentiation?. Marine Biotechnology, 11:223-235.

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

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

mnoroozi@toniau.ac.ir

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

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

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

Received: October 2012 Accepted: April 2013

Keywords: Population genetic, Microsatellite, Clupeidae

Abstract

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

*Corresponding author