تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال ششم، شماره نوزدهم، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۱۵-۲۶
دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰

ساختار جمعیتی شگ‌ماهی براشنیکووی (*Alosa braschnikowi*, Borodin, 1904) در سواحل جنوبی دریای خزر بین دو منطقه گمیشان و میان‌کاله

امید جعفری، علی شعبانی و حامد کلنگی میاندره *
گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی شگ‌ماهی خزری (*Alosa braschnikowi*) به عنوان گونه بومی دریای خزر در دو منطقه گمیشان و میان‌کاله با استفاده از پنج جفت نشانگر ریزماهواره (AsaD030، AsaD042، AsaC249، AsaD312 و AsaC051) انجام شد. برای انجام این تحقیق، تعداد ۵۶ قطعه ماهی از این گونه در دو منطقه گمیشان و میان کاله (۲۸ قطعه از هر منطقه) از صید پره نمونه‌برداری شد. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی این ماهی نشان داد که میزان متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۵۲۵ بود که مقدار متوسط آن در جمعیت گمیشان و میان کاله به ترتیب ۰/۵۳۶ و ۰/۵۱۴ به دست آمد. همچنین، میزان متوسط آلل مشاهده شده در هر یک از جایگاه‌های ژنی برابر با ۱۲/۴ و محدوده آن از ۸ تا ۱۷ آلل در جایگاه‌های ژنی بود. میانگین تعداد آلل مؤثر در سطح جایگاه‌های ژنی برای جمعیت گمیشان ۸/۵۳ و برای جمعیت میان کاله ۷/۶۱ به دست آمد. بررسی تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت‌ها میزان انحراف بالایی را از تعادل در سطح جایگاه‌ها نشان داد و ۸ مورد از ۱۰ آزمون اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<0/001$). میانگین جریان ژنی و ضریب درون‌آمیزی محاسبه شده به ترتیب برابر با ۱۷/۳۴ و ۰/۳۹۵ بود. میزان شاخص جدایی جمعیت‌ها (Fst) کم و برابر با ۰/۰۱۶ به دست آمد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی بر اساس شاخص Fst تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا (۹۹ درصد) و میزان تمایز بین جمعیتی پایینی (۱ درصد) را نشان داد. نتایج نشان‌دهنده غنای آللی نسبتاً مناسب این گونه بود اما احتمال در تنگنا قرار گرفتن آن وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، دریای خزر، ریزماهواره، شگ‌ماهی براشنیکووی

مقدمه

تنوع گونه‌ای و مهم‌تر ازآن تنوع ژنتیکی از اساسی‌ترین پیش‌نیازهای لازم برای حفظ و بقای یک گونه جهت سازگاری با محیط‌هایی است که تحت تأثیر فشارهای زیست‌محیطی مختلفی قرار دارند، زیرا تصور بر این است که تنوع ژنتیکی بالا باعث ارتقا شایستگی افراد و افزایش احتمال بقای جمعیت‌ها می‌شود (Hinten *et al*., 2003؛ Zoller *et al*., 1999؛ Diz and Presa, 2009). تنوع ژنتیکی نشان‌کننده تفاوت در تعداد و نوع آلل‌های موجود در جایگاه‌های

* hkolangi@gau.ac.ir

کروموزومی بوده (Utter, 1991)، نیازمند توجه ویژه است، طی چند سال اخیر علاقه‌مندان زیادی را به دلیل نقش کلیدی در ساختار ذخایر طبیعی به خود جلب کرده است، بنابراین بررسی ژنتیک جمعیت ذخایر می تواند کمک شایانی به برنامه‌های ارزیابی ذخایر نماید (Waldman and Yammarino, 1999). تا به امروز برای ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت از نشانگرهای مختلفی استفاده شده است که از میان این نشانگرها، ریزماهواره‌ها (SSRs) بسیار پُر کاربرد هستند (Crooijmans *et al*., 1997؛ Li *et al*., 2007؛ Liu, 2007). از اهداف کلی پژوهش‌های اکولوژی مولکولی، محاسبه میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی است. با توجه به نقش هر موجود زنده بر هرم اکولوژی و اکوسیستمی که در آن حضور دارد، نقش تنوع ژنتیکی گونه‌ها برای بقای اکوسیستم نمایان می‌شود. طی سالیان اخیر به دلایلی همچون صید بیش از حد، صید قاچاق، انتقال زباله‌ها، سموم کشاورزی و غیره به آب دریا، بسیاری از گونه‌ها در معرض خطر انقراض قرار گرفته یا به زیستگاه‌های دیگری مهاجرت کرده‌اند که همین عوامل در کاهش تنوع ژنتیکی و یکدست شدن جمعیت‌ها تأثیر به سزایی دارد (Maquan *et al*., 2000). باید اشاره کرد که در کوتاه مدت میانگین شایستگی جمعیت می تواند در اثر عوامل تنش‌زا افزایش یابد اما با گذشت زمان و به ویژه در رابطه با عوامل تنش‌زایی که به اندازه کافی بزرگ هستند، اندازه جمعیت مؤثر کاهش و نرخ کاهش تنوع افزایش می یابد و به دنبال آن توانایی جمعیت برای پاسخ به تغییرات آینده محیطی به شدت کاهش می‌یابد (Amy *et al*., 2006). بسیاری از مطالعات انجام شده در این رابطه به ویژه در کشور ایران بیشتر در ارتباط با ماهیان تجاری و اقتصادی بوده که دارای تکثیر مصنوعی نیز هستند و به ماهیانی که از نظر اقتصادی مورد توجه نیستند اما به لحاظ اکولوژیک نقش بسیار مهمی دارند کمتر توجه شده است. در مطالعه‌ای بر روی ماهی سفید در رودخانه‌های گرگانرود و چشمه‌کیله با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بیان شد که این گونه در مرحله تنگنای ژنتیکی قرار گرفته است. صید بیش از حد، برنامه‌های تکثیر مصنوعی بدون برنامه و رهاسازی بچه‌ماهیان به محیط‌های نامناسب از عوامل مؤثر بر کاهش تنوع برشمرده شده است (Rezaei *et al*., 2010).

یکی از خانواده‌های مهم ماهیان در دریای خزر، خانوده شگ‌ماهیان (*Clupeiformes*) است که به فراوانی در سرتاسر دریای خزر پراکنش یافته است (Patimar *et al*., 2011). این خانواده در دریای خزر دارای دو جنس *Alosa* و *Clupeonella* است (Abdoli and Naderi, 2008). جنس *Alosa* با هشت گونه در آب‌های دریای خزر پراکنش دارد (Coad, 2013). گونه *A. braschnikowi* (Borodin, 1904) از گونه های مهم جنس *Alosa* است که به وفور در آب های جنوبی دریای خزر پراکنده است و بومی این دریا محسوب می‌شود و در صیدهای پره به عنوان صید ضمنی مشاهده می گردد. این گونه در فصل زمستان به طور عمده در جنوب دریای خزر پراکنش دارد و در فصل بهار برای تخم‌ریزی به قسمت‌های شمالی مهاجرت می کند و از نظر جغرافیای زیستی در دریای خزر پراکنش دارد (Coad, 2013). جنس *Alosa* در ایرن به عنوان ماهی اقتصادی مطرح نیست اما به همراه سایر ماهیان اقتصادی به طور گسترده در صید پره به دام می افتد. از نظر غذایی به ماهیان کوچک یا مراحل

لاروی ماهیان، میگوها و نرم‌تنان وابسته بوده، رژیم غذایی آن در زمستان شامل ۸۵ درصد کیلکا (*Clupeonella engrauliformis*)، برخی گاوماهیان (*Neogobius*) و میگو است و در فصل بهار عمدتاً از کیلکای معمولی خزری (*C. caspia*)، شیشه‌ماهیان (*Atherina boyeri*) و میگو تغذیه می‌نماید (Coad, 2013). در نهایت، با توجه به متنوع بودن عوامل اکولوژیکی نظیر: عمق، جریان‌های ساحلی و جنس بستر در سواحل جنوبی دریای خزر و از سوی دیگر پراکنش بالای ماهی *A. braschnikowi* در حوضه جنوبی، دو منطقه گمیشان و میان‌کاله در سواحل استان گلستان به عنوان مدل مقایسه‌ای با هدف ارزیابی ساختار ژنتیکی شگ‌ماهی براشنیکووی انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA: در آذر ماه سال ۱۳۹۲ تعداد ۵۶ قطعه ماهی (۲۸ قطعه برای هر منطقه) در دو منطقه گمیشان (E: 54°04', N: 37°04') و میان‌کاله (E: 53°35', N: 36°48') (شکل ۱) که امکان نمونه‌برداری با استفاده از تور پره در این مناطق وجود دارد، صید شد. از هر ماهی باله دمی گرفته و تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم صورت پذیرفت (Hillis *et al.*, 1996). به منظور بررسی کیفیت و کمّیت DNA استخراجی از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل Bio photometer 8.5mm، شرکت Eppendorf AG، آلمان) استفاده شد.

شکل ۱- نقشه نقاط نمونه‌برداری از شگ‌ماهی براشنیکووی در مطالعه حاضر

PCR و الکتروفورز: برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *A. braschnikowi* در استان گلستان، پنج جفت نشانگر ریزماهواره (AsaD030، AsaD042، AsaC249، AsaD312 و AsaC051) که دارای تعداد آلل بالا و دامنه وزنی مناسبی بودند و حالت چندشکلی از خود نشان داده بودند، از یافته‌های Julian و Bartron (۲۰۰۷) بر روی گونه *A. sapidissima* انتخاب شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (مدل BIO-RAD، شرکت MJ Mini Thermal Cycler، ساخت آمریکا) درون میکروتیوب‌های مخصوص PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA استخراجی، ۰/۵ میکرولیتر از

پرایمر مستقیم (F) و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر معکوس (R)، ۴۰۰ میکرولیتر از نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تک DNA پلیمراز (Fermentas, Thermo fisher, Lithuania)، بافر 10X PCR (Fermentas, Thermo fisher, Lithuania)، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و اضافه نمودن آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مراحل انجام واکنش زنجیره پلیمراز بدین صورت بود: در واسرشتگی اول، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت سه تا پنج دقیقه اعمال و DNA دو رشته از هم جدا گردید (denaturation)، در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، دمای الحاق دو رشته DNA باز شده به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و در بسط نهایی سه تا پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت پذیرفت. سپس، محصول PCR روی ژل اکریل‌آمید ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز بارگذاری شد. از نشانگر DNA (Fermentas, Thermo fisher, Lithuania) (Ladder 10 bp) به عنوان معیاری جهت تعیین اندازه آلل‌ها استفاده شد. پس از اتمام کار دستگاه الکتروفورز، ژل‌ها با روش نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شدند (Bassam *et al*., 1991). پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از دستگاه مستندساز ژل تصویر مناسبی از ژل برای انجام مراحل بعدی و آنالیزها تهیه شد. سپس، با نرم‌افزار ژل پرو آنالایزر (مدل ۳/۰، شرکت Gene، ساخت آمریکا) وزن باندهای مشاهده شده در باند اصلی مشخص گردید.

جدول ۱- جایگاه‌های ژنی استفاده شده و ویژگی‌های آنها (Julian and Bartron, 2007)

جایگاه ژنی	کد دسترسی در بانک ژنی (NCBI)	توالی پرایمر (5´→3´)	دمای الحاق (درجه سانتیگراد)
AsaD030	EF014998	F: CCACAGCATCATCTCTTTACTG R: ACCTTGAATTTCTCCTTGGG	۵۵
AsaD042	EF015000	F: ACTGGTCAATTGTAAGACACCC R: CAAGATGACCAAGGGTTAAGAC	۵۰
AsaC249	EF014994	F: TTATTACAACGGTGAATTGAGTG R: TAAGTGCATGTTGTGTGTGATG	۵۳
AsaD312	EF014999	F: TAAACATACTGCTCCTTCACCC R: ATGTGCTCTTGTTTCAATGATG	۵۴
AsaC051	EF014992	F: GTAAGTCGCTTTGGACTACCAG R: TCTAAATGCCCAGGTAAAGATG	۵۳

تحلیل آماری: به منظور محاسبه تعداد آلل در هر یک از جایگاه‌های ژنی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی تنوع ژنتیکی دو جمعیت و همچنین آزمون انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ از نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۴۱ (Peakall and Smouse, 2006) استفاده شد. همچنین، برای بررسی وجود آلل نول، خطاهای دسته‌بندی یا از دست دادن آلل بزرگ، نرم‌افزار Microchecker نسخه ۲/۲/۱ (Oosterhout *et al*., 2004) مورد استفاده قرار گرفت. از آزمون ویلکاکسون غیر پارامتریک (Zar, 1999) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ به منظور تعیین تفاوت معنی‌دار در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و

مورد انتظار (He) و همچنین مشخص نمودن تنوع آللی استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار FSTAT نسخه ۲/۹/۳ آنالیز غنای آللی، میزان ضریب درون‌آمیزی (Fis) و سطح معنی‌داری آن مشخص گردید (Goudet, 2001). میزان تنوع درون جمعیتی و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین مناطق بر اساس معیار مدل آللی بی‌نهایت (Fst) توسط آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در نرم‌افزار GenAlex محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2006). همچنین میزان آلل واقعی (Na)، آلل مؤثر (Ne)، جریان ژنی (Nm)، مقادیر فاصله ژنتیکی (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei, 1978) نیز در همین نرم‌افزار به دست آمد (Peakall and Smouse, 2006). آزمون عدم تعادل پیوستگی (disequilibrium linkage) بین جفت جایگاه‌های ژنی توسط نرم‌افزار GENEPOP نسخه ۳/۱ (Raymond and Rousset, 2003) صورت پذیرفت. در نهایت، مقادیر مربوط به غنای آللی و هتروزیگوسیتی بر اساس مقادیر ارایه شده برای ماهیان آب شیرین مقایسه شدند (Dewoody and Avise, 2000).

نتایج

در پژوهش حاضر، از پنج جایگاه ژنی ریزماهواره استفاده شد که تمامی این جایگاه‌ها حالت چندشکلی نشان دادند (جدول ۱). تعداد آلل‌های مربوط به هر یک از جایگاه‌های ژنی چندشکل در جدول ۲ ارایه شده است. متوسط تعداد آلل مشاهده شده در سطح هر یک از جایگاه‌های ژنی برابر با ۱۲/۴ آلل محاسبه شد و گستره آن در جایگاه‌های ژنی از ۸-۱۷ آلل بود. متوسط تعداد آلل واقعی و مؤثر در مناطق گمیشان و میان کاله به ترتیب: ۱۲/۸، ۱۲/۰۰ و ۸/۵۳ و ۷/۶۱ بود و از این نظر به لحاظ آماری اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد با یکدیگر نشان ندادند (P>۰/۰۵). کمترین تعداد آلل (۸ آلل) در جایگاه AsaD030 در منطقه میان کاله و بیشترین آن (۱۷ آلل) در جایگاه AsaC249 (جمعیت میان کاله) و AsaC051 (جمعیت گمیشان) به دست آمد. نتایج حاصل از نرم افزار Microchecker علایمی مبنی بر از دست دادن آلل بزرگ یا خطاهای دسته‌بندی نشان نداد اما گویای احتمال حضور آلل نول با میانگین ۰/۱۹۶ در جایگاه‌های ژنی بود. میانگین هتروزیگوسیتی کل ۰/۵۲۵ و متوسط آن در جمعیت گمیشان ۰/۵۳۶ و در جمعیت میان کاله ۰/۵۱۴ برآورد شد و از این نظر بین دو جمعیت اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بالاترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۷۵) در جایگاه ژنی AsaC249 و کمترین آن (۰/۲۸۶) در جایگاه ژنی AsaD042 مشاهده شد. همچنین، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)کل ۰/۸۶ محاسبه شد که میانگین آن برای جمعیت گمیشان و میان کاله به ترتیب ۰/۸۷ و ۰/۸۵ بود. آزمون انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ برای تمامی ۱۰ حالت ممکن (پنج جایگاه ژنی و دو جمعیت) اعمال شد و میزان انحراف بالایی از تعادل مشاهده شد که در نهایت پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی از بین تمامی ۱۰ حالت، تنها دو آزمون در تعادل قرار داشتند. ضریب شاخص درون آمیزی (Fis) با میانگین ۰/۳۹۵ به دست آمد که پایین ترین میزان آن (۰/۲۸۸) در جایگاه AsaD030 و بیشترین مقدار آن (۰/۳۲۳) در جایگاه AsaC051 بود. همچنین میانگین شاخص Fst برای جمعیت‌ها برابر با ۰/۰۱۶ محاسبه شد که از ۰/۰۱۰ تا

۰/۰۲۶ را شامل می‌شد (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی AMOVA طبق معیار Fst (جدول ۵) مشخص گردید که تنوع بین و درون جمعیتی در مطالعه حاضر به ترتیب ۱ و ۹۹ درصد است که اختلاف معنی‌داری بین دو جمعیت ملاحظه نشد (P>۰/۰۵). میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس شاخص Nei به ترتیب ۰/۹۰ و ۰/۱۰ به دست آمد.

همچنین میزان جریان ژنی (Nm) بالایی بین دو جمعیت با میانگین ۱۷/۳۴ در سطح جایگاه‌های ژنی مشاهده شد. در سطح هر یک از جایگاه‌های ژنی میزان جریان ژنی و تمایز جمعیت‌ها نیز محاسبه شد (جدول ۴). کمترین میزان تمایز و بیشترین میزان جریان ژنی در جایگاه ژنی AsaD312 و بیشترین میزان تمایز و کمترین مقدار جریان ژنی در جایگاه AsaD030 قرار داشت.

جدول ۲- تعداد کل آلل مشاهده شده و اندازه آلل‌ها در سطح هر یک از جایگاه‌های ژنی در ماهی *A. braschnikowi*

نشانگرها	AsaD030	AsaD042	AsaC249	AsaD312	AsaC051
تعداد کل آلل در سطح هر جایگاه ژنی	۲۰	۱۹	۳۱	۲۱	۳۳
رنج آللی در باند اصلی	۱۰۴-۱۵۲	۱۲۴-۱۶۸	۲۲۰-۳۱۲	۱۳۶-۱۹۲	۲۵۶-۳۹۲

جدول ۳- مقادیر مربوط به تنوع ژنتیکی در سطح شش جایگاه ژنی استفاده شده. Na: تداد آلل واقعی در هر جایگاه ژنی، Ne: تعداد آلل مؤثر، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Fis: ضریب درون‌آمیزی (مقادیر معنی‌دار با خط زیر هر عدد مشخص شده است)، pHw: آزمون احتمال وجود تعادل هاردی-وینبرگ (ns: عدم اختلاف معنی‌دار، ***: P<۰/۰۰۱).

منطقه بررسی شده		AsaD030	AsaD042	AsaC249	AsaD312	AsaC051
منطقه گمیشان	Na	۱۲	۹	۱۴	۱۲	۱۷
	Ne	۷/۶۴	۵/۵۴	۹/۰۶	۸/۴۳	۱۱/۹۷
	Ho	۰/۶۸	۰/۲۸	۰/۴۶	۰/۵۷	۰/۶۸
	He	۰/۸۷	۰/۸۲	۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۹۱
	Fis	۰/۲۴	۰/۶۶	۰/۴۹	۰/۳۷	۰/۲۸
	pHw	***	***	***	***	***
منطقه میان‌کاله	Na	۸	۱۰	۱۷	۹	۱۶
	Ne	۴/۶۸	۶/۴۸	۱۲/۱۵	۶/۶۴	۸/۱۲
	Ho	۰/۵۰	۰/۲۹	۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۵۴
	He	۰/۷۹	۰/۸۵	۰/۹۲	۰/۸۵	۰/۸۸
	Fis	۰/۳۸	۰/۶۷	۰/۲۰	۰/۴۳	۰/۴۰
	pHw	ns	***	ns	***	***

جدول ۴- مقادیر جریان ژنی (Nm) و تمایز (Fst) محاسبه شده در هر یک از جایگاه‌های ژنی مطالعه شده

	*Asa*C051	*Asa*D312	*Asa*C249	*Asa*D042	*Asa*D030
Fst	۰/۰۱۱	۰/۰۱۰	۰/۰۱۳	۰/۰۲۰	۰/۰۲۶
Nm	۲۱/۹۷	۲۴/۲۳	۱۸/۶۴	۱۲/۳۱	۹/۵۴

جدول ۵- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) با معیار Fst. df (درجه آزادی)، ss (جمع مربعات)، MS (انحرافات میانگین مربع)، P (معنی‌دار بودن انحرافات پس از هزار بار تکرار).

	df	ss	MS	Est. Var.	%	Stat	value	P (rand >= data)
بین جمعیت‌ها	۱	۳/۹۱	۳/۹۱	۰/۰۳	۱			
درون جمعیت‌ها	۱۱۰	۲۴۲/۲۶	۲/۲۰	۲/۲۰	۹۹	Fst	۰/۰۱۴	۰/۰۱۰
مجموع دو جمعیت	۱۱۱	۲۴۶/۱۷		۲/۲۳	۱۰۰			

بحث

تنوع ژنتیکی در ساختار جمعیت ها از مهم‌ترین و اساسی‌ترین اصول لازم برای بقا و تکامل موجودات است که موفقیت و تداوم نسل جمعیت ماهیان را به ویژه در شرایط محیطی متغیر متضمن می‌شود (Diz and Presa, 2009). صید بیش از حد و سایر عوامل تنش‌زا نظیر آلودگی‌های محیطی با کاهش اندازه جمعیت مؤثر قابلیت جمعیت را برای حفظ تنوع کاهش می‌دهد و بقای آنها را به خطر می‌اندازد. تخمین این موضوع در جمعیت ماهیان به علت مهاجرت به داخل جمعیت و بازگشت شیلاتی در کوتاه مدت ممکن است به راحتی تشخیص داده نشود اما در بلند مدت و به ویژه برای ماهیان غیر مهاجر مانند کفشک‌ماهیان می تواند آثار به مراتب شدیدتری وارد نماید (Theodorakis and Shugart, 1997؛ Amy *et al*., 2006). در بررسی‌های ژنتیک جمعیت از شاخص های مختلفی همچون میزان هتروزیگوسیتی و تعداد آلل (واقعی و مؤثر) استفاده می‌شود و بر اساس یک شاخص به تنهایی نمی‌توان قضاوت صحیحی راجع به افزایش یا کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت ماهیان داشت. همچنین، میزان تنوع آللی نسبت به هتروزیگوسیتی در مطالعات ژنتیک جمعیت از اهمیت بیشتری برخوردار است و افزایش یا کاهش آن می تواند منعکس کننده افزایش یا کاهش اندازه مؤثر جمعیت باشد (Diz and Presa, 2009؛ Lind *et al*., 2009؛ Rezaei *et al*., 2011). میانگین تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مطالعه حاضر از مقادیر بیان شده طی مطالعه روی گونه شگ‌ماهی آمریکایی (*A. sapidissima*)کمتر بود (Julian and Bartron, 2009) که علت آن می‌تواند تفاوت در تعداد نمونه‌ها، تفاوت در تعداد پرایمر استفاده شده، اختصاصی نبودن آغازگرها و تفاوت در گونه مورد بررسی باشد. بر اساس مقایسه مقادیر غنای آللی (میانگین غنای آللی= ۱۲/۴) در پژوهش حاضر، با مقادیر استاندارد به دست آمده برای ماهیان آب شیرین می توان بیان نمود که تعداد آلل مشاهده شده در تحقیق حاضر متأثر از تعداد نمونه نبوده است (Dewoody and Avise, 2000, 6.1±9.1). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار کمتر است. جریان ژنی بالا و خطا در هنگام خواندن آلل‌ها از جمله دلایل مطرح برای این امر هستند (Skalla *et al*., 2004؛ Li *et al*., 2009). مقادیر ضریب درون‌آمیزی به دست آمده در جایگاه‌های ژنی نشان از کسری هتروزیگوسیتی معنی دار داشت (P<۰/۰۰۵). از جمله دلایل مؤثر در این مورد می‌توان وجود آلل نول، اختلاط بین جمعیت ها و ویژگی خود ریزماهواره ها را برشمرد. وجود درون‌آمیزی بین گونه‌ها فراوانی آللی را تغییر نداده بلکه به افزایش نسبت افراد هموزیگوت در

جمعیت منجر می‌شود و از این طریق تنوع ژنتیکی فردی کاهش می‌یابد. همچنین، با توجه به نتایج مبتنی بر احتمال وجود آلل نول در تمامی جایگاه‌ها توسط نرم‌افزار Microchecker می‌توان آلل نول را از مهم ترین عوامل دخیل در کسری هتروزیگوسیتی بیان کرد (Li *et al*., 2007). در رابطه با ماهی مطالعه شده در تحقیق حاضر از آنجا که در کشور ایران برنامه‌های به‌گزینی و تکثیر مصنوعی در مورد این ماهی صورت نمی‌گیرد، لذا کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) را می‌توان به سایر عوامل نظیر: آلل نول، درون‌آمیزی و ویژگی ذاتی آغازگرها نسبت داد. میانگین ضریب درون‌آمیزی در تحقیق حاضر معادل ۰/۳۹۵ به دست آمد که این ضریب درون آمیزی می تواند دلیل مؤثری بر کمبود هتروزیگوسیتی مشاهده شده باشد. در مطالعه‌ای با استفاده از هشت جفت نشانگر دی‌نوکلئوتیدی ریزماهواره بر روی دو گونه *A. fallax* و *A. alosa* اعلام شد که میزان متوسط آلل در هر جایگاه ژنی در دو گونه نامبرده به ترتیب برابر با ۴/۵۰ و ۴/۸۸ به دست آمد که از مقادیر مشابه به دست آمده در تحقیق حاضر کمتر بود، همچنین، میزان هتروزیگوسیتی را در دو گونه *A. fallax* و *A. alosa* به ترتیب ۰/۵۶۰ و ۰/۴۴۵ بیان کردند (Faria *et al*., 2004). بالا بودن تعداد آلل مشاهده شده در تحقیق حاضر (*A. braschnikowi*) نسبت به دو گونه *A. alosa* و *A. fallax* می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد که در این مورد تفاوت در نوع گونه، تفاوت در نوع پرایمر و تفاوت در تعداد نمونه نیز می‌تواند دخیل باشد، اما در کل نتایج به دست آمده می‌تواند گویای تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای گونه شگ‌ماهی خزری در این مطالعه باشد.

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های بررسی شده در پژوهش حاضر برابر با ۰/۵۲۵ بود که از مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای ماهیان آب‌های شیرین (Dewoody and Avise, 2000, Ho=0.54±0.25) بیشتر اما نسبت به ماهیان رودکوچ (*Anadromous*) (Dewoody and Avise, 2000, Ho=0.68±0.12) کمتر بود. همچنین، تعداد آلل متوسط در هر جایگاه ژنی در این تحقیق حاضر برابر با ۱۲/۴ به دست آمد که این مقدار از تعداد آلل مشاهده شده در استاندارد تعریف شده برای ماهیان آب شیرین (Dewoody and Avise, 2000, Na=9.1±6.1) و رود کوچ (Dewoody and Avise, 2000, Na=10.8±7.2) بیشتر بود. لذا، می‌توان این طور برداشت کرد که این ماهی با توجه به بسته بودن دریای خزر، فشار صید و مشکلات زیست محیطی همچنان دارای تنوع نسبتاً بالایی (هم به لحاظ آللی و هم به لحاظ هتروزیگوسیتی) است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اغلب جایگاه ها انحراف بالایی را از تعادل هاردی-وینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی نشان دادند و تنها دو آزمون از ۱۰ آزمون بررسی شده درون تعادل قرار داشتند و ۸ آزمون اختلاف معنی‌داری را از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دادند (P<۰/۰۰۱). لازم به توضیح است که انحراف از تعادل در جمعیت ماهیان به دلایلی مانند حضور آلل‌های نول، اختلاط جمعیت‌ها وآمیزش خویشاوندی قابل انتظار است (McQuown *et al*., 2003؛ Liu *et al*., 2005؛ Zhao *et al*., 2005؛ Dahle *et al*., 2006؛ Lucentini *et al*., 2006) که در رابطه با تحقیق حاضر می توان به حضور آلل نول و جریان ژنی بالا اشاره کرد. عوامل جدایی آللوپاتریک،

تاریخچه زندگی، شیوه و تفاوت اندام‌های تولید مثلی از جمله عوامل جدایی جمعیت‌ها هستند (Tiedemann *et al*., 2000). نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس شاخص Fst تنوع ژنتیکی پایینی معادل ۱ درصد را بین جمعیت‌ها نشان داد. همچنین، شاخص جدایی Fst مقدار ۰/۰۱۶ را نشان داد. هرگاه میزان Fst از ۰/۰۵ کمتر باشد نشان دهنده تمایز ژنتیکی اندک است (Balloux *et al*., 2002). همچنین، میزان جریان ژنی بالایی (۱۷/۳۴) در جمعیت‌ها مشاهده شد که می‌تواند عامل مهمی در تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت ها در این تحقیق باشد. همچنین، میزان شباهت ژنتیکی به دست آمده در این مطالعه برابر با ۰/۹۰ بود. طبق معیار استاندارد تعریف شده توسط Thorpe (۱۹۸۲) بر اساس شباهت و فاصله ژنتیکی، میزان شباهت ژنتیکی بین ۰/۸۰-۰/۹۰ در ارتباط با جمعیت هایی است که به یک گونه تعلق دارند که با نتایج حاصل از این تحقیق تطابق دارد.

نتیجه‌گیری کلی

مطاله حاضر به عنوان نخستین تحقیق پایه برای جنس *Alosa* در رابطه با ساختار ژنتیکی آن در آب‌های دریای خزر است. متأسفانه با توجه به نبود اطلاعات قبلی از ساختار ژنتیکی گونه *A. braschnikowi* در دریای خزر نمی‌توان راجع به افت داشتن یا نداشتن تنوع ژنتیکی این گونه در چند سال اخیر قضاوتی داشت اما با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان بیان نمود که ماهی *A. braschnikowi* در حال حاضر از تنوع نسبتاً مناسبی برخوردار است اما با توجه به مسایل زیست محیطی دریای خزر و بسته بودن آن احتمال کاهش تنوع آن وجود دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از مجموعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر فراهم آوردن شرایط لازم برای انجام این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

Abdoli, A. and Naderi, M. (2008) Fish species biodiversity of southern Caspian Sea. Abzian Scientific Publication, Tehran.

Amy, M., Mark, J., Suzanne, A. and Diane, E. (2006) Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. Ecotoxicology 15: 539-548.

Balloux, F., Brunner, H. and Lugon-Moulin, N. (2002) The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 321-323.

Coad, B. (2013) Fresh water fishes of Iran. Retrieved from http:// www. briancoad.com/ contents.htm. On: 19 May 2013.

Crooijmans, R. P. M. A., Poel, J. J., Groenen, M. A. M. and Bierbooms, V. A. F. (1997) Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Genetics 28: 129-134.

Dahle, G., Jorstad, K. E., Rusaas, H. E. and Ottera, H. (2006) Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morpha*) populations. Marine Science 63: 209-215.

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

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

Faria, R., Wallner, B., Weiss, S. and Alexandrino, P. (2004) Isolation and characterization of eight dinucleotide microsatellite loci from two closely related clupeid species (*Alosa alosa* and *A. fallax*). Molecular Ecology Notes 4: 586-588.

Goudet, J. (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Retrieved from http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. On: 17 June 2008.

Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. K. (1996) Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Hinten, G., Harriss, F., Rossetto, M. and Braverstock, P. R. (2003) Genetic variation and island biogreography: microsatellite and mitochondrial DNA variation in island populations of the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii*. Conservation Genetics 4: 759-778.

Julian, S. E. and Bartron, 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.

Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, Z. and Liang, L. (2007) Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations. Genetics and Genomics 34: 984-993.

Li, J., Wang, G. and Bai, Z. (2009) Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (Hyriopsis cumingii) estimated by microsatellite DNA markers. Aquaculture 287: 286-291.

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, Y., Chen, S., Li, J. and Li, B. (2005) Assessing the Genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. Aquaculture 243: 103-111.

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.

Maquan, E. C., Sloor, B. L., Sheehen, R. J. and May, B. (2000) Microsatellite analysis genetic variation in Sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. Amrican Fisheries Society 129: 1380-1388.

McQuown, E., Krueger, C. C., Kincaid, H. L., Gall, G. A. E. and May, B. (2003) Genetic comparison of Lake Sturgeon population: differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite Loci. Great Lakes Research 29: 3-13.

Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

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

Patimar, R., Habibi, S. and Jafari, F. (2011) A study on the growth parameters of *Alosa caspia caspia* Eichwald, 1838 in the southern Caspian coast. Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Research 64: 15-27.

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.

Raymond, M. and Rousset, F. (2003) Genepop 3.4., an updated version of Genepop v.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86:248-249.

Rezaei, M., Shabani, A., Shabanpour, B. and Kashiri, H. (2010) Genetic comparison of Caspian Sea *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) in Gorganroud and Cheshmekile (Tonekabon) rivers using microsatellite markers. Journal of Taxonomy and Biosystematics 2: 1- 14 (in persian).

Rezaei, M., Shabani, A., Shabanpour, B. and Kashiri, H. (2011) Microsatellites reveal weak genetic differentiation between *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) populations south of the Caspian Sea. Animal Biology 61: 469-483.

Skalla, A., Hbyheim, B., Glover, K. and Dahle, D. (2004) Microsatteletie analysis in domesticated and wild Atlantic salmon. Aquaculture 240: 131-143.

Theodorakis, C. W. and Shugart, L. R. (1997) Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. Ecotoxicology 6: 335-354.

Thorpe, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics 13: 139-168.

Tiedemann, R., Hardy, O., Vekemans, X. and Milinkovitch, M. C. (2000) Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. Molecular Ecology 9: 1159-1163.

Waldman, D. A. and Yammarino, F. J. (1999) CEO charismatic leadership: levels of management and levels-of-analysis effects. Academy of Management Review 24: 266-285.

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

Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhu, B., Brosse, S. and Chang, J. (2005) Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. Ichthyology 21: 7-13.

Zoller, S., Lutzoni, F. and Scheidegger, C. (1999) Genetic variation within and among populations of the threatened lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and implications for its conservation. Molecular Ecology Notes 8: 2049-2059.

Population structure of the Caspian shad (*Alosa braschnikowi* Borodin, 1904) in the southern coast of the Caspian Sea between Gomishan and Miankaleh regions

Omid Jafari, Ali Shabani and Hamed Kolangi Miandare *

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

The present study was carried out to determine population structure of *Alosa braschnikowi*, one of the endemic species in the Caspian Sea, with five polymorphic microsatellite loci (AsaD030, AsaD042, AsaC249, AsaD312, AsaC051). Fifty six specimens of *A. braschnikowi* were collected from Gomishan and Miankaleh (28 specimens for each population) in Golestan province. The results showed that the average observed heterozygosity for Gomishan and Miankaleh were 0.536 and 0.514, respectively, with an average of 0.525 for the two populations. The number of observed alleles per locus ranged from 8 to 17 with an average of 12.4 alleles. Average number of effective allele in Gomishan and Miankaleh was calculated 8.53 and 7.61. Also, in eight cases of 10 tests in Hardy-Weinberg equilibrium there was statistically significant deviation ($P<0.001$). The average amount of gene flow and Fis were 17.34 and 0.395, respectively. The Fst value was 0.016 which was indicative of the low genetic differentiation between the Gomishan and Miankaleh populations that could be due to the natural migration of the fishs. The results for molecular variance analysis based on Fst index, exhibited that genetic diversity within population was only 1 percent and among populations was 99 percent. The results of present study showed that although the genetic diversity of *A. braschnikowi* in Golestan province was appropriate, it is possible that genetic bottleneck will arise in future years.

Key words: Genetic variation, Caspian Sea, Microsatellite, *Alosa braschnikowi*

* hkolangi@gau.ac.ir