تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال دوم، شماره پنجم، زمستان ۱۳۸۹، صفحه ۲۹-۳۸
دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۴/۲۷ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۱۱/۰۳

مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ماهی سیاه‌کولی (*Vimba vimba persa* (Pallas, 1814)) در سواحل شرقی و غربی دریای خزر (رودخانه‌های حویق و گرگانرود) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سمیرا محمدیان، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران
سهراب رضوانی گیل کلائی*، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران
محمد کاظمیان، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران
ابوالقاسم کمالی، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران
محمدجواد تقوی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری
شقایق روح الهی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
فرامرز لالوئی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری
محجوبه نیرانی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری

چکیده

در سواحل جنوبی دریای خزر (رودخانه حویق واقع در استان گیلان و رودخانه گرگانرود واقع در استان گلستان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ماهی سیاه‌کولی دریای خزر (*Vimba vimba persa*) مطالعه شد. هدف از این تحقیق، مطالعهٔ ساختار جمعیت‌های احتمالی مربوط به گونهٔ سیاه‌کولی در دریای خزر و همچنین معرفی نشانگرهای ژنتیکی مربوط است. در این بررسی تعداد ۵۰ نمونه ماهی سیاه‌کولی توسط صید پره از مصب رودخانه‌های گرگانرود، واقع در استان گلستان (۳۰ نمونه) و حویق، واقع در استان گیلان (۲۰ نمونه) جمع‌آوری شد. استخراج ژنوم DNA از بافت باله نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش فنل- کلروفرم صورت گرفت و سپس واکنش PCR با ۱۷ جفت آغازگر ریزماهواره انجام پذیرفت که ۱۰ جفت از آنها توانایی تولید باندهای پلی‌مورف را داشتند. میانگین اللی به‌دست آمده در هر جایگاه ۶/۷۵ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۸۱۷ و ۰/۷۳۵ به‌دست آمد. بیشتر مناطق انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند. با توجه به مقادیر محاسبه شده Fst، به نظر می‌رسد که دو جمعیت معنی‌دار از ماهی سیاه‌کولی در سواحل شرقی و غربی دریای خزر وجود دارد که باید در بازسازی ذخایر مد نظر قرار گیرد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این بررسی، با توجه به کاهش شدید جمعیت این گونه و وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا، می‌توان حدس زد که این گونه در گذشته از تنوع فوق العاده بالایی بر خوردار بوده است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، دریای خزر، ریزماهواره، سیاه‌کولی، گلستان، گیلان

* rezvani@ifro.ir

مقدمه

دریای خزر بزرگترین دریاچه جهان است که پنج کشور آذربایجان، ایران، قزاقستان، روسیه و ترکمنستان در حوزه این دریا قرار دارند و به سه بخش شمالی، مرکزی و جنوبی (عمدتاً سواحل ایران) تقسیم می‌شود (Aubrey *et al*., 1994). Derzhavin در سال ۱۹۵۱ و Zenkevich در سال ۱۹۶۳ اعلام کردند که ۶۳ گونه ماهی و همچنین Kazancheyev در سال ۱۹۸۱ بیان نمود ۱۲۳ گونه ماهی از ۱۷ خانواده در این دریا زندگی می‌کنند. ماهی سیاه‌کولی به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) تعلق داشته، بومی دریای خزر است که در تمامی سواحل از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب مشاهده می‌شود. این گونه طبق طبقه‌بندی IUCN یکی از ذخایر در معرض تهدید دریای خزر است (Kiabi *et al*., 1999). این ماهی رودکوچ بوده، اغلب برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها، به ویژه رودخانه آستاراچای، ارس، شفارود، کرگانرود، ناورود، تالاب انزلی، حویق، گرگانرود، سفیدرود، خشکرود، تنکابن، سردآبرود، بابلرود، چالوس، هراز، قره سو، تجن و خلیج گرگان مهاجرت می‌کند (Berg, 1949). صید این ماهی به صورت حرفه‌ای و نیمه حرفه‌ای در دریا صورت می‌گیرد و میزان صید آن در سال‌های اخیر (۱۳۷۳-۱۳۸۷) بین ۳۴/۶-۳۳۰ تن متغیر بوده است (Ghaninejad *et al*., 2000). صید بیش از حد و از بین رفتن زیستگاه این ماهی، از مهمترین علل رو به زوال و کاهش جمعیت این گونه است (Jolodar and Abdoli, 2004).

یکی از مشکلات امروز ذخایر آبزیان در دنیا، کاهش تنوع ژنتیکی است که بر اثر فعالیت‌های متعدد بشر، اعم از ایجاد آلودگی‌ها، صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه، مسدود کردن مسیر مهاجرت و تکثیر مصنوعی موجب شده است تا جایی که افزایش تکثیر مصنوعی و رهاسازی گونه‌ها سبب یکسان‌سازی ژنتیکی شده و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را تحت تأثیر قرار داده است (Ferguson *et al*., 1995; Zhao *et al*., 2005).

مدیریت ذخایر آبزیان نیازمند مطالعات ژنتیک مولکولی است. بیشتر گونه‌ها بیش از یک ذخیره دارند که مدیریت شیلاتی با ترکیب ذخایر و با توجه به توانمندی آن در تجدید جمعیت‌ها و برداشت پایا از ذخایر می‌تواند کمک زیادی به حفظ و تنوع ژنتیکی آنها بکند، در نتیجه، شناسایی ذخایر از اصول مدیریت شیلاتی است (Waldman *et al*., 1999).

از سال ۱۹۹۰ با توسعهٔ روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای ریزماهواره که به عنوان نشانگر DNA، (Liu and Cordes, 2004) مطرح هستند، اطلاعات مفیدی در زمینه تنوع ژنتیکی، تنوع اللی و پارامترهای دیگری که در ایجاد جمعیت‌ها نقش تعیین‌کننده دارند، به‌دست آمد (Neigel, 1997; Beacham *et al*., 2000; Ward *et al*., 2001; Salini *et al*., 2004; Meng *et al*., 2009). از بزرگترین فواید نشانگرهای ریزماهواره اندازه نسبتاً کوچک آنها، توارث هم بارز، تولید پلی‌مورفیسم بالا و توارث‌پذیری آن‌هاست (Crooijmans *et al*., 1997; Aliah *et al*., 1999; Wei *et al*., 2001; Li *et al*., 2007; Yue *et al*., 2009).

Rezvani Gilkolaei و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) را بررسی کردند و سه جمعیت از این گونه را اعلام نمودند. همچنین Yue و همکاران در سال ۲۰۰۹

توانستند با استفاده از نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی باس دریایی اقیانوس اطلس (*Lates calcarifer*) را در آسیا مطالعه کنند و Aung و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان کردند نشانگرهای ریزماهواره توانایی نشان دادن ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ذخایر وحشی و پرورشی در گونهٔ *Cirrhinus cirrhosus* دارا هستند. اطلاعات اندکی دربارهٔ گوناگونی جمعیت و تنوع ژنتیکی سیاه‌کولی در سطح مولکولی در دریای خزر موجود است، و با توجه به اینکه انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر سیاه‌کولی، زمانی مفید واقع می‌شود که به کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت گونه مورد نظر منجر نشود، در نتیجه، بررسی تنوع ژنتیکی این ماهی یکی از اهداف مدیریت ذخایر است.

با توجه به مطالعات اولیه فرضیات زیر مطرح شد:

تنوع ژنتیکی در گونه سیاه‌کولی چگونه است؟ آیا تفاوت ژنتیکی در جغرافیای غرب و شرق حوزه جنوبی دریای خزر وجود دارد یا خیر؟ آیا این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار است یا خیر؟

و آیا نشانگرهای ریزماهواره توانایی نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در ماهی سیاه‌کولی را دارند یا خیر؟

از این‌رو، در این مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سیاه‌کولی (*Vimba vimba persa*) واقع در دو منطقه (رودخانه حویق واقع دراستان گیلان و رودخانه گرگانرود، واقع در استان گلستان) واقع در سواحل ایرانی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ نمونه به‌وسیله صید پره از نزدیکی مصب رودخانهٔ حویق با مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه طول جغرافیایی و ۵۲ درجه و ۳۹ دقیقه عرض جغرافیایی در جنوب غربی دریای خزر، واقع در استان گیلان و ۳۰ نمونه از رودخانه گرگانرود در محدوده طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۵۶ درجه و ۲۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۳۸ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی واقع در استان گلستان، صید شد. ۲-۳ گرم از بافت باله پشتی ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده جدا و در تیوب‌های اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی اتانول ۷۶٪ نگهداری و برای انجام مطالعات به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در شهر ساری منتقل شد. در آزمایشگاه، DNA ژنومی نمونه‌ها از بافت باله پشتی با استفاده از روش فنل- کلروفرم (Hillis and Moritz, 1990) استخراج گردید. سپس کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. برای انجام واکنش PCR از ۱۷ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده گردید. واکنش PCR توسط دستگاه ترمو سایکلر ساخت شرکت Eppendorf با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl2 با غلظت ۲/۵ میکرومول، ۲۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر (PCR) به ترتیب: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم اتصال پرایمرها به هدف

(Annealing) ۵۲-۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله سوم بسط پرایمر (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه برای همهٔ جفت پرایمرها تنظیم گردید. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد به همراه شناساگر bp DNA ۵۰، به مدت سه ساعت با ولتاژ ۱۵۰ وات الکتروفورز شد و قطعات حاصل از PCR روی ژل با استفاده از نیترات نقره رنگ شد. سپس برای سنجش وزن مولکولی محصول PCR بر حسب جفت باز (bp) و تعیین ژنوتیپ‌ها از نرم‌افزار UVDuc استفاده گردید. فراوانی اللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد الل‌های واقعی و الل‌های مؤثر برای هر جایگاه، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei,1978)، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر Fst و جریان ژنی با استفاده از نرم افزار GenAlex Ver.6 (Peakall and Smous, 2005) و حضور الل‌های نول با استفاده از نرم‌افزار Microcheker (version 2.2.3) محاسبه گردید (Van Oosterhout *et al*., 2004).

مشاهدات

با توجه به اینکه هیچ‌گونه اطلاعاتی در زمینه ژنوم این ماهی در دسترس نیست، از این رو برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت این ماهی از ۱۷ جفت پرایمرهای غیر اختصاصی که متعلق به خانواده کپور ماهیان بود، استفاده شد که از این تعداد ۱۳ جفت تولید باند نمودند که ۱۰ جفت آن باندهای پلی‌مورف و ۳ جفت باندهای مونومورف (Lco5, Lid1, MFW2) تولید کردند (جدول ۱). قطعات تکثیر شده در ۱۰ جایگاه ریزماهواره در PCR دامنه‌های متفاوتی را نشان دادند. کوچکترین قطعه مربوط به جایگاه Z8145 با طول ۹۲-۱۲۸ جفت باز بود. این آغازگر، قطعات کوچک و سبک وزن را ایجاد نمود. بزرگترین قطعه نیز در جایگاه Lco3 با طول ۳۰۸ -۳۸۴ جفت باز مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- جایگاه، دامنه اللی، دمای اتصال و شماره دسترسی به بانک ژنی پرایمرهای پلی‌مورف

جایگاه	دامنه اللی	دمای اتصال	شماره دسترسی به بانک ژنی
CA3	320-210	52	AF277575
CA7	216-148	58	AF277579
Lco1	384-308	56	AY318777
Lco3	292-250	62	AY318779
Lid-11	296-240	53	AB112736
Z21908	184-148	54	G40277
Z8145	124-92	55	G40625
Z7,8	152-116	56	Shimoda *et al*., 1999
Z9,10	156-116	64	Shimoda *et al*., 1999
Rru-2	220-148	54	AB11273

از ۱۳۶ الل مشاهده شده، ۱۱۶ الل با فراوانی P>۰/۰۵ در همه نمونه‌ها دیده شد که نمونه‌های رودخانه گرگانرود بیشترین فراوانی اللی (۷۲ الل) و نمونه های رودخانه حویق، کمترین فراوانی اللی (۶۴ الل) را نشان دادند. بیشترین تعداد الل مشاهده شده (Na) در جایگاه CA3 و کمترین آن در جایگاه Z8145 مشاهده شد (جدول ۲). بر اساس نتایج آزمون مربع کای بجز جایگاه CA7 در نمونه های رودخانه گرگانرود و جایگاه Lco3 در نمونه‌های رودخانه گرگانرود و حویق، خروج از تعادل هاردی-واینبرگ در همهٔ جایگاه‌ها (P≤۰/۰۱) مشاهده شد (جدول ۲). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و

هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) برای محاسبه تنوع ژنتیکی به ترتیب ۰/۷۳۵ و ۰/۸۱۷ به‌دست آمد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های رودخانه گرگانرود به میزان ۰/۸۲۷ بوده که این مقدار از میزان به دست آمده Ho در نمونه‌های رودخانه حویق بیشتر است (جدول ۲).

جدول ۲- مقادیر تعداد الل‌های مشاهده شده، بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، تعداد الل‌های واقعی (Na)، مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) در ۱۰ جایگاه ریزماهواره پلی‌مورف بر حسب مناطق مختلف نمونه‌برداری در ماهی سیاه‌کولی

	رودخانه گرگانرود			رودخانه حویق		
جایگاه	Ho	He	Na	Ho	He	Na
CA3	۰/۸٦۷	۰/۸۸	**۱۱	۰/۸۰۰	۰/۹۰	***۱۲
CA7	۰/۹۰۰	۰/۸٤	۷(ns)	۰/٦۳۳	۰/۸٤	***۷
Lco1	۰/۵۰۰	۰/۷٤	***۵	۰/۸٦۷	۰/۷۵	***٦
Lco3	۰/۹۳۳	۰/٦۹	*۵	۰/٦٦۷	۰/۵۱	٤(ns)
Lid11	۱/۰۰۰	۰/۸۰	***٦	۱/۰۰۰	۰/۷٤	***٦
Z21908	۰/۹۰۰	۰/۷۵	***۸	۰/۸۳۳	۰/۷۱	***۷
Z8145	۰/۱٦۷	۰/۵٤	***٤	۰/۲٦۷	۰/۵۵	***۳
Z7,8	۱/۰۰۰	۰/۷٦	***۸	۱/۰۰۰	۰/۸۰	***٦
Z9,10	۱/۰۰۰	۰/۸۰	***۸	۱/۰۰۰	۰/۷۸	***۷
Rru2	۱/۰۰۰	۰/۸۸	***۱۱	۱/۰۰۰	۰/۷۰	***٦
میانگین	۰/۸۲	۰/۷۷	۸/۷	۰/۸۰	۰/۷۳	٦/٤

***اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۰/۱ درصد (P<0.001)، تعادل هاردی-واینبرگ بسیار معنی‌دار است. **اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۱ درصد (P<0.01)، تعادل هاردی-واینبرگ معنی‌دار است. *اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد (P<0.05)، تعادل هاردی-واینبرگ معنی دار است. NS جایگاه بر اساس تعادل هاردی-واینبرگ غیر معنی‌دار است.

برای اندازه‌گیری تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از عامل Fst استفاده شد که این عامل به طور مستقیم و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت مؤثر برآوردکننده تمایز است. مقدار Fst بر اساس فراوانی بین نمونه‌های رودخانهٔ گرگانرود و حویق به میزان ۰/۰۶۱ با جریان ژنی به میزان Nm= ۳/۶۰۱ محاسبه گردید. همچنین با استفاده از نرم‌افزار Microcheker حضور الل‌ها نول در جایگاه‌های CA3، CA7 و LCO1 به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی گوناگونی و تنوع ژنتیکی سیاه‌کولی (*Vimba vimba persa*) به عنوان یک گونه در معرض خطر انقراض در سواحل جنوبی دریای خزر (Kibai *et al.*, 1999) ضروری است. از این رو، تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت این گونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره بررسی شد. در این مطالعه، حداقل تعداد ۳ الل و حداکثر ۱۲ الل، با میانگین اللی مشاهده شده ۶/۷ در هر جایگاه ژنی، در بین ۵۰ نمونهٔ جمع‌آوری شده در ۱۰ جایگاه ریزماهواره محاسبه شد.

میانگین تعداد اللی به دست آمده (۶/۷) کمتر از مقدار اعلام شده (۱۱/۳) برای ماهیان رود کوچ (Anadromus) است (Dewoody and Avis, 2000) که می‌توان علت کاهش فراوانی الل‌های این گونه را به علت وجود کاهش شدید جمعیت، به ویژه به حداقل رسیدن تعداد مولدینی که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها مهاجرت می‌کنند، دانست. نتیجه به‌دست آمده مشابه نتیجه Ruzzante و همکاران در سال ۱۹۹۹ بوده است. وی تعداد الل به‌دست آمده از ماهی *Gadus morhua* (۲/۷۱) را کمتر از مقدار اعلام شده (۷/۵) برای ماهیان دریایی به‌دست آورد که علت آن را صید بی‌رویه، آلودگی آب و از بین رفتن مکان‌های تخم‌ریزی این ماهی دانسته است. البته، با توجه به این که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ماهی سیاه‌کولی (۰/۸۱۷) بالاتر از میزان اعلام شده توسط DeWoody و Avis در سال ۲۰۰۰ برای ماهی رود کوچ (۰/۶۸) است، از این‌رو، می‌توان نتیجه گرفت که به رغم فشار بالای صیادی این گونه همچنان تنوع ژنتیکی خود را حفظ کرده و می‌توان حدس زد که این گونه در گذشته تنوع فوق‌العاده بالایی داشته است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بیشتر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند (P<۰/۰۰۱). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را می‌توان به علت حضور الل‌های نول که پهلوگیری در آنها صورت نمی پذیرد، وجود آمیزش‌های خویشاوندی در بین گونه‌ها، پهلوگیری تعداد محدودی از الل‌ها و ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها و خطای نمونه‌برداری دانست (Callen *et al*., 1993; McQuown *et al*., 2003; Skalla *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2005; Dahle *et al*., 2006; Chauhan *et al*., 2007; Li *et al*., 2007).

در این مطالعه خروج از تعادل را می‌توان به علت استفاده از پرایمرهای غیر اختصاصی، تعداد کم نمونه‌ها، خطای نمونه‌برداری و حضور الل‌های نول بیان نمود. با توجه به میزان فاصله ژنتیکی به‌دست آمده بین دو منطقه شرق و غرب حوزه جنوبی دریای خزر (۰/۳۰۴) و با توجه به گزارش Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، همچنین Thorpe و Sol-Cave (۱۹۹۴)، که فاصله ژنتیکی برای جمعیت‌های هم گونه به طور میانگین (۰/۰۰۲-۰/۰۷) و برای گونه‌های هم‌جنس به طور میانگین (۰/۰۳-۰/۶۱) گزارش کرده‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی به دست آمده در دامنه گونه‌های هم‌جنس است. وجود یک تمایز ژنتیکی معنی‌دار ما را در اندازه‌گیری اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت کمک می‌کند و عامل Fst نشان‌دهنده وجود تمایز در بین جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی است. با توجه به گزارش در سال ۱۹۷۸ هرگاه میزان Fst به‌دست آمده کمتر از ۰/۰۵ باشد، نشان‌دهنده وجود تمایز کمی در بین جمعیت‌هاست؛ هرچند حتی مقدار کم Fst نیز می‌تواند بازگوکننده اختلاف ژنتیکی مهمی در بین جمعیت‌ها باشد (Balloux *et al*., 2002)، البته، اثر پلی‌مورفیسم نیز میزان Fst را کاهش می‌دهد (Balloux *et al*., 2000).

هرگاه مقدار آن بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ باشد، نشان‌دهندهٔ تمایز متوسط و مقدار بالای ۰/۱۵ نشان‌دهنده تمایز بالاست. وجود دامنه‌های متفاوت Fst در بین جمعیت‌ها را می‌توان بیشتر به علت وجود جریان ژنی (Nm)، تأثیر رانش ژنی و جدایی جغرافیایی دانست (Li *et al*., 2007).

در مطالعه حاضر، Fst از طیف متوسط (۰/۰۶۵) و معنی‌دار (P<۰/۰۵) برخوردار بوده است. به نظر می‌رسد که دو جمعیت معنی‌دار از ماهی سیاه‌کولی در دو منطقه نمونه‌برداری وجود دارد. قاسم اف (۱۹۹۴) معتقد بود که سیاه‌کولی طی زمان حدود ۱۵۰۰ سال که دریای خزر از دریاهای اطراف جدا شد، جمعیت‌هایی را در دریای خزر تشکیل داده است و این فرآیند تکامل اکولوژیک هنوز ادامه دارد و کامل نشده است. وجود این دو جمعیت متفاوت در دو منطقه نمونه‌برداری دیده شده را می‌توان به علت نرمش زیاد اکولوژیک این ماهی در برابر شرایط مختلف اکولوژیک حاکم بر زندگی این ماهیان در مناطق شرقی و مرکزی دریای خزر دانست.

بر اساس گزارش Li و همکاران در سال ۲۰۰۷، هرگاه Nm>1 باشد، جریان ژنی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه Nm<1 باشد، رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود. از این رو، نتایج حاضر نشان‌دهنده این است که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها جریان ژنی به میزان ۳/۶۰۱ بوده و علت وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین این گونه را می‌توان وجود جریان ژنی در بین جمعیت‌ها دانست.

متأسفانه، با اینکه بیش از یک دهه است که شیلات ایران روش صید گوش‌گیر (Gill net) را در بهره‌برداری از ذخایر آبزیان دریای خزر ممنوع کرده و با پرداخت خسارت به صیادان مجوزهای صید آنها را پس گرفته است، اما مشاهده می‌شود در تالاب انزلی، که یکی از اصلی‌ترین زیستگاه‌های این گونه است، سازمان حفاظت محیط‌زیست به صیادانی مجوز صید با قلاب و دام‌های گوش‌گیر ریزچشمه را داده است و این صیادان با وجود کاهش شدید ذخایر به‌علت افزایش قیمت این ماهی با تلاش صیادی بیشتر به ادامهٔ صید می‌پردازند. همچنین، در رودخانه‌های محل مهاجرت این گونه، مثل رودخانه‌های آستاراچای، ارس، شفارود، کرگانرود، ناورود، تالاب انزلی، حویق، گرگانرود، سفیدرود، خشکرود، تنکابن، سردآبرود، بابلرود، چالوس، هراز، قره سو، تجن و خلیج گرگان (Berg, 1949)، صیادان دام‌گستر در فصل مهاجرت اجازهٔ تخم‌ریزی و تکثیر این ماهی را ندارند، اما درصد بالایی از ماهیان مهاجر به رودخانه را صید می‌کنند و ماهی‌ها با داشتن تخمدان رسیده در بازار با قیمت بالاتری به فروش می‌رسند. نبود برنامهٔ بازسازی ذخایر با تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهی و عدم کنترل صید و بهره‌برداری از این گونه باعث شده است که ما هر سال شاهد کاهش شدید ذخایر این گونه در آب‌های ایران باشیم.

به عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد که در رودخانه‌های گرگانرود و حویق، واقع در شرق و غرب حوزهٔ جنوبی دریای خزر، دو جمعیت متفاوت از این گونه زندگی می‌کنند و با اینکه ماهی سیاه‌کولی جزو گونه‌های در معرض تهدید است، اما توانسته تنوع ژنتیکی خود را در حد بالا حفظ نماید و برای حفظ این تنوع بالا باید اقدامات لازم لحاظ گردد. انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر روی این گونه ضروری است و با توجه به مستقل بودن ذخایر ژنتیکی باید برنامه‌ریزی‌های جامع‌تری صورت پذیرد که این بررسی اطلاعات مفیدی در زمینه تنوع ژنتیکی و تمایز ژنتیکی در بین جمعیت‌های گونه سیاه‌کولی در سواحل جنوبی دریای خزر در اختیار قرار می‌دهد. همچنین نتایج

به‌دست آمده نشان دادند که روش ریزماهواره توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در ماهی سیاه‌کولی را دارد.

تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران برای تأمین منابع مالی، تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و دکتر پورغلام، رییس پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به خاطر در اختیار قرار دادن آزمایشگاه و فراهم نمودن امکانات اقامتی، و از همکاری آقایان کر و طالشیان در جمع‌آوری نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

قاسم اف.، ای. جی. (۱۹۹۴) اکولوژی دریای خزر. ترجمه شریفی، الف.، انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران.

Aliah, R. S., Takagi, M., Dong, S., Teoh, C. T. and Taniguchi, N. (1999) Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*). Fisheries Science 65: 235-239.

Aubrey, D. G., Glushko, T. A. and Ivanov, V. A. (1994) North Caspian Basin: Environmental status and oil and gas operational, 650nd ed., Mobil-oil, Moscow.

Aung, O., Nguyen, T. T. T., Poompunang, S. and Kamonrat, W. (2010) Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal (*Cirrhinus cirrhosus*) in Myanmar. Aquaculture 299:37-43.

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

Balloux, F., Brunner, H., Lugon-Moulin, N., Hausser, J. and Goudet, J. (2000) Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. Evolution 54: 1414-1422.

Beacham, T. D., Pollard, S. and Le, K. D. (2000) Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena rivers in Northern British Columbia. Marine Biotechnology 2: 587-602.

Berg, L. S. (1949) Fresh water fishes of the U.S.S.R and adjacent countries. 2nd ed., Trady institute Acad, Moscow.

Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Philips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. and Sutherland, G. R. (1993) Incisence and origin of 'null' alleles in the $(AC)_n$ microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52:922-927.

Chauhan, T., Lal, K. K., Mohindra, V., Singh, R., Punia, O., Gopalakrishnan, A., Sharma, P. C. and Lakra, W. S. (2007) Evaluating genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp. Aquaculture 269: 135-149.

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.). Genet 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.

Derzhavin, A. E. (1951) Essays of the history of the Caspian Sea and freshwater bodies of Azerbaijan. Animal kingdom of Azerbaijan, Baku.

Dewoody J. A. D. and Avis J. C. (2000) Microsatellite and Anadromus fishes compared with other animals. Fish Biology 55:461-473.

Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. and Hynes, R. A. (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Fish Biology 47: 103-126.

Ghaninezhad, D., Abdolmaleki, S. and Fazli, H. (2000) Stock assessments of Teleost fishes in Caspian Sea. Iranian Fisheries Research and Training Organization. Tehran.

Hillis, D. M. and Moritz, C. (1990) Molecular taxonomy. Sinauer Sunderland, Masschusetts.

Jolodar, M. N. and Abdoli, A. (2004) Fish species atlas of South Caspian Basin (Iranian waters). Iranian Fisheries Research Organization, Tehran.

Kazancheyev, E. N. (1981) Fishes of the Caspian Sea. Food Industry Publication, Moscow.

Kiabi, B. H., Abdoli, A. and Naderi, M. (1999) Status of the fish fauna in the south Caspian basin of Iran. Zoology in the Middle East 18: 57-65.

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.

Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37.

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.

Meng, X. H., Wang, Q. Y., Jang, I. K., Liu, P. and Kong, J. (2009) Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis based on microsatellite DNA. Aquaculture 287: 46-51.

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

Neigel, J. E. (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology and Systematic 28: 105-128.

Peakall, R. and Smouse, P. E. (2006) GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Resources 6:288-295.

Rezvani Gilkolaei, S., Savari, M. A., Zolgharnein, H. and Nabavi, S. M. B. (2009) Genetic characterization of *(Rachycentron canadum)* using microsatellite marker. Iranian Fisheries Research and Training Organization 18: 69-61.

Ruzantee, D. F., Taggart, C. T. and Cook, D. (1999) A rewiew of the evidence for genetic structure of cod (*Gadus murha*) population in the NW Atlantic and population affinities of larval cod off Newfoundland and Gulf of St. Lawrence. Fish Research 43: 79-97

Salini, J. P., Milton, D. A., Rahaman, M. J. and Hussein, M. G. (2004) Allozyme and morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, *hilsa tenualosa ilisha*. Fish Research 66:53-69.

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.

Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., Sauvage, F. D., Jacob, H and Fishman, M. C. (1999) Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. Genomic 58: 218-232.

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

Thorpe, J. P. and Sol-Cave, A. M. (1994) The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. Zoological Scripta 23: 3-18.

Van Oosterhout, C., 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 4: 535-538.

Waldman, I. D., Robinson, B. F. and Rowe, D. C. (1999) A logistic regression based extension of the TDT for continuous and categorical traits. Annals of Human Genetics 63: 329-340.

Ward, R. D., Appleyard, S. A., Daley, R. K. and Reilly, A. (2001) Population structure of pink ling (*Genypterus blacodes*) from south-eastern Australian waters, inferred from allozyme and microsatellite analyses. Marine Freshwater Research 52: 965-973.

Wei, D. W., Lou, Y. D., Sun, X. W. and Shen, J. B. (2001) Isolation of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*). Zoology Research 22: 238-241

Wright, S. (1978) Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations. 2nd Ed., University of Chicago Press, Chicago.

Yue, G. H., Zhu, Z. Y., Lo, L. C., Wang, C. M., Lin, G., Feng, F., Pang, H. Y., Li, J., Gong, P., Liu, H. M., Tan, J., Chou, R., Lim, H. and Orban, L. (2009) Genetic variation and population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region. Aquaculture 293: 22-28.

Zenkevich, L. A. (1963) Biology of the seas of the USSR. Interscience Publishers. New York.

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.

The study of genetic diversity and population structure of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) populations in the Eastern and Western coastline of the Caspian sea (Havigh River and GorganRoud River) using microsatellite markers

Samira Mohamadian, Sohrab Rezvani Gilkolaei [1]*, Mohamad Kazemian [2], Abolghasem Kamali [2], Mohamad Javad Taghavi [3], Shaghayegh Rouholahi [4], Faramarz Laloei [3] and Mahjoubeh Nayerani [3]

[1] Iranian Fisheries Research Organization, Tehran
[2] Department of Fishereis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
[3] Ecology Research Center of the Caspian Sea, Sari
[4] Khoramshahr Marine Science and Technology University, Khoramshahr

Abstract

Genetic diversity of *Vimba vimba persa* was investigated using microsatellite markers from two regions of the Iranian coastline of southern Caspian sea (Havigh River in Guilan province, GorganRoud River in Golestan province). The purpose of this research was the study of *Vimba vimba persa*'s possible populations related to genetic diversity and population structure in the Caspian sea and introducing the useful genetic markers. To investigate the genetic structure of *Vimba vimba persa* populations, we sampled 50 specimens of *Vimba vimba persa* caught by beach seine from GorganRoud River in Golestan Province (30 specimens) and Havigh River in the Guilan Province (20 specimens). Genomic DNA was extracted from fin tissue by phenol-Chlorophorm method and PCR reaction was accomplished with 17 microsatellite primers 10 of which were amplified with reasonable polymorphism. Means of alleles were on 6.75 averages, observed and expected heterozygosity averages were 0.817 and 0.735, respectively. Most cases, significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p \leq 0.01$). According to the F_{st} values, there are two significant populations of *Vimba vimba persa* in the eastern and western coasts of the Caspian Sea which restocking of these species should be considered. Based on the survey revealed, since the population of this species is decreasing with its high genetic diversity, the Caspian Vimba had an enormous diversity in the past.

Key words: Genetic diversity, Caspian sea, Microsatellite, *Vimba vimba persa*, Golestan, Guilan

*Corresponding Author: rezvani@ifro.ir