ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحه ۴۱-۳۷

مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سعید کیوان شکوه*[۱]، احمد قاسمی[۲]

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲- مربی پژوهشی مرکز مطالعات و تحقیقات خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Keyvan56@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

با وجود اهمیت اقتصادی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) و همچنین لزوم گسترش اقدامات حفاظتی از جمعیت‌های آن، اطلاعات زیادی در مورد تنوع ژنتیکی آن در سطح مولکولی وجود ندارد. در این تحقیق با استفاده از شش لکوس مایکروساتلایت، رابطه ژنتیکی ماهی کلمه در دو منطقه خلیج گرگان و تالاب انزلی که زیستگاه دو جمعیت اصلی از این گونه به شمار می‌روند، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار Fst کل به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بالاتر از صفر بود که نشانه واگرایی دو جمعیت می‌باشد. هر دو جمعیت در برخی از لکوس‌ها از تعادل هاردی- وینبرگ انحراف داشتند که دلیل عمده آن می‌تواند کاهش هتروزایگوسیتی باشد. فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۲۹ بود که تمایز ژنتیکی آنها را مورد تایید قرار می‌دهد. تفاوت دو جمعیت از نظر تعداد آلل‌ها به ازای هر لکوس و همچنین میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در مدیریت ژنتیکی و همچنین حفاظت از جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

مایکروساتلایت،
تنوع ژنتیکی،
ماهی کلمه دریای خزر،
Rutilus rutilus caspicus

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]

مقدمه

ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) یکی از ماهیان اقتصادی دریای خزر می‌باشد که در حال حاضر به دلایلی نظیر صید بی‌رویه و تخریب زیستگاه، در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (۱). به همین دلیل، تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان به زیستگاه‌های طبیعی به عنوان یکی از اقدامات حفاظتی در حال انجام است. خلیج گرگان و تالاب انزلی، به عنوان دو زیستگاه اصلی این گونه در حوضه جنوبی دریای خزر به شمار می‌آید (۲) که بیش از ۴۰۰ کیلومتر با یکدیگر فاصله دارند.

با وجود اهمیت اقتصادی این گونه و همچنین لزوم گسترش اقدامات حفاظتی، اطلاعات زیادی در مورد تنوع ژنتیکی آن در سطح مولکولی وجود ندارد. اخیرا نشانگرهای RAPD به منظور تعیین رابطه ژنتیکی دو جمعیت مذکور مورد استفاده قرار گرفته است (۳). مطالعه اخیر نشان می‌هد اگر چه بعد مسافت جغرافیایی میان خلیج گرگان و بندر انزلی قابل ملاحظه است، اما تجزیه و تحلیل نشانگرهای RAPD حاکی از تمایز ژنتیکی اندک میان دو جمعیت مزبور بوده است.

اگرچه روش RAPD دارای مزایای متعددی است، اما یکی از معایب عمده استفاده از آن در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، عدم امکان تفکیک افراد هموزایگوت و هتروزایگوت است (۴). در میان نشانگرهایی که برای مطالعه تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند، نشانگرهای ریزماهواره (Microsatellites) به دلیل تنوع و فراوانی زیاد آنها و همچنین همبارز بودن، جایگاه ممتازی داشته (۵) و ابزار کارآمدی جهت سنجش دقیق‌تر تنوع ژنتیکی و مدیریت پایدار منابع آبزی به شمار می‌آید (۶، ۷، ۸). هدف از انجام این تحقیق تعیین دقیق‌تر رابطه ژنتیکی جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر در دو منطقه تالاب انزلی و خلیج گرگان بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

ماهیان مورد مطالعه از دو منطقه خلیج گرگان و تالاب انزلی واقع در سواحل جنوبی ایران با استفاده از تور صید گردید. از هر منطقه ۶۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب، و از بافت ماهیچه آنها نمونه برداری و تا زمان استخراج DNA در اتانول مطلق نگهداری شد.

استخراج DNA و تجزیه و تحلیل نشانگرهای ریزماهواره

تقریبا ۵۰ میلی گرم از بافت ماهیچه هر ماهی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از آنزیم پروتئیناز K، فنل-کلروفرم، ایزوآمیل آلکل و اتانول انجام شد (۹). کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز مورد تایید قرار گرفت.

شش لکوس ریزماهواره در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که شامل Ca3، Ca5، Ca12، Ca17، Ca1 (۱۰) و Z1206 (۱۱) بود که شماره‌های ثبت آنها در بانک ژن به ترتیب AF277575، AF277577، AF277588، AF277573 و G39981 است. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به ویژه دمای اتصال، بهینه سازی شد تا محصولات باندی قابل ثبت تولید شود. دمای اتصال برای آغازگرهای Ca3، Ca5، Ca12، Ca17، Z1206 و Ca1 به ترتیب ۵۵، ۵۷، ۵۷، ۵۱، ۵۸ و ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. حجم نهایی واکنش PCR ۵ میکرولیتر و حاوی حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، آنزیم تک پلیمراز (۰/۵ واحد)، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و ۱X بافر PCR بود. برنامه حرارتی PCR نیز به صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه جهت واسرشته سازی اولیه تنظیم شد و پس از آن با ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوطه و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مرحله گسترش ادامه یافت. برنامه فوق با درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بسط و خاتمه یافت. برای جداسازی محصولات PCR از ژل‌های پلی آکریلامید ۱۰ درصد و به منظور ظاهرسازی باندها از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله ویرایش ۶ نرم افزار GENALEX (۱۲) و با محاسبه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و بررسی هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده انجام شد. انحراف از تعادل هاردی- وینبرگ مورد آزمون قرار گرفت و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت بر اساس شاخص فاصله و شباهت ژنتیکی Nei

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]

(۱۳) تخمین زده شد. تمایز ژنتیکی دو جمعیت نیز با محاسبه مقادیر Fst مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

فراوانی‌های آللی کلیه لکوس‌های دو جمعیت در جدول شماره ۱ آورده شده است. بیشترین تعداد آلل‌ها (۱۵ آلل) مربوط به لکوس Ca5 و کمترین تعداد آلل‌ها (۲ آلل) مربوط به لکوس Ca17 بود. بیشترین تعداد آلل‌های اختصاصی در جمعیت تالاب انزلی دیده شد (جدول ۲). تعداد متوسط آلل‌ها به ازای هر لکوس، در جمعیت انزلی ۷/۸ و در جمعیت گرگان ۷/۱ بود. میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده در جمعیت انزلی و گرگان به ترتیب ۰/۵۶ و ۰/۶۰ محاسبه گردید (جدول ۱). در لکوس Z1206، هتروزایگوسیتی مشاهده شده در هر دو جمعیت بالاتر از مقادیر هتروزایگوسیتی مورد انتظار بود (P< ۰/۰۱). تفاوت دو جمعیت از نظر تعداد آلل‌ها به ازای هر لکوس و همچنین میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

جدول ۱- تنوع مربوط به شش لکوس ریزماهواره در جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر (*A*: تعداد آلل‌ها؛ *Ho*: هتروزایگوسیتی قابل مشاهده؛ *He*: هتروزایگوسیتی مورد انتظار؛ *P*: مربع آزمون کای در تعادل هاردی-واینبرگ)

لکوس	پارامتر	انزلی	گرگان
Ca3	*A*	۱۱	۸
	Ho	۰/۳۰۰	۰/۶۳۲
	He	۰/۸۵٤	۰/۷۰۲
	P	۰/۰۰۰*	۰/۰۰۱*
Ca5	*A*	۱۵	۱۰
	Ho	۰/٤۰۰	۰/٦۱۱
	He	۰/۸٦۹	۰/۸۲۷
	P	۰/۰۰۰*	۰/۰۱۱*
Ca12	*A*	۹	۹
	Ho	۰/۷۵۰	۰/۸۳۳
	He	۰/۸۳۵	۰/۸٤۷
	P	۰/۵۹۸	۰/۷٦۹
Ca17	*A*	۲	۲
	Ho	۰/۳۵۰	۰/۱۵۸
	He	۰/۲۸۹	۰/۲۲۹
	P	۰/۳٤۳	۰/۱۷۸
Ca1	*A*	٦	۸
	Ho	۰/۸۰۰	۰/۵۷۹
	He	۰/۷۹٦	۰/۸۱۰
	P	۰/۳۰۲	۰/۰۱۰*
Z1206	*A*	٤	٦
	Ho	۰/۸۰۰	۰/۷۸۹
	He	۰/۵۷۰	۰/۷٤۱
	P	۰/۰۰۰*	۰/۰۰۱*
میانگین تعداد آلل‌ها به ازای هر لکوس		۷/۸	۷/۱
میانگین *Ho*		۰/۵٦	۰/٦۰
میانگین *He*		۰/۷۰	۰/٦۹

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]

در جدول شماره ۱ انحرافات معنی‌دار از تعادل هاردی-واینبرگ در سطح لکوس نشان داده شده است. دو جمعیت بندر انزلی و خلیج گرگان به ترتیب در سه و چهار لکوس دارای انحراف بودند که دلیل عمده آن کاهش هتروزایگوسیتی می‌باشد. مقدار Fst کل به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بالاتر از صفر بود که نشانه واگرایی دو جمعیت می‌باشد. میزان فاصله ژنتیکی دو جمعیت بر اساس رابطه Nei (۱۳) ۰/۲۹ محاسبه گردید.

جدول ۲- تعداد آلل‌های اختصاصی مربوط به شش لکوس ریزماهواره در جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر

جمعیت	لکوس					
	Ca3	*Ca5*	*Ca12*	*Ca17*	*Ca1*	*Z1206*
تالاب انزلی	۴	۷	۱	۰	۰	۰
خلیج گرگان	۱	۲	۱	۰	۲	۲

بحث

در حال حاضر جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر در معرض خطر انقراض قرار دارد. با وجود اهمیت تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این گونه، هنوز اطلاعات کافی در این زمینه وجود ندارد. در این تحقیق با استفاده از شش لکوس ریزماهواره، روابط ژنتیکی جمعیت‌های ماهی کلمه دریای خزر در مناطق جنوبی دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفته است.

میانگین تعداد آلل‌ها به ازای هر لکوس و میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده در هر دو جمعیت انزلی و گرگان قابل قیاس بود. پیشتر نیز مطالعات Keyvanshokooh و Kalbassi (۳) همین وضعیت را بر اساس نشانگرهای RAPD نشان داده بود. اما نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد اگر چه دو جمعیت از نظر میزان تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص‌های فوق الذکر با هم تفاوتی ندارند، اما از نظر ماهیت تنوع ژنتیکی که به وجود آلل‌ها و ژنوتیپ‌های اختصاصی جمعیت‌ها بستگی دارد، بسیار متفاوت هستند. با توجه به تکثیر و رهاسازی این گونه در دریای خزر به منظور بازسازی ذخایر، پایش منظم تنوع ژنتیکی نتاج حاصل از تکثیر مصنوعی ضروری است تا از کاهش پلی مورفیسم فعلی به دلیل مشکلات ناشی از درون آمیزی (Inbreeding) و برون آمیزی (Outbreeding) جلوگیری شود.

اگر چه میزان انحرافات معنی‌دار از تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت گرگان نسبت به جمعیت انزلی در تعداد بیشتری از لکوس‌ها مشاهده شد، اما تفاوت دو جمعیت از نظر میانگین مقادیر هتروزایگوسیتی مورد انتظار و هتروزایگوسیتی مشاهده شده معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). انحرافات معنی‌دار از تعادل هاردی- وینبرگ می‌تواند ناشی از خطای نمونه‌برداری و یا وجود آلل‌های صفر در دو جمعیت مذکور باشد. در صورت وجود آلل‌های پوچ، فرد هتروزایگوتی که دارای یک آلل پوچ باشد به عنوان یک فرد هموزایگوت ثبت شده و موجب بروز نتایجی مبنی بر کاهش هتروزایگوسیتی خواهد شد.

محاسبه Fst در بررسی میزان تمایز جمعیت‌ها شاخص مفیدی به شمار می‌آید. در این مطالعه، میزان Fst به طور معنی‌دار بیشتر از صفر بود ($P<۰/۰۱$) که نشا ن می‌دهد دو جمعیت مذکور از نظر ژنتیکی با هم متمایز بوده و به یک جمعیت واحد تعلق ندارند.

در این تحقیق فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۲۹ محاسبه گردید. این در حالی است که مطالعات Keyvanshokooh و Kalbassi (۳) نشان می‌دهد فاصله ژنتیکی به دست آمده بر اساس نشانگرهای RAPD (۰/۰۴)، بسیار کمتر از فاصله ژنتیکی محاسبه شده در تحقیق حاضر می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های نشانگرهای RAPD (نظیر تصادفی و غیر اختصاصی بودن لکوس‌ها، امکان همپوشانی باندهای غیر همولوگ به دلیل مهاجرت همزمان و...)، اعتماد بر نتایج مطالعات RAPD، نیازمند تایید آنها با استفاده از نشانگرهای مطمئن‌تر است (۱۴). همانطور که انتظار می‌رفت، نشانگرهای ریزماهواره در بررسی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی جمعیت-های ماهی کلمه در مقایسه با نشانگرهای RAPD دارای کارآیی بیشتری بود که نتایج مشابهی در این خصوص گزارش گردیده است (۱۵).

در این تحقیق اطلاعات مفیدی در مورد مرزهای دقیق‌تر بین جمعیت‌های ماهی کلمه در سواحل جنوبی دریای خزر ارائه گردیده است و نتایج حاصل از آن می‌تواند در مدیریت پایدار

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]

جمعیت‌های این گونه در معرض خطر انقراض مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran. J. Zool. Mid. East. 18, 57-65.
2. Berg, L.S., 1949. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Israeli program for scientific translations, Jerusalem, 1964 pp.
3. Keyvanshokooh, S., Kalbassi, M.R., 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. Aquac. Res. 37, 1437-1440.
4. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W., 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Roton, FL, USA.
5. Weber, J.L., May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
6. Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites, Aquac. 247, 51-65.
7. Li, Q., Yu, H., Yu, R., 2006. Genetic variability assessed by microsatellite in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. Aquac. 259, 95-102.
8. Memis, D., Kohlmann, K., 2006. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey. Aquac. 258, 257-262.
9. Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F., Beardmore, J.A., 1999. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. J. App. Ichthyol. 15, 23-28.
10. Dimsoski, P., Toth, G.P., Bagleg, M.J., 2000. Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). Mol. Ecol. 9, 2187-2189.
11. Shimoda, N., Knapik, E.W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., de Sauvage, F., Jacob, H., and Fishman, M. C., 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58, 219–232.
12. Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 6, 288-295.
13. Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106, 283-292.
14. Barman, H., Barat, A., Bharat, M., Banerjee, Y., Meher, P., Reddy, P., Jana, R., 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. Aquac. 217, 115-123.
15. Bartfai, R., egedi, S., Yue, G.H., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L., Orban, L., 2003. Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite merkers. Aquac. 219, 157-167

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.4.7]
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]