



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره سوم، شماره دوم، تابستان ۹۴

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید (*Rutilus kutum* (Kamensky, 1901) برخی از رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندریایی (mtDNACy**b**)

حامد کلنگی میاندره^{۱*}، علی شعبانی^۲ و محمد حجتی^۳

^۱استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۲/۱۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۳

چکیده

در این بررسی ۱۵ نمونه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) از رودخانه‌های قره‌سو، گرگان‌رود (استان گلستان)، گهرباران، تجن و سفیدرود (استان مازندران) صید شدند. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت باله ماهیان انجام شد. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ماهی سفید از ژن سیتوکروم *b* استفاده شد. تکثیر ژن سیتوکروم *b* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن صورت گرفت. طول ۷۸۵ جفت باز از محصول واکنش زنجیره پلی‌مرازی توالی‌یابی شد. توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ژن سیتوکروم *b* موجود در بانک ژن مقایسه شدند. توالی‌های ژنی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزارهای MEGA5 و Bioedit7 مورد مقایسه قرار گرفتند و میزان همولوژی نمونه‌ها مشخص گردید. همچنین با استفاده از نرم افزار dnaSP5 میزان پلی‌مورفیسم یا تعداد هاپلوتیپ‌ها ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که در بین نمونه‌های مختلف ماهی سفید فاصله ژنتیکی خیلی کمی معادل ۰/۰۰۱ وجود دارد. همچنین تعداد ۶ نوع هاپلوتیپ بین نمونه‌های مورد مطالعه شناسایی گردید. بیشترین هاپلوتیپ در گرگان‌رود و قره‌سو مشاهده شد. همه نمونه‌ها بر اساس درخت فیلوژنتیک در یک شاخه قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: *R. kutum*، تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیک، سیتوکروم *b* هاپلوتیپ

*نویسنده مسئول: hkolangi@gmail.com

مقدمه

دریا به‌عنوان یکی از منابع تأمین غذا برای انسان شناخته شده است. افزایش فشار صید همراه با افزایش جمعیت در دهه‌های اخیر موجب بروز سیر نزولی در اکثر ذخایر شیلاتی گردیده است. بهره‌برداری پایدار از منابع آبی راهی مطمئن برای دست‌یافتن به منابع غذایی طولانی مدت به شمار می‌آید (Fiumera et al., 1999). این امر در گام اول منوط به شناخت ذخیره ژنتیکی و تنوع آبریان منابع آبی می‌باشد. سپس با توجه به شرایط، لازم است تدابیر مناسب برای مدیریت ذخایر اندیشیده شود. یک گونه، اغلب به گروه‌هایی تقسیم می‌شود که خصوصیات بیولوژیک و ضرایب رشد و مرگ و میر کمابیش متفاوتی دارند و در برابر اقدامات صید و احیاء، واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این گروه‌ها از نظر مدیریت شیلاتی اصطلاحاً "ذخایر" نامیده می‌شوند. ضرورت دارد پیش از هر اقدام گونه‌ها و جمعیت‌های مربوطه شناسایی شود.

ماهی سفید دریای خزر (*R. kutum*) از گونه‌های با ارزش غذایی بالا می‌باشد، لذا شناسایی و مطالعه جمعیت‌های مختلف آن از اهمیت بالایی برخوردار است. روش‌های گوناگونی برای بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف وجود دارد که می‌توان به نشانگرهای پروتئینی مانند آلوزایم و نشانگرهای بر پایه DNA مانند RAPD، RFLP، ریزماهورها و توالی‌یابی میتوکندریایی اشاره نمود. امروزه مارکرهای مورفولوژیک به دلیل تأثیرپذیر بودن از عوامل محیطی، تکنیک قدرتمند جهت طبقه‌بندی و ارزیابی تنوع موجودات نمی‌باشد. روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford et al., 2003). ژنوم میتوکندری (mtDNA) برای مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین گونه‌ها ارجحیت فراوانی دارد. کپی‌های بسیار متعدد از این اورگانل در هر سلول مطالعه آن را آسان نموده است. از طرف دیگر وراثت مادری (maternal)، عدم نوترکیبی (recombination) و سرعت بالای تغییرات ژنتیکی (۵-۱۰ برابر ژنوم هسته)، کاربرد وسیعی از آن را در مطالعات فیلوژنی، یافتن اجداد، جریان ژنی، پراکنش آنها، تشخیص مهاجرت‌ها، پراکنندگی جغرافیایی گونه‌ها و جمعیت‌ها فراهم نموده است (Wilson et al., 1997). این خصوصیات باعث شده از mtDNA به‌عنوان یک مارکر مولکولی بسیار خوب برای تشخیص گونه‌ها، ترسیم رابطه فیلوژنتیکی و مطالعه ژنتیک جمعیت یاد شود. با توجه به پراکنندگی وسیع ماهی سفید در حوضه دریای خزر تشخیص دقیق ساختار جمعیت‌های مختلف و تعیین هویت آن ضروری خواهد بود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه سیتوکروم *b* از DNA میتوکندریایی ماهی سفید دریای خزر و ارزیابی وضعیت ژنتیکی و میزان تنوع ژنتیکی این ماهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳ عدد نمونه بیولوژیکی (باله سینه‌ای ماهی سفید) از جمعیت ماهیان در پنج رودخانه استان‌های گلستان (قره‌سو، گرگان‌رود) و مازندران (گهرباران، تجن و سفیدرود) در حوضه جنوبی دریای خزر در فصل تولید مثل و مهاجرت ماهی سفید گرفته شد. میزان ۲-۳ گرم از باله سینه‌ای این ماهیان جدا شد و در ظروف نمونه‌برداری حاوی الکل مطلق به‌طور جداگانه قرار داده شدند و به‌منظور استخراج DNA و انجام مطالعه به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید.

استخراج DNA: روش‌های متعددی برای استخراج DNA وجود دارد، برای این مطالعه از روش فنل و کلروفورم (Hillis and Moritz, 1990) با اندکی تغییرات انجام گرفت. قبل از استخراج، فرآیند هموژنیزه کردن نمونه‌ها به کمک نیتروژن مایع انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودارپ مدل ND 2000 (شرکت THERMO آمریکا) و ژل آگاروز ۱٪ مشخص شد.

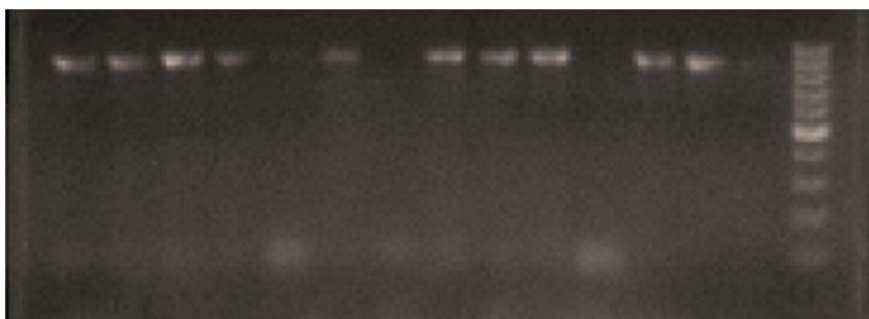
واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی: برای تکثیر ناحیه هدف ژن سیتوکروم *b* به طول ۹۰۰ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی به نام‌های CytR و CytF استفاده گردید. پرایمرهای CytF: CytR: TGAATAGTAGTGCAGGACCCCT و CCTGACAGGATTATTCTTAGCTATGC Accession:) برای تکثیر ژن *cyt b* براساس توالی‌های موجود ژن Cytocrome *b* گونه ماهی سفید (1.651802 NJ , 1.420442 NJ) و با استفاده از نرم‌افزارهای Bioedit و Primer3 طراحی گردید.

واکنش زنجیره پلی‌مرز توسط دستگاه Biorad در ۳۵ چرخه و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت‌سازی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۰/۶ میکرولیتر DNA، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمر ۵ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X و ۱۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. به‌منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش‌های PCR، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات PCR، خالص‌سازی شده و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به‌منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره‌جنوبی ارسال شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 توالی‌یابی گردیدند. توالی بدست آمده با استفاده از پرایمر طراحی شده با استفاده از رویه BLAST موجود در

بانک ژن به نشانی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) جهت بررسی میزان همپوشانی با توالی‌های ثبت شده مقایسه شد. از نرم‌افزار Bioedit به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. برای مطالعه و ارزیابی هاپلوتیپ‌های موجود در جمعیت‌های مورد مطالعه از نرم‌افزار dnaSP5 استفاده گردید. همچنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نمونه مورد مطالعه از نرم‌افزار MEGA5 استفاده گردید (Tamura *et al.*, 2011).

نتایج

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که قطعه اختصاصی برای سیتوکروم *b* به طول ۹۰۰ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱). نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعه سیتوکروم *b* برای همه نمونه‌ها انجام شد. مقایسه بین ۱۸ توالی با استفاده از ابزار DNA Seq Polymorphism تعداد ۶ هاپلوتیپ را در نمونه‌های مورد مطالعه اثبات نمود (شکل ۲ و جدول ۱). همچنین توالی‌های مورد مطالعه به‌طور میانگین حاوی ۲۶/۹۷٪ باز آدنین، ۲۹/۴۲٪ سیتوزین، ۱۴/۸۴٪ گوانین و ۲۸/۷۷٪ باز تیمین بود. تعدادی نشانگر SNP در هاپلوتیپ‌های مشاهده شده جمعیت‌های مورد مطالعه شناسایی گردید (جدول ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به طول ۹۰۰ جفت باز روی ژل آگاروز ۱٪، گونه مورد مطالعه: *R. kutum*

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید (*Rutilus kutum* (Kamensky, 1901) برخی از....

Cyt b Gene Haplotype of *Rutilus firsii* kutum

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Gharesol	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
Ghareso2	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
Gorganrod	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
Goharbaran	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
Tajan	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
Sefidrod	TATGGCTGGC	TTATCGGAAA	CCTACACGCT	AATGGGGCAT	CCTTCTTCTT	CATCTGTCTT	TATATACATA	TGCGACGAGG	CCTATACTAC	GGATCATACC
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Gharesol	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
Ghareso2	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
Gorganrod	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
Goharbaran	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
Tajan	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
Sefidrod	TTTATAAAGA	AACTGAAAC	ATTGGTGTAG	TCCTATTCCCT	CCTAGTTATA	ATGACAGCCT	TCGTGGGCTA	CGTATTGCCA	TGAGGACAAA	TATCCTCTGT
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Gharesol	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
Ghareso2	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
Gorganrod	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
Goharbaran	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
Tajan	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
Sefidrod	AGGTGCCACC	GTAATCAGCA	ACCTCCTCTC	AGCAGTCCTT	TACATAGGAG	ATACCCCTCGT	TCATGAATC	TGAGGCGGTT	TCTCAGTAGA	CAACGCAACC
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Gharesol	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
Ghareso2	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
Gorganrod	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
Goharbaran	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
Tajan	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
Sefidrod	CTTACACGAT	TCTTCGCATT	CCACTTCTCT	CTACCGTTTG	TCGTGCGCGG	CGCAACCATC	CTACACCTAC	TATTTTACA	CGAAACGGGG	TCAAACAACC
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Gharesol	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
Ghareso2	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
Gorganrod	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
Goharbaran	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
Tajan	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
Sefidrod	CGGCCGGGCT	AAACTCGGAC	GCAAATAAAA	TTTCTTTCCA	CCCATATTTT	TCATATAAAG	ACCTCCTTGG	CTTTGTAATT	ATGTTACTAG	CTCTCACCTC
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Gharesol	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
Ghareso2	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
Gorganrod	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
Goharbaran	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
Tajan	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
Sefidrod	TTTAGCATT	TTTTCTCCTA	ACCTATTAGG	TGACCCAGAA	AACCTTACGC	CAGCAAACCC	ACTCGTGACA	CCCCACATA	TTGAGCCAGA	ATGATACTTC
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Gharesol	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
Ghareso2	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
Gorganrod	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
Goharbaran	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
Tajan	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
Sefidrod	TTATTGGCT	ACGCCATTCT	CGATCCATC	CCAAACAAC	TAGGAGGGGT	CCTCGCACTA	CTATTACGCA	TTCTAGTGCT	AATAGTTGTC	CCAATCTTAC
	710	720	730	740	750	760	770	780		
Gharesol	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	
Ghareso2	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	
Gorganrod	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	
Goharbaran	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	
Tajan	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	
Sefidrod	ATACCTCAA	ACAACGAGGA	CTAACTTTCC	GCCCCGTGAC	ACAATTTT	TTCTGAACCC	TAGTTGCAGA	TATATTATC	TTAAC	

شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم *b*، به طول ۷۸۵ نوکلئوتید، برای هاپلوتیپ‌های شناخته شده در مناطق مورد مطالعه (SNP ها به صورت رنگی مشخص گردیدند) گونه مورد مطالعه: *R. kutum*

جدول ۱- SNP های مشاهده شده در هاپلوتایپ‌های موجود در رودخانه‌ها، گونه مورد مطالعه: *R. kutum* (۳-۱): نمونه‌های قره‌سو، ۴-۶: نمونه‌های گرگان‌رود، ۷-۹: نمونه‌های گهرباران، ۱۰-۲۱: نمونه‌های تجن، ۳۱-۵۱: نمونه‌های تنکابن، ۶۱-۸۱: نمونه‌های سفیدرود)

locus and conserved nucleotide	G.9	T.546	A.588	C.734
Sample				
1	*	C	*	*
2	*	*	*	*
3	A	*	*	*
4	*	*	*	*
5	*	C	*	*
6	*	C	*	*
7	*	*	*	*
8	*	*	*	A
9	*	*	*	*
10	*	*	*	*
11	*	*	*	*
12	*	C	G	*
13	*	*	*	*
14	*	*	*	*
15	*	*	*	*
16	*	*	G	*
17	*	*	*	*
18	*	*	*	*

بیشترین تکرار هاپلوتایپ در جایگاه T.546 در نمونه‌های رودخانه‌های قره‌سو، گرگان‌رود و تجن دیده شد. همچنین بیشترین تعداد هاپلوتایپ در رودخانه قره‌سو مشاهده شد. در ادامه با استفاده از ابزار BLAST موجود در بانک ژن NCBI تعیین همولوژی توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن صورت پذیرفت. جستجو در پایگاه نوکلئوتیدی تنها در جنس *Rutilus spp.* و خانواده کپور ماهیان صورت گرفت. در حدود ۱۸ توالی مربوط به ژن سیتوکروم *b* در بانک ژن ثبت شده بود که توالی‌های انجام شده در این مطالعه دارای همپوشانی ۹۹٪ بودند، تنها در گونه *Rutilus rubilio* میزان همولوژی در حدود ۳۹٪ کاهش نشان داد. همچنین *Chondrostoma duriense* و *Chondrostoma oligolepis* به ترتیب دارای ۸۹ و ۸۸ درصد شباهت با توالی‌های بدست آمده در این مطالعه را نشان دادند. بیشترین همپوشانی در مطالعه BLAST مربوط به گونه کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) در حدود ۹۹٪ می‌باشد، این نتایج دلالت بر قرابت ماهی سفید به ماهی کلمه نسبت به دیگر گونه‌های مقایسه شده دارد.

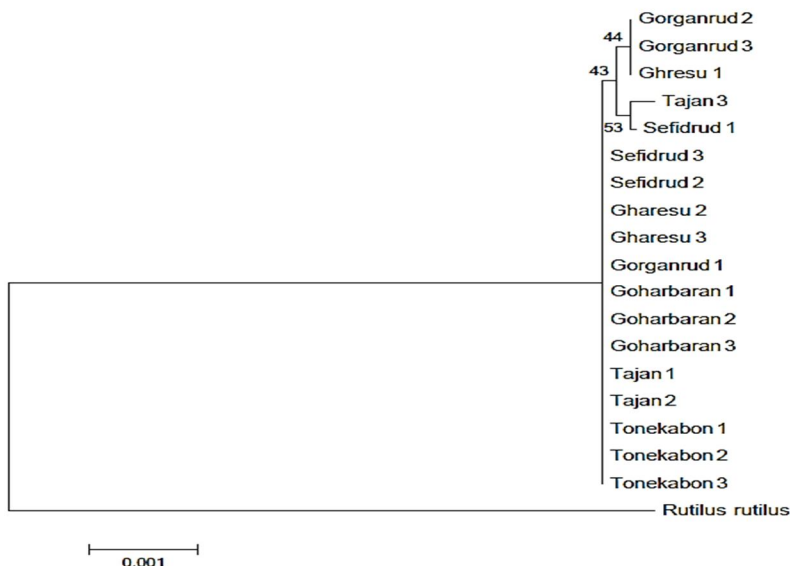
محاسبه فواصل ژنتیکی (جدول ۲) ترسیم درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های ماهی سفید با استفاده از توالی سیتوکرومی مناسب موجود در پایگاه NCBI به‌منظور استفاده out group به روش neighbor

(NJ)joining با استفاده از نرم افزار MEGA5 صورت پذیرفت. ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) به دلیل قرابت بیشتر به عنوان گروه خارجی مناسب انتخاب گردید (شکل ۳).

جدول ۲- فواصل ژنتیکی بین توالی‌های بدست آمده در مناطق مورد بررسی، گونه مورد مطالعه *R. kutum*

	قره‌سو	گرگان‌رود	گهرباران	تجن	تنکابن	سفیدرود
قره‌سو						
گرگان‌رود	۰/۰۰۱					
گهرباران	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱				
تجن	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱			
تنکابن	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱		
سفیدرود	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

بر اساس درخت فیلوژنیک رسم شده (شکل ۳) تمامی ماهیان سفید مورد آزمایش در یک شاخه قرار گرفته و تنها هاپلوتیپ‌های مشاهده شده در جمعیت‌های مورد مطالعه در زیرشاخه‌های دیگر قرار گرفته‌اند. هاپلوتیپ‌های گرگان‌رود، قره‌سو، تجن و سفیدرود در یک زیرشاخه قرار گرفته که نشان دهنده وجود جریان ژنی به علت مهاجرت مولدین ماهی سفید به این مناطق می‌باشد. این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده وجود جریان ژنی مفید در جمعیت ماهیان سفید در استان‌های گلستان و مازندران باشد که از کاهش تنوع زیستی این گونه جلوگیری می‌نماید.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighbour-joining. ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) به عنوان out group در ترسیم درخت فیلوژنی به کار رفته است.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات فیلوژنتیکی، تجزیه و تحلیل مستقیم DNA بر اساس توالی نوکلئوتیدهای آن، کاربردهای زیادی در زمینه‌های مختلف مطالعه ماهیان همچون تخمین پارامترهای بیولوژیک، زمان تخم‌ریزی و مهاجرت ماهیان، معین نمودن ذخایر و ساختار جمعیتی اشاره کرد (Wilson *et al.*, 1997). تعداد نمونه‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش‌های ژنتیکی بسته به روش مورد استفاده متفاوت است. در میان تکنیک‌های ملکولی، تکنیک توالی‌یابی به دلیل سادگی روش کار، کوتاهی مراحل و دقت بسیار بالا دارای جایگاه ویژه‌ای است. دقت فراوان این روش، تعداد نمونه‌های مورد نیاز برای مطالعه را کاهش می‌دهد و محققان را قادر ساخته که برای مطالعه رابطه فیلوژنتیکی، با استفاده از دو، سه یا حتی یک عدد از نمونه‌های ساکن در مناطق مختلف، اقدام کنند. کتمایر و همکاران (Ketmaier *et al.*, 2008)، در بررسی سیستماتیک ملکولی و فیلوژنتیکی *Rutilus rutilus* مناطق اطراف مدیترانه به سه نمونه از هر منطقه مورد بررسی بسنده کردند. لامورسیا و همکاران (Larmuseau *et al.*, 2009)، در بررسی تبارشناسی فیلوژوگرافیک و جمعیت‌شناسی *Rutilus rutilus* در ۵۲ منطقه نمونه‌گیری در گستره اوراسیا، در نمونه‌برداری‌ها برای برخی مناطق، یک تا سه عدد نمونه را کافی دانستند. به نظر می‌رسد با توجه به انتخاب روش توالی‌یابی و سابقه تحقیقات معتبر، تعداد سه نمونه برای هر یک از مناطق مورد بررسی کافی بوده است.

شناسایی تحولات درون‌گونه‌ای و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره‌برداری می‌باشد (Rezvani Gilkolai, 1997). به‌طور کلی در جانوران دریایی احتمال تنوع DNA میتوکندری خیلی کم می‌باشد و عواملی مانند شرایط نامساعد و محدود محیطی یا مرگ و میر که به دلایل خاصی اتفاق می‌افتد، یکی از عوامل بروز اختلافات نوکلئوتیدی می‌باشد (Ovenden and White, 1990). اغلب گزارشات در زمینه تجزیه DNA میتوکندری ماهی‌ها، تنوع هاپلوئیدی کمی نشان داده و در واقع هاپلوטיפ‌های موجود مشتقات جهش یافته می‌باشد (Billington and Herbert, 1991). تغییرات DNA میتوکندری ممکن است به‌عنوان ابزار در تفکیک و مدیریت ذخایر گونه‌های مختلف ماهی مفید باشد (Billington *et al.*, 1992). با توجه به منشاء مادری میتوکندری، نوترکیبی در آن صورت نمی‌گیرد و این خاصیت سبب بروز اختلافات ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است (Berrebi, 1996). اخیراً از مطالعات مولکولی در کنار مطالعات مورفولوژیکی برای تعیین وضعیت تاکسونومیک دقیق موجودات استفاده می‌گردد. در اکثر این مطالعات از مارکرهای مبتنی بر DNA از جمله سیتوکروم *b*, COI به‌عنوان متداول‌ترین روش در این بررسی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kolangi *et al.*, 2013; RaisAzizi *et al.*, 2013). تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط سازمان حفاظت جهانی برای برنامه‌های حفاظت

ذخایر است. تجمع تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی بسیار آهسته است ولی در صورت عدم پیشگیری، ممکن است به سادگی و طی پرورش مصنوعی چند نسل از بین رود. برنامه بازسازی ذخایر ماهی سفید از بیش از سه دهه پیش آغاز شده و با توجه به حجم بالای رهاسازی لاروهای ماهی سفید و نبود شرایط لازم برای تکثیر طبیعی این گونه به نظر می‌رسد که جمعیت ماهی سفید بدست آمده از تکثیر مصنوعی به تدریج در دریای خزر غالب شده است. در میان ۱۸ نمونه مورد بررسی، ۶ هاپلوتایپ شناسایی شد که در این میان بیشترین تعداد هاپلوتایپ مربوط به رودخانه قره‌سو و کمترین آن در رودخانه تنکابن بوده است. عبدالهی و همکاران (Abdolhay et al., 2011) با بررسی ۱۹۸ نمونه از ماهی سفید در چهار رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-PLFR، در مجموع ۲ هاپلوتایپ را شناسایی و متوسط تنوع ژنتیکی را ۰/۸۸ درصد بیان می‌کنند.

بررسی دندروگرام ترسیم شده از نمونه‌های مورد مطالعه در کنار سایر گونه‌های کپور ماهیان نشان می‌دهد که ماهی سفید و ماهی کلمه در یک خوشه قرار می‌گیرند. این نتیجه، حاکی از قرابت ژنتیکی این دو گونه دارد. وجود اختلافات مورفولوژیک و عدم اختلاف ژنتیکی بین آنها می‌تواند مربوط به نقش ساختاری ژنوم میتوکندری باشد و محصولات ژن‌های این ارگانل‌ها در فنوتیپ موجود نقشی ندارند یا اینکه به احتمال زیاد هر دو گروه از میتوکندری اجدادی مشترکی مشتق شده‌اند و سیر تکاملی صفات مورفولوژیک و ژنتیکی به صورت مستقل از هم صورت پذیرفته‌اند (Shemshad et al., 2007).

ماهی سفید در مرحله بعد بیشترین قرابت را با گونه‌های *Abramis brama*, *Alburnus alburnus*، *Chondrostoma regium*، *Vimba vimba* دارد. همچنین این ماهیان بیشترین فاصله ژنتیکی را در میان نمایندگان مورد بررسی از کپور ماهیان، با گونه *Gobio gobio* نشان می‌دهند. بر اساس دندروگرام ترسیم شده از نمونه‌های مورد مطالعه در کنار نماینده‌ای از ماهی کلمه نشان داد که نمونه‌های قره‌سو و گرگان‌رود نسبت به دیگر نمونه‌ها دارای قرابت بیشتری هستند که با توجه به قرابت جغرافیایی این دو رودخانه، چنین نتیجه‌ای توجیه‌پذیر است. خوشه‌های ایجاد شده نشان می‌دهد که یکی از نمونه‌های قره‌سو با نمونه‌های گرگان‌رود حتی بیشتر از نمونه‌های هم رودخانه خود، قرابت ژنتیکی نشان داد که با توجه به فاصله کم این دو رودخانه، احتمالاً خطای جهت‌یابی ماهی می‌تواند دلیل این امر باشد. همین مطلب در ارتباط با دو نمونه از ماهی‌های سفیدرود و تجن مشاهده می‌شود که هر چند این دو رودخانه فاصله نسبتاً قابل توجهی از هم دارند. اما مطالعه عبدالحی و همکاران (Abdolhay et al., 2011) نیز در مورد نمونه‌های این دو رودخانه همین نتایج را نشان داده است. رودخانه‌های تنکابن و گهرباران از نظر ژنتیکی دارای یک‌دست‌ترین نمونه‌ها بودند. به طوری که هر شش نمونه مربوط به این دو رودخانه، در کنار هم قرار گرفتند. در این مطالعه، نمونه‌های قره‌سو و تجن در میان نمونه‌های مورد مطالعه، دارای نزدیکی زیادی بوده که این نتایج با نتایج مطالعه رضایی (Rezaei et al., 2011) همخوانی دارد. بر

اساس این مطالعه جمعیت‌های مورد مطالعه با وجود فاصله مکانی زیاد با هم در سطح گونه کاملاً همپوشانی نشان داده و نمی‌توان این جمعیت‌ها را از نظر ژنتیکی دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای دانست. علی‌رغم وجود شرایط اکولوژیکی متفاوت در مناطق مورد بررسی به‌نظر می‌رسد به علت قدرت بالای این ماهیان در مهاجرت و حرکت، محیط قادر به ایزوله کردن این جمعیت‌ها نبوده و این امر باعث بوجود آمدن اختلاط جمعیتی بین آنها و ایجاد یک تاکسون واحد شده است.

به‌منظور داشتن تکثیر مصنوعی مناسب از دیدگاه ژنتیکی باید از انواع ادوات صید مناسب جهت اطمینان از غیرانتخابی بودن صید مولدین، استفاده از تعداد مولد زیاد، تکثیر مولدین بدون توجه به سایز یا سن مولد، جلوگیری از تلفات مولدین در شرایط حمل و نقل و نگهداری، تکثیر و پرورش در شرایط مناسب جهت بالا بردن میزان کیفیت لقاح و بقای لاروها، رشد مناسب بچه‌ماهیان و رهاسازی هر گروه از بچه‌ماهیان با توجه به منطقه صید مولدین همان گروه را مد نظر داشت. هرچند از وضعیت تنوع ژنتیکی ماهی سفید قبل از شروع برنامه بازسازی ذخایر این گونه توسط سازمان شیلات ایران اطلاعی در دست نیست اما می‌توان گفت که شیوه اعمال سیاست تکثیر مصنوعی ممکن است دلیل اصلی کم بودن تمایز و سطح تنوع ژنتیکی فعلی در بین جمعیت‌های مورد بررسی از ماهی سفید باشد. بر اساس نتایج بدست آمده سطح تنوع ژنتیکی ماهی سفید هنوز در حد مطلوبی است هرچند آثار زیان‌بار تکثیر مصنوعی قابل مشاهده است.

منابع

- Abdolhay H.A., DaudSiti Kh., RezvaniGilkolahi S., Pourkazemi M., SirajSiti Sh., Javanmard A. 2011. Genetic diversity of Mahisefid (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901) in different rivers of the south Caspian Sea using PCR-RFLP. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11(2): 235-251. (In Persian).
- Berrebi P. 1996. Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. Journal of Biological Conservation, 72: 237-249.
- Billington N., Barrette R.J., Herbert P.D.N. 1992. Management implication of mtDNA variation in Walleye stocks. North American Journal of Fisheries Management, 12: 276-284.
- Billington N., Herbert P.D.N. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implication for introduction. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 48: 80-94.
- Bruford M., Bradley D., Luikart G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Journal of Nature Reviews Genetics, 3: 900-910.

- Fiumera A.C., Wu L., Parket P.G., Fuetst P.A. 1999. Effective population size in the captive breeding program of the Lake Victoria cichlid *Paralabidoc bromisbilotes*. *Zoo Biology*, 18: 886-892.
- Hillis D.M., Moritz C. 1990. *Molecular Systematic*. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauern Associates, Inc. Publishers. 588 p.
- Ketmaier V., Bianco P.G., Durand J.D. 2008. Molecular systematic, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 362-367.
- Kolangi-Miandare H., Askari Gh., Fadakar D., Aghilnegad M., Azizah S. 2013. The Biometric and Cytochrome Oxidase sub unit I (COI) Gene sequence Analysis of *Syngnathus abaster* (Teleostei: Syngnathidae) in Caspian Sea. *Molecular Biology Research Communications*, 2(4): 133-142.
- Larmuseau M.H.D., Freyhof J., Volckaert F.A.M., Van Houdt J.K.J. 2009. Matrilinial phylogeography and demographical patterns of *Rutilus rutilus*: implications for taxonomy and conservation. *Journal of Fish Biology*, 75: 332-353.
- Ovenden J.K., White R.W.G. 1990. Mitochondrial and Allozyme genetics of incipient speciation in a landlocked population of *Galaxias truttaceus* (pices: Galaxiidae). *Journal of Genetics*, 124: 237-249.
- RaisAzizi M., Gharaei A., Ghaffari M. 2013. Investigation of phylogenetic relationship of Barbinae species in south of Iran. *Modern Genetics Journal*, 8: 313-320
- Rezaei M., Shabani A., Shabanpour B., Kashiri H. 2011. Microsatellites reveal weak genetic differentiation between *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) populations south of the Caspian Sea. *Journal of Animal Biology*, 61(4): 469-483.
- RezvaniGilkolai S. 1997. Molecular population genetic of Sturgeon species in the south Caspian Sea. A ph.D. Thesis. School of Biological Sciences University of Wales, 196 p. (In Persian).
- Shemshad Kh., Oshaghi M.A., Yaghoobi-Ershadi M.R., Vatandoost H., Abaie M.R., Zarei, Z. 2007. Morphological and molecular characteristics of malaria vector *Anopheles superpictus* populations in Iran. *Tehran University Medical Journal*, 65: 1-13.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Wilson A.C., Cann S.M., Goerge M., Gyhensten V.B., Helm By Chcowsh K.M. 1997. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400.

