دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی 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 (mtDNA*Cytb*)

حامد کلنگی میاندره*[1]، علی شعبانی[2] و محمد حجتی[3]

[1]استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2]دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[3]دانش‌آموخته 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 فیلوژنیک در یک شاخه قرار گرفتند.

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

*نویسنده مسئول: hkolangi@gmail.com

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

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 آبزیان 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 دربرابر 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، ریزماهواره‌ها و توالی‌یابی میتوکندریایی اشاره نمود. امروزه مارکرهای مورفولوژیک به‌دلیل تأثیرپذیر بودن از عوامل محیطی، تکنیک قدرتمند جهت طبقه‌بندی و ارزیابی تنوع موجودات نمی‌باشد. روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندریای 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 درمطالعات فیلوژنی، یافتن اجداد، جریان ژنی، پراکنش آنها، تشخیص مهاجرت‌ها، پراکندگی 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 پراکندگی 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 میتوکندریای ماهی سفید دریای خزر و ارزیابی وضعیت ژنتیکی و میزان تنوع ژنتیکی این ماهی می‌باشد.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

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 ۳-۲ 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 کلروفرم (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 CytF و CytR استفاده گردید. پرایمرهای CytF: CCTGACAGGATTATTCTTAGCTATGC و CytR: TGAATAGTAGTGCGAGGACCCCT برای تکثیر ژن cyt b براساس توالی‌های موجود ژن Cytocrome b گونه ماهی سفید (Accession: 1.651802 NJ , 1.420442 NJ) و با استفاده از نرم‌افزارهای Bioedit و Primer3 طراحی گردید.

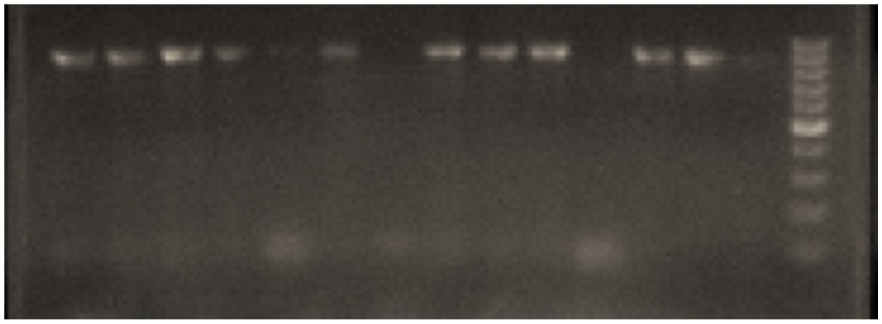
واکنش زنجیره پلی‌مراز توسط دستگاه Biorad در ۳۵ چرخه و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت‌سازی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای۶۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۰/۶ میکرولیتر DNA، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰dNTPs میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمر ۵ پیکوملار، 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

بانک ژن به نشانی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) جهت بررسی میزان همپوشانی با توالی‌های ثبت شده مقایسه شد. از نرم‌افزار Bioedit به‌منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. برای مطالعه و ارزیابی هاپلوتیپ‌های موجود در جمعیت‌های مورد مطالعه از نرم‌افزارdnaSP5 استفاده گردید. همچنین به‌منظور 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 پلیمراز به طول ۹۰۰ جفت باز روی ژل آگاروز ۱ ٪، گونه مورد مطالعه: *R. kutum*.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

```
Cyt b Gene Haplotype of Rutilus firsii kutum

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
Gharesol         TATGGCTGGC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC
Gharesol         TATGGCTGAC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC
Gorganrod        TATGGCTGGC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC
Goharbaran       TATGGCTGGC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC
Tajan            TATGGCTGGC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC
Sefidrod         TATGGCTGGC TTATCCGAAA CCTACACGCT AATGGGGCAT CCTTCTTCTT CATCTGTCTT TATATACATA TCGCACGAGG CCTATACTAC GGATCATACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
Gharesol         TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG
Gharesol         TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG
Gorganrod        TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG
Goharbaran       TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG
Tajan            TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG
Sefidrod         TTTATAAAGA AACCTGAAAC ATTGGTGTAG TCCTATTCCT CCTAGTTATA ATGACAGCCT TCGTCGGCTA CGTATTGCCA TGAGGACAAA TATCCTTCTG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
Gharesol         AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC
Gharesol         AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC
Gorganrod        AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC
Goharbaran       AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC
Tajan            AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC
Sefidrod         AGGTGCCACC GTAATCACGA ACCTCCTCTC AGCAGTCCCT TACATAGGAG ATACCCTCGT TCAATGAATC TGAGGCGGTT TCTCAGTAGA CAACGCAACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
Gharesol         CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC
Gharesol         CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC
Gorganrod        CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC
Goharbaran       CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC
Tajan            CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC
Sefidrod         CTTACACGAT TCTTCGCATT CCACTTCCTC CTACCGTTTG TCGTCGCCGG CGCAACCATC CTACACCTAC TATTTTTACA CGAAACGGGG TCAAACAACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
Gharesol         CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC
Gharesol         CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC
Gorganrod        CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC
Goharbaran       CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC
Tajan            CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC
Sefidrod         CGGCCGGGCT AAACTCCGAC GCAAATAAAA TTTCTTTCCA CCCATATTTC TCATATAAAG ACCTCCTTGG CTTTGTAATT ATGTTACTAG CTCTCACCTC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
Gharesol         TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTCACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCAGA ATGATACTTC
Gharesol         TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTTACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCAGA ATGATACTTC
Gorganrod        TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTTACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCAGA ATGATACTTC
Goharbaran       TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTTACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCAGA ATGATACTTC
Tajan            TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTCACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCGGA ATGATACTTC
Sefidrod         TTTAGCATTA TTTTCTCCTA ACCTATTAGG TGACCCAGAA AACTTTACGC CAGCAAACCC ACTCGTGACA CCCCCACATA TTCAGCCGGA ATGATACTTC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        610       620       630       640       650       660       670       680       690       700
Gharesol         TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC
Gharesol         TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC
Gorganrod        TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC
Goharbaran       TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC
Tajan            TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC
Sefidrod         TTATTTGCCT ACGCCATTCT CCGATCCATC CCAAACAAAC TAGGAGGGGT CCTCGCACTA CTATTCAGCA TTCTAGTGCT AATAGTTGTC CCAATCTTAC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|
                        710       720       730       740       750       760       770       780
Gharesol         ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCCCGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TTAAC
Gharesol         ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCCCGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TTAAC
Gorganrod        ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCCCGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TTAAC
Goharbaran       ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCACGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TtAAC
Tajan            ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCCCGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TtAAc
Sefidrod         ATACCTCAAA ACAACGAGGA CTAACTTTCC GCCCCGTGAC ACAATTTTTA TTCTGAACCC TAGTTGCAGA TATATTTATC TTAAC
```

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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

جدول ۱- SNP های مشاهده شده در هاپلوتیپ‌های موجود در رودخانه‌ها، گونه مورد مطالعه: *R. kutum* (۱-۳: 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 درجایگاه 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* به‌ترتیب 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

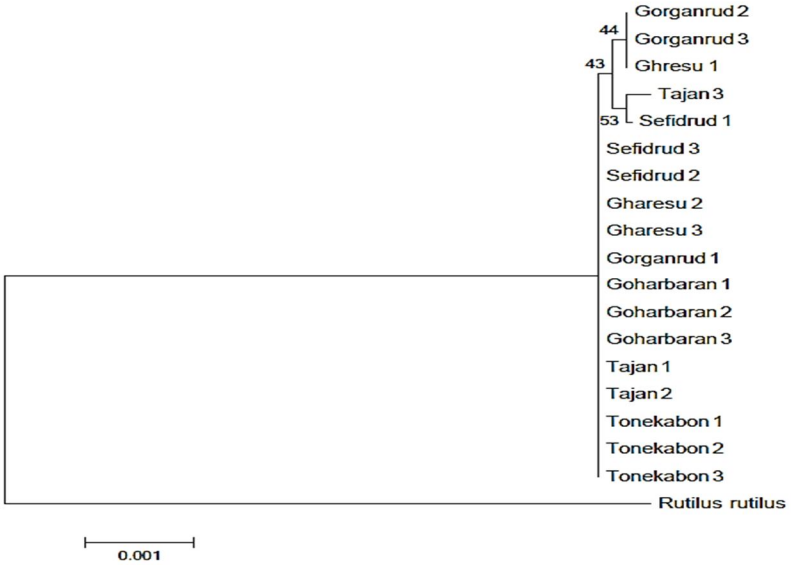
[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

(NJ)joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 صورت پذیرفت. ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) به‌دلیل قرابت بیشتر به‌عنوان 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. هاپلوتایپ‌های 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 مازندارن باشد که از کاهش تنوع زیستی این گونه جلوگیری می‌نماید.



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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

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 جمعیت شناسی *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 (RezvaniGilkolai, 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 هاپلوتیپ‌های 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

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 به‌صورت مستقل از هم صورت پذیرفته‌اند (Shemshad *et al*., 2007).

ماهی سفید در مرحله بعد بیشترین قرابت را با گونه‌های *Alburnus alburnus*، *Abramis brama*، *Vimba vimba*، *Chondrostoma regium* دارد. همچنین این ماهیان بیشترین فاصله ژنتیکی را در میان نمایندگان مورد بررسی از کپور ماهیان، با گونه *Gobio gobio* نشان می‌دهند. بر اساس دندوگرام 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. به‌طوری‌که 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

اساس این مطاالعه 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 غیر انتخابی 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.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

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 bromiscbilotes*. 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. Matrilinear 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.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-09-16]