



## مقایسه ژنتیکی ماهی سه‌خاره *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) در خلیج گرگان (سواحل جنوبی دریای خزر) و تالاب کامارگ (سواحل شمالی دریای مدیترانه)

سیده آیناز شیرنگی

استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۰۸/۲۹

پذیرش: ۹۹/۱۱/۰۳

نویسنده مسئول مکاتبه:

سیده آیناز شیرنگی، استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

ایمیل: [ainazshirangi@gmail.com](mailto:ainazshirangi@gmail.com)

چکیده

ماهی سه‌خاره (*G. aculeatus*) یکی از مهمترین گونه‌های مدل است که به سادگی در شرایط آزمایشگاهی پرورش می‌یابد. باتوجه به غیربومی بودن این گونه در دریای خزر و نامشخص بودن منشأ ورود آن و همچنین مجزا بودن جمعیت ماهیان سه‌خاره جنوب فرانسه در دلتای رودخانه Rhone (تالاب کامارگ) از سایر جمعیت‌های اروپا و به‌ویژه مدیترانه، در این تحقیق به مقایسه ژنتیکی ماهیان سه‌خاره بین خلیج گرگان (سواحل ایران) با تالاب کامارگ (سواحل جنوب فرانسه) با استفاده از توالی‌یابی ژن COI پرداخته شد. بدین منظور، تعداد ۱۰ قطعه ماهی از هر منطقه نمونه‌برداری شد و تا زمان انجام آزمایش در الکل اتانول ۹۶٪ نگهداری شد. پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR با استفاده از یک جفت آغازگر سیتوکروم اکسیداز ۱ (COI)، نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده، ۶۸۰ جفت باز طول دارد. تعداد اندک هاپلوتایپ‌ها و تنوع اندک هاپلوتایپ‌ها در هر دو منطقه مورد مطالعه نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین در آنها بود. میزان  $F_{ST}$  به‌عنوان شاخص تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها ۰/۳۳۳ به‌دست آمد که نشان‌دهنده تمایز بالای دو جمعیت بود. با وجود فاصله ژنتیکی پایین (۰/۰۰۲) بین نمونه‌های دو منطقه براساس روش دو پارامتر کیمورا (K2P)، ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد جمعیت ماهیان سه‌خاره خلیج گرگان و تالاب کامارگ یک زیر کلید مجزایی را تشکیل دادند. حتی گمان می‌رود این دو جمعیت دارای نیای مشترک باشند، اما به‌دلیل درجه حمایت پایین (بوت استرپ)، روابط بین کلیدها حل نشد و منشأ جمعیت ماهیان خلیج گرگان هم به درستی شناسایی نشد.

واژه‌های کلیدی:

*G. aculeatus*، دریای خزر، تالاب کامارگ، سیتوکروم اکسیداز، گونه غیربومی

### ۱ | مقدمه

ماهی سه‌خاره (*G. aculeatus*) یک گونه دریایی است که وارد زیستگاه‌های آب شیرین شده است و در بین جمعیت‌های مختلف ماهیان، دارای بیشترین دامنه پراکنش است. این گونه در اروپا، شمال آمریکا و آسیا ساکن زیستگاه‌های اقیانوسی، ساحلی و آب شیرین می‌باشد (Östlund-Nilsson, 2006). به‌طورکلی، جمعیت‌های ماهیان سه‌خاره آب شیرین از جمعیت‌های یوری هالین مهاجر مشتق شده‌اند که طی ذوب آخرین یخبندان در دریاچه‌های آب شیرین به دام انداخته شده‌اند و برخلاف اجداد دریایی خود (که نسبتاً یک شکل هستند) تنوع گسترده‌ای از مورفولوژی و رفتار ماهیان در آنها مشاهده می‌شود که طی مدت زمان بسیار کوتاه به‌وجود آمده است (Bell, 1988; Sal'nikov, 1995).

آخرین عصر یخبندان بر ترکیب ژنتیکی و الگوی پراکنش ماهی سه‌خاره در اروپا نیز تأثیر گذاشت و سرانجام ماهی سه‌خاره طی دوره

پلیستوسن (حدود ۲/۶ میلیون سال پیش و ۱۰ هزار سال قبل از میلاد) در اروپا به‌وجود آمد (Bell and Foster, 1994; Mcphail, 1993). طی این مدت آب‌های قاره‌ای سراسر اروپا از جمعیت‌های دریایی مکرر و به‌طور مستقل کلونیزه شدند که باعث جداسازی جمعیت‌های متفاوت گردید. این کلونیزه شدن آب‌های قاره‌ای در جنوب اروپا و در آب‌های دریایی مدیترانه نیز اتفاق افتاده است. همچنین باعث به‌وجود آمدن پراکنش فیزیوجغرافیایی مجزایی از این گونه می‌شود که مرز بین دریای مدیترانه و دریای سیاه است. دریای مدیترانه پناهگاهی برای ماهیان سه‌خاره در دوره پالئوآرکتیک بوده است (Fishbase, 2010). مطالعات فیلوژنی و مدل‌های اقلیمی، جنوب دریای خزر را به‌عنوان پناهگاهی طی آخرین عصر یخبندان شناسایی کرده است (Parvizi et al., 2018; Leroy and Arpe, 2007). ازطرف دیگر، این گونه یکی از گونه‌های غیربومی حوضه جنوبی دریای خزر نیز می‌باشد. منشأ ورود آن

E-proof

سه‌خاره و سازگاری به آب شیرین به جمعیت‌های شمالی معطوف شده است درحالی‌که هیچ مطالعه جالب توجهی در جمعیت‌های جنوب اروپا به‌ویژه دریای مدیترانه که محدوده جنوبی دامنه پراکنش ماهی سه‌خاره را در پالئوآرکتیک غربی تشکیل می‌دهد انجام شده است، همچنین در جنوب دریای مدیترانه جمعیت‌های ماهی سه‌خاره با شیب تندی کاهش یافته است.

پراکنش جغرافیایی گسترده، میزان بالای تنوع مورفولوژیک، فیزیو-لژی و رفتاری و دسترسی منابع ژنومی وسیع ماهی سه‌خاره را به یک گونه کاندید ایده‌آل برای آنالیزهای بیوجغرافیایی، زیست‌شناسی تکامل، فیزیولوژی، ژنتیک جمعیت و مطالعات ژنومیک مقایسه‌ای تبدیل کرده است (Orti 1994; Mckinnon and Rundle, 2002; Gibson, 2005; Fang et al., 2018). علی‌رغم اهمیت‌های فوق در مورد این گونه، تاریخچه کلونیزه شدن آنها در آب‌های مختلف باید به‌طور کامل حل شود. باتوجه به اینکه پیشنهاد شده است ماهی سه‌خاره از آب‌های اروپا وارد آب‌های ایران شده است (Fishbase, 2010). از طرفی، شناسایی منشأ یک گونه مهاجم یا معرفی شده از اولویت‌های بسیار مهم در زمینه زیست‌شناسی حفاظت است و به‌منظور مدیریت مؤثر گونه‌های معرفی شده باید مکانیسم کلونیزه شدن آنها را بشناسیم. همچنین لازم است از پایه ژنتیکی سازگاری بسیار سریع این گونه در آب‌های شیرین به‌ویژه در جنوب اروپا گره‌گشایی شود. بنابراین، تحقیق حاضر به‌منظور مقایسه ژنتیکی جمعیت با ماهیان سه‌خاره جنوب دریای خزر با جمعیت اروپا انجام شد.

## ۲ | مواد و روش‌ها

در بهمن‌ماه و اسفندماه ۱۳۹۷ تعداد ۱۰ قطعه ماهی سه‌خاره از خلیج گرگان در جنوب شرق دریای خزر (سواحل شمال ایران) و ۱۰ نمونه از تالاب کامارگ در شمال دریای مدیترانه (سواحل جنوب فرانسه) با استفاده از تور دستی صید (شکل ۱) و در اتانول مطلق تثبیت شدند. سپس، جهت انجام کارهای آزمایشگاهی به آزمایشگاه اکولوژی ماهیان دانشگاه گنبدکاوس انتقال یافتند. خلیج گرگان دارای میانگین عمق ۱/۵ متر و حداکثر عمق ۳/۶ متر می‌باشد. شوری آب حدود ۵/۱۳ ppt-۱۲ می‌باشد. درجه حرارت در ماه بهمن ۱۰-۸، فروردین ۱۴-۱۲ و آبان ۱۶-۱۵ درجه سانتی‌گراد است (Sharbati and Shabani, 2015) (شکل ۱). تالاب کامارگ در دلتای رودخانه رن در سواحل دریای مدیترانه در فرانسه واقع شده است. در زمستان عمق آب این تالاب به ۲۰ سانتی‌متر تا ۱ متر می‌رسد حداکثر عمق آن حدود ۲ متر اما میانگین آن کمتر از ۱ متر است (Verhoeven, 1980). شوری آب به-طور کلی کمتر از ۵ ppt است اما ممکن است در هنگام خشکی به‌طور قابل توجهی بالاتر رود. سطح آب تالاب کامارگ در طول سال نسبتاً ثابت است. میانگین دمای هوا در ماه‌های دی و بهمن که سردترین ماه سال است ۶ درجه سانتی‌گراد، در مرداد، گرم‌ترین ماه سال حدود ۲۳ درجه سانتی‌گراد است و یخبندان در این منطقه به‌ندرت رخ می‌دهد (Aguesse, 1958) (شکل ۱).

استخراج DNA به روش فنل کلروفرم با تغییرات و بهینه‌سازی انجام

شناخته شده نیست، اما وجود ردیف کامل صفحات جانبی احتمال منشا دریایی را تقویت می‌کند (Bell, 2001).

اولین حضور این گونه در خزر جنوبی مربوط به سال ۱۹۹۱ است که در منطقه بهشهر مشاهده گردید. گزارشات نشان داد که این گونه از سواحل جنوب شرق تا جنوب غرب دریای خزر (سواحل بهشهر، رودخانه تجن، قسمت پایین دست گرگان‌رود و خلیج گرگان، قره سو، بندر ترکمن، تالاب گمیشان، پایین دست بابل‌رود، هراز، چالوس، تنکابن، لنگرود، تالار، شیرو، شفارود، تالاب انزلی و ساحل آستارا) یافت می‌شود. تعداد زیادی از این ماهیان دریای خزر را ترک کرده، به رودخانه اترک در ترکمنستان می‌روند (Abdoli, 1993a,b).

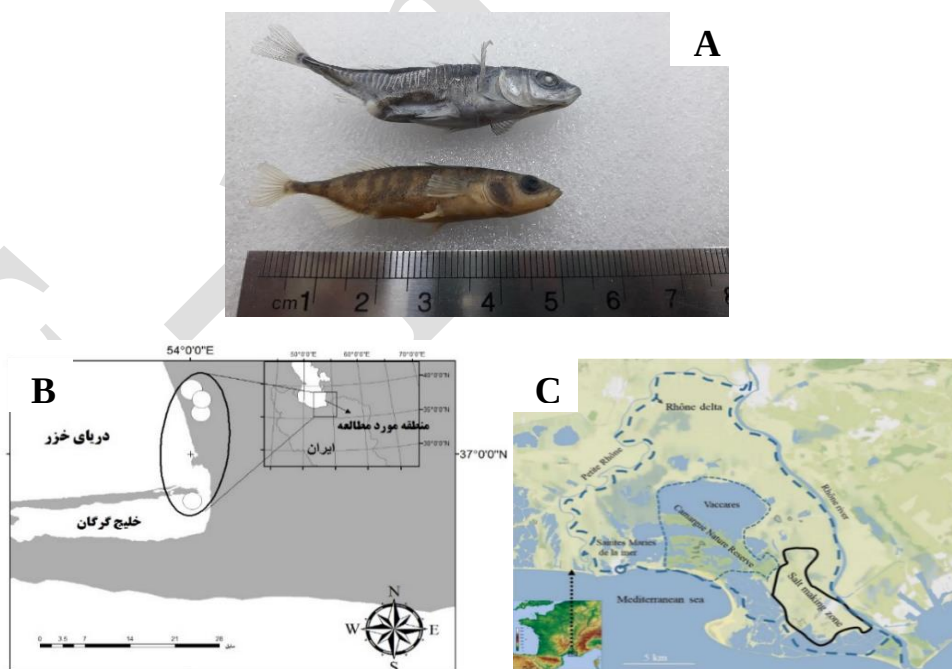
ماهیان سه‌خاره، سازگاری قابل توجه مورفولوژیک، فیزیولوژیک و رفتاری زیادی در مدت‌زمان کوتاه دارند و تنوع بالایی در رنگ، فرم بدن، تعداد خارها و تعداد صفحات جانبی در این ماهیان دیده می‌شود (Barrett et al., 2011). این تنوع به نحوه زندگی، تغذیه، زیستگاه و تولیدمثل بستگی دارد. برخی از این تغییرات به‌دلیل عوامل محیطی می‌باشند درحالی‌که برخی دیگر براساس عوامل ژنتیکی می‌باشند (Coad, 2015). در بسیاری از مطالعات فیلوجغرافیایی، mtDNA به-دلیل سرعت جهش بالا و عدم وجود نوترکیبی در آن به‌عنوان نشانگر منتخب به‌کار می‌رود (Mäkinen and Merilä, 2008). اکثر محققین اعتقاد دارند از میان ژن‌های مختلف میتوکندریایی، ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ (COI) یک ژن محافظت شده است و برای مطالعات تاکسونومیک و فیلوژنتیکی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gharibkhani et al., 2010). توالی COI، علاوه بر تفکیک گونه‌های نزدیک، می‌تواند گروه‌های زیر سطح گونه را نیز جدا کند (Hebert et al., 2003).

تاکنون مطالعات متعددی بر روی ماهیان سه‌خاره در جنوب دریای خزر انجام شده است اما بیشتر آنها به بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک و دوشکلی جنسی آنها معطوف شده است (Ghasemzadeh, 2006; Alali, 2006; Patimar et al., 2010). تنها مطالعه مولکولی بر روی این گونه در حوزه جنوبی دریای خزر توسط ایزدی (Izadi, 2020) انجام شده است که علاوه بر مطالعه رشد و صفات مورفولوژیک ماهی سه‌خاره به بررسی آن به روش توالی‌یابی ژن سیتوکروم b نیز پرداخته است. برخلاف مطالعات بسیار اندک مولکولی بر جمعیت ماهیان سه‌خاره در سواحل ایران، مطالعات مولکولی بسیار جامعی بر این گونه ماهیان در کل آب‌های دنیا انجام شده است (Watanabe et al., 2003; Mäkinen et al., 2006; Mäkinen and Merilä, 2008; Araguas et al., 2012; Drevecky et al., 2013; Lescak et al., 2015; Rezansoff et al., 2015; Fang et al., 2018). از طرف دیگر، مطالعات پیشین بر روی جمعیت ماهیان سه‌خاره در جنوب فرانسه، بالادست رودخانه Rhone (سواحل شمالی دریای مدیترانه) نشان داده است که آنها در فاصله ژنتیکی زیادی از سایر جمعیت‌های مدیترانه قرار دارند و با سایر جمعیت‌های اروپا بسیار متمایز هستند (Mäkinen et al., 2006; Mäkinen and Merilä, 2008; Fang et al., 2018). بیشتر مطالعات انجام شده بر روی تکامل سریع ماهی

رنگ آمیزی گردید، سپس برای مشاهده باندهای حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر، در معرض تابش UV قرار داده شد. به منظور توالی یابی قطعه مورد نظر، تعداد حداقل ۶ نمونه از هر جمعیت و مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR به شرکت ژنتیک کدون ارسال گردید. پیکهای مربوط به توالی یابی به کمک نرم افزار Chromas ویرایش شد. به منظور یافتن توالی های مشابه برای استفاده در ترسیم درخت تبارشناسی، توالی ویرایش شده به کمک ابزار اینترنتی BLAST در بانک ژن NCBI با سایر توالی های موجود مقایسه شد و تعداد ۳۳ توالی از گونه *G. aculeatus* از بانک ژن انتخاب گردید (جدول ۱). درخت تبارشناسی حاصل از روش حداکثر تشابه برای ژن COI، شامل جمعیت های خزر و کامارگ و هاپلوتایپ های استخراج شده از بانک ژنی با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ (Bootstarp) به روش پیوند همجواری (Neighbor joining) و روش جفت گروه غیر وزنی از روش میانگین حسابی (UPGMA) ترسیم شد (شکل ۲). همچنین، از توالی ژن COI گونه *Pungitius pungitius* با شماره دسترسی MG423235 به عنوان برون گروه استفاده شد (جدول ۱). ویژگی های آماری و اطلاعات مربوط به توالی ها با استفاده از نرم افزار DnaSP-5 (Librado and Rozas, 2009) استخراج گردید. همچنین فواصل درون گونه و بین گونه برحسب جفت باز و فاصله دوعامله کیمورا (K2P) با استفاده از نرم افزار Mega-6.06 محاسبه گردید.

شد (Taggart, 1992). بررسی کیفیت DNA استخراج شده با روش الکتروفورز افقی (شرکت پایا پژوهش طوس) روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. غلظت DNA با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه پیکودراپ (Pico200، انگلستان) اندازه گیری شد.

به منظور تکثیر ژن COI، از یک جفت آغازگر رفت و برگشت (TelF1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC - TelR1: 3'-5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') استفاده شد (Hubert et al., 2008). واکنش چند زنجیره ای پلیمرز (PCR) در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری با حجم ۳۰ μl با شرایط آزمایشگاهی شامل ۱/۲ μl از هر آغازگر با غلظت ۱۰ pM، ۱۵ μl محلول Taq 2X Mastermix red، مقدار ۱/۵ μl از DNA الگو و ۱۱/۱ آب مقطر دیونیزه شده در دستگاه ترموسایکلر (BIORAD) انجام شد. شرایط دمایی واکنش PCR شامل یک چرخه ۳ دقیقه ای واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ °C، ۳۵ چرخه (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C برای واسرشته سازی، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ °C برای هم سرشته سازی و اتصال آغازگر و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ °C برای بسط) و در نهایت یک چرخه ۵ دقیقه ای در دمای ۷۲ °C به منظور بسط نهایی انجام شد. به منظور اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر، ۳ μl از محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و توسط اتیدیوم بروماید



شکل ۱- (A، بالا): ماهی سه خاره (*G. aculeatus*) صید شده از خلیج گرگان، (A، پایین): ماهی صید شده از تالاب کامارگ، (B): موقعیت مکانی خلیج گرگان، (C): موقعیت مکانی تالاب کامارگ

جدول ۱- شماره دسترسی بانک ژن و موقعیت مکانی توالی‌های دانلود شده از بانک ژن

| شماره | موقعیت مکانی             | شماره دسترسی                     | شماره | موقعیت مکانی                  | شماره دسترسی                                 |
|-------|--------------------------|----------------------------------|-------|-------------------------------|----------------------------------------------|
| ۱     | NorthSea, German Bight   | KJ204893                         | ۹     | USA, Alaska                   | KP823154                                     |
| ۲     | NorthSea, Netherlands    | KJ204898<br>KR862755<br>KR862756 | ۱۰    | Canada, Alberta               | KP823155<br>KP823160<br>KP823161<br>KP823170 |
| ۳     | Denmark, Baltic Sea      | KR862757                         | ۱۱    | Canada, Little Campbell River | KP823200<br>KP823201                         |
| ۴     | Poland, Baltic Sea       | KR862758<br>KR862759<br>KR862762 | ۱۲    | Canada, PaqLake               | KP823202<br>KP823212<br>KP823213<br>KP823214 |
| ۵     | Lithuania, Minija        | KR862748<br>KR862749             | ۱۳    | Canada, Qubec                 | EU524631                                     |
| ۶     | Japan                    | GU440325                         | ۱۴    | Canada, NewBrunswick          | KC015397 KC015395                            |
| ۷     | France, Lower Normandy   | KR862750.<br>KR862766            | ۱۵    | Sweden                        | KJ128495<br>KJ128494                         |
| ۸     | Germany, Bavaria, Swabia | HM902127<br>HM902131             | ۱۶    | Norway                        | KP823142<br>KP823143                         |

## ۳ | نتایج

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن COI طول قطعات به‌دست آمده برای ۱۰ نمونه توالی‌یابی شده از دریای خزر و مدیترانه پس از تصحیح و هم‌ردیف‌سازی، ۶۸۰ جفت باز بود. تعداد هاپلوتایپ‌ها در خلیج گرگان، ۱ عدد و در تالاب کامارگ ۲ عدد به‌دست آمد. تنوع هاپلوتایپی در تالاب کامارگ ۰/۶۶۶۶۷ و برای خلیج گرگان صفر و تنوع هاپلوتایپی کل ۰/۴۲۸۵۷ به‌دست آمد. تنوع نوکلئوتیدی برای جمعیت خلیج گرگان صفر، جمعیت کامارگ ۰/۰۰۳۶۹ و تنوع نوکلئوتیدی کل ۰/۰۰۲۳۶ محاسبه شد (جدول ۲). میانگین ترکیب بازی به‌ترتیب، برای (A): ۲۳/۸۵، (T): ۳۰/۳، (C): ۲۸/۵۵ و (G): ۱۷/۲۵ محاسبه شد. محتوای C+G نیز ۴۵/۸ به‌دست آمد (جدول ۳). تمایز ژنتیکی ( $F_{st}$ ) و جریان

ژنی ( $N_m$ ) (Hudson *et al.*, 1992) بین نمونه‌های خلیج گرگان و تالاب کامارگ و به‌ترتیب، ۰/۳۳۳ و ۰/۵ محاسبه شد. برآورد حداکثر احتمال ماتریس جایگزینی بازهای ژن COI در جدول ۴ نشان داده شده است. بیش‌ترین احتمال جایگزینی روی دترمینان ماتریس برای جایگزینی باز A/G و کم‌ترین احتمال جایگزینی برای C/G T/G بود. فاصله ژنتیکی بر حسب تعداد نوکلئوتید و فاصله دو پارامتر کیمورا بین جمعیت خلیج گرگان با تالاب کامارگ دارای کمترین فاصله (۰/۰۰۲) و با کانادا دارای بیش‌ترین فاصله (۰/۰۰۶) محاسبه شد و اما فاصله ژنتیکی دریای خزر با شمال آمریکا و ژاپن (۰/۰۰۲)، با آلمان (۰/۰۰۷) محاسبه شد (جدول ۵).

جدول ۲- اطلاعات ژنتیکی نمونه‌های ماهی سه خار (*G. aculeatus*)، در بین نمونه‌های خلیج گرگان و تالاب کامارگ

| اطلاعات ژنتیکی             | خلیج گرگان | تالاب کامارگ | کل      |
|----------------------------|------------|--------------|---------|
| شمار جایگاه‌های نوکلئوتیدی | ۶۶۴        | ۶۳۴          | ۶۴۹     |
| تعداد جایگاه‌های متغیر     | ۰          | ۳            | ۳       |
| ضریب k                     | ۰          | ۲            | ۱/۲۸۵۷۱ |
| تعداد هاپلوتایپ            | ۱          | ۲            | ۲       |
| تنوع هاپلوتایپی            | ۰          | ۰/۶۶۶۶۷      | ۰/۴۲۸۵۷ |
| تنوع نوکلئوتیدی            | ۰          | ۰/۰۰۳۶۹      | ۰/۰۰۲۳۶ |

جدول ۳- درصد نوکلئوتیدهای مختلف برای ژن COI در بین نمونه‌های ماهی سه خار (*G. aculeatus*) خلیج گرگان و تالاب کامارگ

| باز آلی | خلیج گرگان | تالاب کامارگ | کل    |
|---------|------------|--------------|-------|
| A       | ۲۴/۱       | ۲۳/۶         | ۲۳/۸۵ |
| T       | ۳۰/۳       | ۳۰/۳         | ۳۰/۳  |
| C       | ۲۸/۳       | ۲۸/۸         | ۲۸/۵۵ |
| G       | ۱۷/۲       | ۱۷/۳         | ۱۷/۲۵ |
| C+G     | ۴۵/۵       | ۴۶/۱         | ۴۵/۸  |

جدول ۴- محاسبه نرخ جایگزینی Transition / Transversion در توالی ژن COI در بین نمونه‌های ماهی سه خار (G. aculeatus) خلیج گرگان و تالاب کامارگ

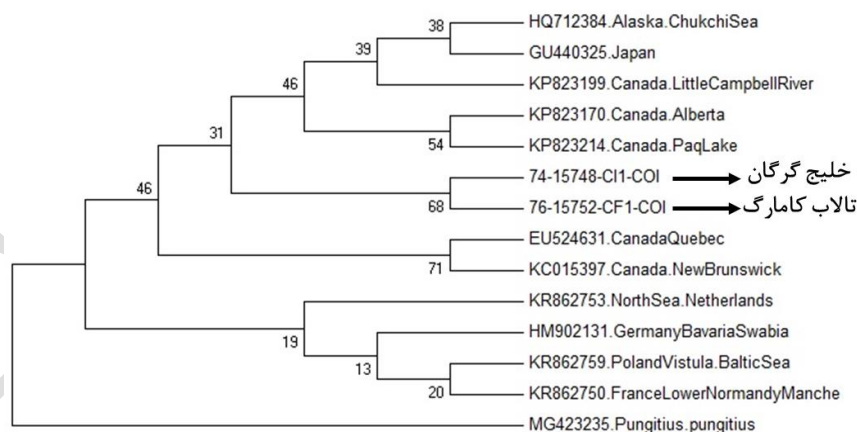
| نرخ جایگزینی | A      | T      | C      | G      |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| A            | -      | ۳/۸۹۱  | ۳/۷۹۴  | ۱۶/۲۲۳ |
| T            | ۲/۸۰۴  | -      | ۱۸/۲۱۱ | ۲/۰۹۵  |
| C            | ۲/۸۰۴  | ۱۸/۶۸۱ | -      | ۲/۰۹۵  |
| G            | ۲۱/۷۱۴ | ۳/۸۹۱  | ۳/۷۹۴  | -      |

جدول ۵- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین جمعیت‌های مورد مطالعه ماهی سه خار (G. aculeatus) بر اساس درصد تمایز توالی ژن COI

| موقعیت مکانی           | خلیج گرگان | تالاب کامارگ | کانادا | دریای شمال | امریکای شمالی (آلاسکا) | دریای بالتیک | اروپا (آلمان) | ژاپن  |
|------------------------|------------|--------------|--------|------------|------------------------|--------------|---------------|-------|
| خلیج گرگان             | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰۳      | ۰/۰۰۲                  | ۰/۰۰۳        | ۰/۰۰۴         | ۰/۰۰۲ |
| تالاب کامارگ           | ۰/۰۰۳      | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۱                  | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۳         | ۰/۰۰۲ |
| کانادا                 | ۰/۰۰۵      | ۰/۰۰۶        | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۲                  | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۳         | ۰/۰۰۱ |
| دریای شمال             | ۰/۰۰۵      | ۰/۰۰۴        | ۰/۰۰۵  | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۲                  | ۰/۰۰۰        | ۰/۰۰۲         | ۰/۰۰۲ |
| امریکای شمالی (آلاسکا) | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۳        | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰۳      | ۰/۰۰۰                  | ۰/۰۰۰        | ۰/۰۰۳         | ۰/۰۰۰ |
| دریای بالتیک           | ۰/۰۰۵      | ۰/۰۰۳        | ۰/۰۰۵  | ۰/۰۰۱      | ۰/۰۰۲                  | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۲         | ۰/۰۰۲ |
| اروپا (آلمان)          | ۰/۰۰۷      | ۰/۰۰۵        | ۰/۰۰۷  | ۰/۰۰۳      | ۰/۰۰۴                  | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۳         | ۰/۰۰۳ |
| ژاپن                   | ۰/۰۰۲      | ۰/۰۰۳        | ۰/۰۰۲  | ۰/۰۰۳      | ۰/۰۰۰                  | ۰/۰۰۲        | ۰/۰۰۴         | ۰/۰۰۴ |

به‌دست آمده نتیجه می‌شود این ژن نتوانسته است به‌خوبی روابط بین جمعیت‌ها را حل کند و آنها را به‌خوبی از هم تفکیک کند. جمعیت‌های ماهیان خلیج گرگان و تالاب کامارگ در یک زیر کلید جداگانه قرار گرفتند و با جمعیت‌های کبک و نیوبرانسویک کانادا در فاصله بیشتری قرار داشتند (شکل ۲).

طی ترسیم درخت تبارشناسی، به‌دلیل تشابه توالی‌های هر جمعیت، تنها یک تا دو عدد از آنها برای آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت. براساس این نتایج، توالی‌یابی ژن COI، ماهیان سه‌خار را به دو کلید تقسیم کرد: یک کلید مربوط به نمونه‌های شمال اروپا (شامل دریای شمال، دریای بالتیک و شمال فرانسه) و دیگری کلید شامل سایر نمونه‌های باقی مانده. البته به‌دلیل درجه حمایت پایین کلیدهای



شکل ۲- درخت تبارشناسی به روش پیوند همجواری (NJ) ماهی سه خار (G. aculeatus) با برون گونه Pungitius pungitius

## ۴ | بحث و نتیجه‌گیری

برطبق نتایج به‌دست آمده، تعداد و تنوع هاپلوتایپ‌ها در دو منطقه مورد مطالعه به‌ویژه در خلیج گرگان بسیار اندک بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین جمعیت‌های ماهیان سه‌خار در خلیج گرگان و تالاب کامارگ می‌باشد. به‌طور مشابه، هر دو روش میکروساتلایت و توالی‌یابی ژن‌های mtDNA میزان تنوع ژنتیکی پایینی را در جمعیت ماهیان سه‌خار آلبرتای کانادا که همانند جمعیت سه‌خار در خزر جنوبی از ماهیان غیربومی با منشأ ناشناخته می‌باشند نیز نشان داد که می‌تواند به‌دلیل اثر Founder باشد که به معرفی جدید این گونه در

آلبرتا مربوط باشد یا به پدیده گردن بطری (bottleneck) دوره‌ای مرتبط با مرگ زمستانه برمی گردد (Rezansoff et al., 2015). از طرف دیگر، در تحقیقی افزایش تنوع ژنتیکی قابل توجهی در دودمان اروپایی نسبت به دودمان اجدادی آنها مشاهده شد و به‌نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی مشاهده شده در اروپا طی چندین زمان به‌وجود آمده باشد که احتمالاً به‌دلیل افزایش اندازه جمعیت در اثر گسترش جغرافیایی جمعیت آنها در اواخر پلیوستوسن یا اوایل هولوسن می‌باشد (Fang et al., 2018).

درصد نوکلئوتیدهای مختلف برای هر دو جمعیت خلیج‌گران و تالاب کامارگ مشابه بود. میانگین درصد C+G برای جمعیت ماهیان سه‌خاره دو منطقه مورد مطالعه ۴۵/۸ به‌دست آمد. اثبات شده است هرچه نسبت CG در یک گونه بیشتر باشد آن گونه اجدادی‌تر است و قدمت بیشتری دارد که نتایج مطالعه حاضر نیز با آن مطابقت دارد (Rodriguez et al., 2000). باتوجه به اینکه شاخص  $F_{ST}$  بیانگر میزان تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها در سطوح مختلف است و در صورتی که میزان آن بالاتر از ۰/۱۵ باشد نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها است (Wright, 1978) در نتیجه،  $F_{ST}$  برابر با ۰/۳۳۳ بین دو جمعیت ماهیان سه‌خاره خلیج‌گران و تالاب کامارگ بیانگر تمایز بالای ژنتیکی بین آنها است که می‌تواند به‌دلیل فاصله جغرافیایی زیاد و عدم مهاجرت بین دو منطقه مورد مطالعه باشد.

در مطالعه حاضر، نتایج فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف و همچنین درخت تبارشناسی نشان داد که جمعیت‌های ایران (خلیج گران) و جنوب فرانسه (تالاب کامارگ) تا حد زیادی نزدیک هم هستند و کم‌ترین فاصله بین آنها دیده شده است. درحالی‌که این جمعیت‌ها با جمعیت شمال اروپا تفاوت بسیار بارزی دارند. موافق با نتایج تحقیق حاضر، بر مبنای نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن cyt b، نمونه‌های خزر و کامارگ با نمونه‌های غرب آسیا (دریای آروف) و شمال آمریکا (کانادا و آلاسکا)، بیشتر شبیه به هم هستند (Izadi, 2020). علاوه بر روش مولکولی، صفات مورفولوژیکی و منحنی‌های رشد نیز بیانگر وجود مشابهت در جمعیت ماهی سه‌خاره در دریای جنوب شرق خزر و شمال مدیترانه می‌باشد. همچنین منحنی طول و سن نیز تفاوت معنی‌داری برای دو جمعیت نداشتند که بیانگر آهنگ رشد یکسان برای هر دو جمعیت خلیج‌گران و تالاب کامارگ بود (Izadi, 2020).

تاریخچه جمعیت‌های ماهیان سه‌خاره در اروپا به درستی شناسایی نشده بود، تا اینکه مطالعه ای در سال ۲۰۰۶ با روش میکروساتلایت تفاوت ژنتیکی مهمی را بین جمعیت‌های مختلف اروپا نشان داد (Mäkinen et al., 2006). طی آنالیز mtDNA ۱۷۲ ماهی سه‌خاره نمونه‌برداری شده از پراکنش اروپایی این ماهی، سه دودمان (Lineage) اصلی Tans-Atlantic، اروپایی و دریای سیاه شناسایی شد که نواحی جغرافیایی نسبتاً وسیعی را به‌خود اختصاص دادند و احتمالاً آنها طی دوره پلیوستوسن از هم متفاوت شده‌اند (۱۷۰-۱۳۰ هزار سال پیش). البته علاوه بر آنها، چند جمعیت آب شیرین در بعضی مناطق مدیترانه مشاهده شد که دارای هاپلو تایپ‌های مجزایی بودند (Mäkinen and Merilä, 2008). در این مطالعه تأیید شد که منطقه مدیترانه به‌عنوان پناهگاه یخبندان برای ماهیان سه‌خاره آب شیرین می‌باشد. احتمالاً منشأ کلونیزه شدن جمعیت‌های آب شیرین در اسکاندیناوی، غرب، مرکز و شرق اروپا که جزو دودمان اروپایی محسوب می‌شوند به دوران پس از یخبندان (postglacial) برمی گردد، درحالی‌که منشأ کلونیزه شدن جمعیت‌های آب شیرین مدیترانه به دوره پلیوستوسن برمی گردد. وجود این جمعیت‌های آب شیرین مجزا در مناطق مدیترانه نشان‌دهنده این است که دودمان آب شیرین قبل از آخرین یخبندان متمایز

شده‌اند و احتمالاً جمعیت‌های آب شیرین منشأ مستقلی دارند (Mäkinen and Merilä, 2008). حتی آنالیزهای بیوجغرافیایی نشان می‌دهند که کلونیزه شدن شمال اروپا و غرب اطلس به‌دنبال انتهای آخرین یخبندان احتمالاً از پناهگاه‌های جنوب اروپا هستند. در تحقیقی دیگر، به مطالعه روابط فیلولوژی ماهیان سه‌خاره در تمام آب‌های دنیا و همچنین پراکنش جغرافیایی آنها با استفاده از نشانگرهای SNP پرداخته شد. نتایج نشان داد که منشأ جمعیت‌های امروزی شامل تمام جمعیت‌های اطلس غربی، اطلس شرقی، شمال و جنوب اروپا از اقیانوس آرام شرقی می‌باشد که مربوط به اواخر دوره پلیوستوسن است و طی ۶۰ هزار سال اخیر به وجود آمده‌اند (Mäkinen and Merilä, 2008). علاوه بر کلید آرام، یک کلید مونوفیلیک وجود داشت خود به دو زیرکلید اصلی تقسیم می‌شود که یکی جنوب اروپا است که قدمت بیشتری دارد و شامل جمعیت‌های Pensinsula، مدیترانه و دریای سیاه است و دیگری Trans-Atlantic است که شامل جمعیت‌های جوان‌تر می‌باشد و از دریای سفید، بالتیک، دریای شمال، دریای Barents و اطلس غربی تشکیل شده است. در مطالعه‌ای دیگر که با استفاده از توالی‌یابی mtDNA انجام شده است تأیید شد که جمعیت اطلس جدیدتر بوده و از جمعیت‌های اقیانوس آرام به‌وجود آمده است (۲۶۰-۹۰ هزار سال پیش) (Orti et al., 1994). نتایج تحقیق حاضر و همچنین ایزدی (Izadi, 2020) نیز با نتایج فوق مطابقت دارد و نمونه‌های تالاب کامارگ همراه با نمونه‌های خلیج‌گران که در یک کلید قرار دارند و قدمت تقریباً زیادی هم دارند در فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به نمونه ماهیان سه‌خاره دریای شمال، سفید و اطلس (کلید Trans-Atlantic) قرار دارند. در مطالعه فانگ و همکاران (Fang et al., 2018)، جمعیت‌های جنوب اروپا خود به سه کلید فرانسوی، ایبری و مدیترانه تقسیم می‌شوند که تنها یک جمعیت در رودخانه Rhone خود به تنهایی کلید فرانسوی تشکیل می‌دهد که از سایر جمعیت‌های اروپا در حدود ۲۳/۴ تا ۴۲/۶ هزار سال پیش شروع به متمایز شدن کرده است. به‌طوری‌که تحقیقات پیشین نیز اثبات کرده‌اند، بالادست رودخانه Rhone در فاصله ژنتیکی زیادی از سایر گروه‌ها قرار می‌گیرد و پناهگاه یخبندان آب شیرین برای ماهیان سه‌خاره است (Mäkinen et al., 2006; Mäkinen and Merilä, 2008). از طرف دیگر، مطالعات فیلولوژیایی در شمال کوه‌های البرز پیچیدگی‌های بیوجغرافیایی و اکولوژیکی زیستگاه‌ها را مورد بحث قرار می‌دهد و ایجاد دودمان‌های متفاوت در جنوب دریای خزر را گزارش می‌دهد. همچنین، تأیید شده است جنوب دریای خزر به‌عنوان پناهگاهی طی آخرین دوره یخبندان بوده است (Ahmadzadeh et al., 2013; Katouzian, 2016; Parvizi et al., 2018).

در نتیجه، جمعیت ماهیان سه‌خاره خلیج‌گران و تالاب کامارگ یک زیر کلید مجزایی را هرچند با درجه حمایت پایین تشکیل دادند و ارتباط نزدیکی با جمعیت‌های آب‌های کانادا داشتند و از جمعیت‌های شمال اروپا متمایز بودند و حتی گمان می‌رود که این دو جمعیت در این دو منطقه دارای نیای مشترک باشند. تنوع ژنتیکی پایین در هر دو جمعیت می‌تواند به‌دلیل جریان ژنی محدود آنها و یا کوچک شدن اندازه

- Alali A. 2007. Morphometric and meristic investigation of Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Southwest of Caspian Sea basin. M.Sc. Thesis. Shahid Beheshti University, Tehran. (In Persian)
- Abdoli A. 1993a. Threespine stickleback in the Caspian Sea. *Abzeeyan*, 3(10&11):45-45. (In Persian).
- Abdoli A. 1993b. Three-spined stickleback in southern basins of the Caspian Sea. *Abzeeyan*, 4(5): 10-13. (In Persian).
- Ahmazadeh F., Flecks M., Carretero M. A., Mozaffari O., Bohme W., Harris D.J., Rodder D. 2013. Cryptic speciation patterns in Iranian rock lizards uncovered by integrative taxonomy. *PLoS ONE*, 8, e80563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080563>.
- Araguas R.M., Vidal O., Pla C., Sanz N. 2012. High genetic diversity of the endangered Iberian three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at the Mediterranean edge of its range. *Freshwater Biology*, 57: 143-154.
- Aguesse P., Pruja J.P. 1958. Odonates récoltés par M. Ch. Rungs au Maroc, au Sahara, en Mauritanie et au Sénégal. *Comptes Rendus de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc*, 24: 103-106. (In French).
- Avise J.C. 2009. Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Bell M.A. 1988. Stickleback fishes: bridging the gap between population biology and paleobiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 3(12): 320-324.
- Bell M.A. 2001. Lateral plate evolution in the threespine stickleback: getting nowhere fast. In: Hendry AP, Kinnison MT (Eds.). *Microevolution Rate, Pattern, Process*. Springer, Dordrecht, pp. 445-461.
- Bell M.A., Foster S.A. 1994. The evolutionary biology of the threespine stickleback. *Journal of Animal Ecology*, 64(3): 1-27.
- Barrett R.D.H., Paccard A., Healy T.M., Bergek S., Schulte P.M., Schluter D., Rogers S.M., 2011. Rapid evolution of cold tolerance in stickleback. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, pp: 233-238.
- Clavero M., Pou Rovira Q., Zamora L. 2009. Biology and habitat use of three- spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in intermittent Mediterranean streams. *Ecology of Freshwater Fish*, 18(4): 550-559.
- Coad B.W. 2015. Review of the Spiny Eels of Iran (Family Mastacembelidae). *Iranian Journal of Ichthyology*, 2(1): 1-12.
- Drevecký C.J., Falco R., Aguirre W.E. 2013. Genetic divergence of a sympatric lake-resident-anadromous three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* species pair. *Journal of Fish Biology*, 83: 111-132.
- Fang B., Merilä J., Ribeiro F., Alexandrec C.M., Momigliano P. 2018. Worldwide phylogeny of three-spined sticklebacks. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127: 613-625.
- Fishbase. 2010. [www.Fishbase.org:Gasterosteidae](http://www.Fishbase.org:Gasterosteidae).
- Clavero et al. مؤثر جمعیت آنها به دلیل از بین رفتن زیستگاهها باشد (Clavero et al., 2009; Araguas et al., 2012) چه بسا اینکه این گونه در آبهای ایران گونه‌ای مهاجم است که خود دلیل محکمی بر وجود تنوع ژنتیکی پایین در یک محیط آبی می‌باشد. حتی پیش بینی می‌شود گونه‌هایی که به طور موفقیت آمیزی به محیط جدید کلونیزه می‌شوند از منبع اصلی خود از نظر ژنتیکی متمایز می‌شوند. به عنوان مثال گویی‌های (*Poecilia reticulata*) غیروومی در استرالیا علی‌رغم تنوع ژنتیکی پایین به محیط جدید خود سازگاری خوبی پیدا کرده‌اند (Lee, 2002; Price and Sol, 2008). علاوه بر موانع رفتاری، تغییرات آب و هوایی و وقایع زمین‌شناسی می‌تواند بر الگوی پراکنش جمعیت‌ها تأثیر گذارد (Avise et al., 2009; Hewitt, 2000). در پاسخ به تغییرات آب و هوایی، موجودات زنده در جستجوی شرایط مساعدتر در پناهگاه‌ها پراکنش خود را به آن سمت تغییر می‌دهند (Parvizi et al., 2018).
- بنابراین می‌توان گفت در مطالعه بررسی منشأ جمعیت‌های ماهیان سه‌خار خلیج گرگان به روش توالی‌یابی COI روابط بین کلیدها حل نشد و منشأ جمعیت ماهیان خلیج گرگان هم به درستی شناسایی نشد. به طور مشابه، جمعیت آلبرتا کانادا در فاصله بسیار نزدیکی با جمعیت سواحل غربی امریکای شمالی قرار داشت اما به دلیل میزان حمایت پایین درخت فیلوژنی منشأ اصلی آن شناخته نشد (Rezansoff et al., 2015). در مورد جمعیت ماهیان فوق، این فرضیه که جمعیت ماهیان سه‌خار آلبرتا طی کلونیزه شدن طبیعی در طول آخرین دوره یخبندان به وجود آمده‌اند نباید رد شود و می‌توان گفت ممکن است کلونیزه شدن پس از یخبندان در رودخانه‌های آلبرتا اتفاق افتاده باشد (Rezansoff et al., 2015). با وجود اینکه نشانگرهای mtDNA برای مطالعات فیلوژنیک گونه‌ها به کار می‌روند اما به دلیل اینکه یک لوکوس منفرد غیرقابل نو ترکیب می‌باشد که وراثت مادری دارد و هر درختی که رسم می‌شود تنها دودمان‌های جمعیت‌های ماده را نشان می‌دهد در نتیجه ممکن است mtDNA تاریخچه فیلوژنی غالب یک جمعیت را به درستی نشان ندهد (Leache et al., 2016; Fang et al., 2018) و به همین دلیل روابط بین کلیدها در این تحقیق نامشخص باقی ماند. بنابراین، نیاز است ماهیان سه‌خار خلیج گرگان و تالاب کامارگ با استفاده از سایر نشانگرهای ژنتیکی مورد سنجش قرار گیرند و حتی نمونه‌برداری گسترده‌تر از شرق تا غرب خزر جنوبی و مقایسه مستقیم آنها با ماهیان سه‌خار از آب‌های دیگر کشورها می‌تواند به روشن‌تر شدن روابط فیلوژنی ماهیان سه‌خار دریای خزر با کل آب‌های دنیا کمک کند.

پست الکترونیک نویسنده

ainazshirangi@gmail.com

سیده آیناز شیرنگی:

## REFERENCES

- Gibson G., 2005. The synthesis and evolution of a supermodel. *Science*, 307: 1890–1891.
- Gharibkhani M. 2014. Genetic analysis of pike-perch, *Sander lucioperca* L., populations revealed by microsatellite DNA markers in Iran. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 12(1): 99–108.
- Ghasemzadeh M. 2006. Morphometric, meristic investigation and Karyotype of Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in southeast of Caspian Sea coasts. M.Sc. Thesis. Shahid beheshti University, Tehran.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., Waard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (1512): 313–321.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.
- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., Burridge M., Watkinson D., Dumont P., Curry A., Bentzen P., Zhang J., April J., Bernatchez L. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *Plos One*, 3(6): 1–8.
- Hudson R.R., Slatkin M., Maddison W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2): 583–9.
- Izadi S. 2020. Separation of Three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758) by using Growth rates, Mortality, Molecular and Morphological methods in South Coasts of the Caspian Sea and North Coasts of the Mediterranean Sea. M.Sc. Thesis. University of Gonbad Kavous. (In Persian).
- Katouzian A.R., Sari A., Macher J.N., Weiss M., Saboori A., Leese F., Weigand A.M. 2016. Drastic underestimation of amphipod biodiversity in the endangered Irano-Anatolian and Caucasus biodiversity hotspots. *Scientific Reports*, 6, 22507.
- Lee C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 386–391.
- Lescak E.A., Marcotte R.W., Kenney L.A., von Hippel F.A., Cresko W.A., Sherbick M.L., Colgren J.J., Andrés López, J., Riddle B. 2015. Admixture of ancient mitochondrial lineages in three-spined stickleback populations from the North Pacific. *Journal of Biogeography*, 42: 532–539.
- Leache A.D., Banbury B.L., Linkem C.W., de Oca A.N.M. 2016. Phylogenomics of a rapid radiation: is chromosomal evolution linked to increased diversification in North American spiny lizards (Genus *Sceloporus*)?. *BMC Evolutionary Biology*, 63: 1–16.
- Leroy S.A., Arpe K. 2007. Glacial refugia for summer-green trees in Europe and south-west Asia as proposed by ECHAM3 time-slice atmospheric model simulations. *Journal of Biogeography*, 34: 2115–2128.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Genetics and Population Analysis*, 25(11): 1451–1452.
- Mäkinen H.S., Cano J.M., Merilä J. 2006. Genetic relationships among marine and freshwater populations of the European three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*, 15: 1519–1534.
- Mäkinen H.S., Merilä J. 2008. Mitochondrial DNA phylogeography of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Europe-evidence for multiple glacial refugia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 167–182.
- McKinnon J.S., Rundle H.D. 2002. Speciation in nature: the threespine stickleback model systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 480–488.
- McPhail J.D. 1993. Speciation and the evolution of reproductive isolation in the sticklebacks (*Gasterosteus*) of south-western British Columbia. In: Bell M, Foster S (Eds.). *The evolutionary biology of the threespine stickleback*. Oxford University Press, UK, pp: 400–437.
- Orti G., Bell M.A., Reimchen T.E., Meyer A. 1994. Global survey of mitochondrial DNA sequences in the threespine stickleback: evidence for recent migrations. *Evolution*, 48: 608–622.
- Parvizi E., Naderloo R., Keikhosravi A.R., Solhjoui-Fard S., Schubart C.D. 2018. Multiple Pleistocene refugia and repeated phylogeographic breaks in the southern Caspian Sea region: Insights from the freshwater crab *Potamon ibericum*. *Journal of Biogeography*, 45(6): 1234–1245.
- Patimar R., Najafabadi M.H., Souraki M. G. 2010. Life history features of the nonindigenous three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758) in the Gomishan wetland (southeast Caspian Sea, Iran). *Turkish Journal of Zoology*, 34: 461–470.
- Price T.D., Sol D. 2008. Genetics of colonizing species. *American Naturalist*, 172(S1): S1–S3.
- Östlund-Nilsson S. 2006. Reproductive behaviour in the three-spined stickleback. In: Östlund-Nilsson S, Mayer I, Huntingford FA (Eds.). *Biology of the Three-Spined Stickleback*. Boca Raton: CRC Press, pp: 157–177.
- Rezansoff A.M., Crispo E., Blair C., Cruz E., Kitano J., Vamosi S.M., Rogers S.M. 2015. Toward the genetic origins of a potentially non-native population of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Alberta. *Conservation Genetics*, 16: 859–873.
- Rodriguez C.R., Cho E.J., Keogh M.C., Moore C.L., Greenleaf A.L., and Buratowski S. 2000. Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1): 104–12.
- Sal'nikov V.B. 1995. Possible changes in the composition of the ichthyofauna after completion of the Karakum Canal in Turkmenistan. *Journal of Ichthyology*, 35(7): 108–121.
- Sharbati S., Shabani A. 2015. The Effects of Khozeini Canal Reopening on the General Current Pattern in the Gorgan Bay. *Journal of Water and Soil Conservation*, 22(3): 241–248.
- Taggart J. B., Hynes R. A., Prodoehl P. A., Ferguson A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonid fishes. *Journal of Fish Bio-*

logy, 40: 619-633.

Verhoeven J.T.A. 1980. The ecology of Ruppia-dominated communities in Western Europe, III. Aspects of production, consumption and decomposition. Aquatic Botany, 8: 209-53.

Watanabe K., Seichi M., Mutsumi N. 2003. Genetic relationships and origin of two geographic groups of the freshwater threespine stickleback, 'Hariyo'. Zoological science, 20(2): 265-274.

Wright S. 1987. Evolution and the genetics of populations, vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago, Press Chicago. 584 P.

#### نحوه استناد به این مقاله:

شیرنگی س.آ. مقایسه ژنتیکی ماهی سه خاره (*Gasterosteus aculeatus*) با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) در خلیج گرگان (سواحل جنوبی دریای خزر) و تالاب کامارگ (سواحل شمالی دریای مدیترانه). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۳۹۹، ۴۵-۳۶: ۸(۴).

Shirangi S.A. Genetic comparison of Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) by using sequencing of Cytochrome Oxidase 1 (COI) gene in Gorgan bay (Southern Caspian Sea shores) and Camargue wetland (Northern Mediterranean Sea shores). Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous. 2021, 8(4): 36-45.

# Genetic comparison of Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) by using sequencing of Cytochrome Oxidase 1 (COI) gene in Gorgan bay (Southern Caspian Sea shores) and Camargue wetland (Northern Mediterranean Sea shores)

Shirangi S.A

Assistant prof, Dept. of Biology, Faculty of Sciences and engineering, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran

## Type:

Original Research Paper

## Paper History:

Received: 19-11-2020

Accepted: 22-01- 2021

## Corresponding author:

Shirangi S.A. Assistant prof, Dept. of Biology, Faculty of Sciences and engineering, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran

Email: ainazshirangi@gmail.com

## Abstract

Three-spined stickleback (*G. aculeatus*) is one the main model species which can be easily cultured in laboratory condition. Since it is invasive species in the Caspian Sea and the origin of its entrance is not clear. Furthermore, the three-spined population in South of France in Delta of Rhone River (Camargue wetland) is distinctive from other European populations especially Mediterranean population, therefore, Genetic comparison of three-spined stickleback between Gorgan bay (Iranian Coasts) and Camargue Wetland (South France Coasts) was studied by COI sequencing in this study. For this reason, 10 individual fish were sampled from each studied region and kept in Ethanol 96% until the time of experimental performance. After DNA extraction and PCR Reaction by one pair of Cytochrome Oxidase 1 (COI), Results of sequencing showed that the amplified sequence has 680 bp. The low number of haplotype and low haplotype diversity in both studied region dedicated the low genetic diversity of those populations. Level of  $F_{ST}$  as a Genetic distinction was 0.333 which is indicated high Genetic distinction of both populations. In spite of low Genetic distance (0.002) between two groups based on Kimura 2 Parameters method (K2P), phylogeny tree showed that the fish population of Gorgan bay and Camargue wetland formed a distinctive sub-clade. Even it is hypothesized that these two populations have mutual origin but due to low supportive degree (bootstrap) the relationship between clades was not solved and the origin of three-spined sticklebacks of Gorgan bay was not properly evaluated.

**Keywords:** *G. aculeatus*, Caspian Sea, Camargue Wetland, Cytochrome oxidase 1, invasive species