فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال دوم/ شماره سوم/ تابستان ۹۳/ صفحات ۳۶-۲۵

بررسی ساختار ژنتیکی کیلکای معمولی خزری(*Clupeonella cultriventris caspia*) حوضه جنوبی دریای مازندران(منطقه گیلان و مازندران) با استفاده از تعیین توالی mt DNA

رضا شهریاری[1*]، لیدا شجاعی کاوان[2]، فرامرز لالویی[3]، عسل دباغ[4]

چکیده

در این مطالعه ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری(*Clupeonella cultriventris caspia*) در دریای مازندران طی زمستان ۱۳۹۱ و بهار ۱۳۹۲ با استفاده از روش تعیین توالی بررسی گردید . تعداد ۳۰ نمونه ماهی کیلکای معمولی از مناطق صیادی مازندران، گیلان جمع آوری و نمونه بافت باله آنها در اتانول ۹۶٪ فیکس گردید و برای انجام مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید . DNA ژنومی نمونه ها از بافت نرم باله دمی ماهی به روش استات آمونیوم استخراج شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از یک جفت پرایمر طراحی شده، بر روی DNA ژنومی ماهی کیلکای معمولی استفاده گردید. مقادیر مربوط به فراوانی آللی، تعداد آللهای واقعی و مؤثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، مقادیر F_{st} بر اساس آزمون Tajima و Nei با استفاده از نرم افزار ژنتیکی BioEdit و Arlequin محاسبه گردید. دندروگرام فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار ژنتیکی Mega4 ترسیم گردید. بر اساس درخت فیلوژنی رسم‌شده نمونه‌های منطقه گیلان از نمونه‌های مازندران بخوبی منشعب شدند. بررسی دندروگرام کیلکای معمولی خزری نیز مبین این بود که ژن D-Loop توانسته است ساختار ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی خزری را در دریای خزر شناسایی و جمعیت‌های کیلکای معمولی خزری را از هم تفکیک و جمعیت منطقه گیلان را از مازندران بصورت شفاف جدا کند.

کلید واژه: ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris Caspia*)، تعیین توالی، ژنتیک جمعیت، دریای خزر.

۱. گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران Reza_Shahryari@yahoo.com
۲. گروه شیلات، واحد سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی، سوادکوه، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران
۴. گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

۱- مقدمه

تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می کند. بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است و اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع دریایی دارد (Bataillon, et al. 1996) . مبحث ژنتیک آبزیان از شکل قدیمی دورگه‌گیری که در اوایل قرن گذشته شروع شده بود به مباحث پیچیده تری گسترش یافته است که از جمله آن شناخت نژادها و گونه ها و تخمین میزان خویشاوندی بین گونه ای و درون گونه‌ای، دستکاری های کروموزومی تغییر و کنترل جنسیت آبزیان و تولید آبزیان تک جنسی، مطالعات سیتوژنتیکی و بیولوژی و ژنتیک مولکولی با استفاده ازروش های مختلف مانند تعیین توالی DNA میتوکندریایی (mtDNA) را می‌توان نام برد. در حال حاضر تکنیک های مولکولی در مطالعات زیستی از قبیل اصلاح نژاد آبزیان، تشخیص بیماری‌ها حتی قبل از بروز علائم ظاهری آن، شناخت جمعیت ها و نژادهای مختلف، تهیه بانک ژنی، انتقال صفات و... کاربرد بسیار زیادی پیدا کرده است.

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه تفاوت هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می-باشند ولی می‌توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دو گونه از یک سو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکاملی و رابطه اجدادی- فرزندی و در نهایت ترسیم درخت فایلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرد. این تفاوت‌ها را بطور مستقیم بر اساس توالی قطعه (Sequencing) مورد نظر می‌توان تعین کرد. از آنجایی‌که پدیدآمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت‌های جدا یا نسبتاً جدا از یکدیگر می‌باشند، بنابراین به طور قطع می‌توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه‌زایی ارتباط برقرار نمود (Ferraris and Palumbi, 1996).

به طور کلی توصیف ژنتیکی ذخایر ماهیان، اطلاعاتی به ما می‌دهد که بازتاب ساختار ژنتیکی، بدون تأثیر از فاکتورهای محیطی می باشد. برای مدیریت بهینه جمعیت ماهیان، اطلاعاتی راجع به ساختار ذخایر نیاز است تا بتوان تنوع ژنتیکی جمعیت را از طریق افزایش تنوع ژنتیکی حفظ کرد. امروزه به کمک روش-های متفاوتی به بررسی تنوع ژنتیکی می پردازند که بر اساس پیشرفتهایی در بیولوژی مولکولی و با استفاده از نشانگرهای DNA می باشند. یک نشانگر ایده‌آل باید دارای جایگاه‌هایی با تغییرپذیری بالا، قابلیت رتبه‌دهی و الل‌های هم بارز بوده و بطور یکنواخت در سراسر ژنوم پخش شده باشد. در نهایت شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره برداری مناسب موجب اجرای برنامه های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها و جمعیت‌های با ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در تکثیر و پرورش این موجودات خواهد شد. وجود تنوع

ژنتیکی در ذخیره ژنی هرجمعیت ضامن بقای آن جمعیت در روند انتخاب طبیعی است. در جمعیت های کوچک بدلیل محدود بودن ذخیره ژنی امکان رانش ژنتیکی وجود دارد که شانس بقای آن جمعیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان زمانی با موفقیت همراه می‌باشد که شناسایی ذخایر ژنتیکی گونه های بومی و غیر بومی منطقه مورد بررسی قرار گیرد. اولین گام در این زمینه تشخیص صحیح گونه ها جمعیت ها و یا نژادها می‌باشد که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه ها حائز اهمیت است. امروزه پیشرفت علم ژنتیک و نشانگرهای مولکولی در حد بسیار زیادی در شناسایی گونه ها موثر واقع شده بطوری که مطالعات سیستماتیک و اکولوژی را تحت تأثیر قرار داده است.

مطالعات mt DNA می‌تواند در شناسایی ذخایر ماهیان و تعیین سهم ذخایر مذکور در صید ذخایر ترکیبی مفید واقع شده و اطلاعات مفیدی را برای مطالعه وجود اختلاف ژنتیکی ماهیان در اختیار قرار دهند (Murgia et al., 2002).

۲- مواد و روش‌ها

این تحقیق در طول فصل صید اسفند ۱۳۹۱ و فروردین ۱۳۹۲ با تعداد جمعاً ۳۰ نمونه ماهی کیلکای معمولی از مناطق صیادی مازندران، گیلان که توسط تور قیفی لنج‌های صیادی صید شد، بصورت تصادفی نمونه برداری شد. ماهیان جمع آوری شده در وحله نخست بیومتری شده و سپس به مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از باله دمی برداشته و بلافاصله در الکل اتانول ۹۶٪ فیکس گردید. آنگاه نمونه‌ها برای استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردیدند. برای استخراج DNA به روش استات آمونیوم ابتدا نمونه های باله را با آب مقطر شستشو داده و پس از آنکه نمونه ها بوسیله کاغذ صافی کاملا خشک گردید، توسط قیچی خرد شدند و به میکرو تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شدند. در تمام این مراحل دقت شده است تا ابزارها تمیز بوده تا آلودگی به میکرو تیوبهای دیگر وارد نشود. سپس به هریک از میکروتیوب‌ها برای هضم بافت مورد نظر به ویژه پروتئین‌ها توسط سمپلرهای مناسب به میزان ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE و ۵۰ میکرولیتر SDS و ۳ میکرولیتر آنزیم پروتئاز K اضافه شد. در مرحله بعد میکروتیوب‌ها بمدت یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شدند. سپس میکرو تیوب‌ها بمدت ۱۶ ساعت در داخل بن ماری، با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، به صورت شناور قرار داده شدند تا در طول این مدت، گرما جهت فعال‌نمودن کامل آنزیم پزوتئیناز به هضم مواد کمک کند. در طی این مدت نمونه کاملا هضم شده به صورت امولسیونی غلیظ در آمد. پس از آن استات آمونیوم ۷/۵ درصد به میزان ۱۶۰ میکرو لیتر به هر کدام از میکروتیوبها اضافه شد و سپس میکروتیوبها ورتکس شدند و

نمونه ها بمدت یک ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. بلافاصله تیوپ حاوی نمونه در ۱۳۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. به آرامی فاز بالایی توسط یک سمپلر جدا گشته و در داخل میکرو تیوب جدیدی ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول به آن اضافه شد، لوله ها به وسیله دست به آرامی ۱۵ تا ۲۰ مرتبه سر و ته شدند. در این مرحله لخته های DNA به راحتی مشاهده می شوند. سپس در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. رسوب سفید رنگی در تیوپ شکل می گرفت که همان DNA بود. ایزوپزوپانول سطحی دور ریخته شد و بعد از خشک کردن به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، نمونه را با الکل ۷۰ درجه به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر شستشو داده تا بقایای ایزوپزوپانول از بین برود. مجددا در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ نموده و فاز بالایی خالی شد، جهت خشک شدن و تبخیر الکل از رسوب DNA نمونه‌ها به مدت یک ساعت در هوای اتاق قرار داده شدند. پس از خشک شدن، بر روی رسوب DNA ، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۳ میکرولیتر آنزیم RNAase اضافه شده و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا DNA به طور کامل در آب حل و قطعات RNA ناخواسته هضم گردد.

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. مناسب‌ترین روش برای مشاهده DNA در ژل آگارز، رنگ آمیزی آن با رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید است. این رنگ حاوی گروه-های سطحی (Planar) است که بین جفت بازهای DNA قرار گرفته و باعث می شود تا فلوئورسانت تشدید شده ای را نسبت به رنگ آزاد در محلول، در زیر نور ماورا بنفش نشان دهد. پس از تایید کیفییت مناسب DNA استخراج شده ، جهت انجام واکنش PCR از یک جفت پرایمر که بر اساس توالی قطعه‌ای از ژن میتوکندریایی طراحی شده بود استفاده گردید. در جدول شماره ۱ خصوصیات و توالی پرایمرهای Forward و Reverse مورد استفاده برای آزمایش PCR در قطعه ژنی D-Loop ، mtDNA همراه با منبع آن آورده شده است.

جدول شماره ۱ - مشخصات پرایمرهای Forward و Reverse مورد استفاده برای قطعه‌ژنی D-Loop

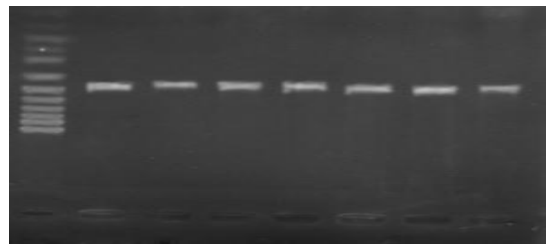
Oligo name	Sequence	Tm'	% GC Content	Reference
CDL-D	TAGCTCCCAAAGCTAAGATTC (21)	53	42.9	J.-C. NI COD*, *et al* (2004)
PIDL	GCTTGGTGGGTAACGAGTC (19)	53	57.9	J.-C. NI COD*, *et al* (2004)

قبل از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژن هدف ابتدا اقدام به بهینه‌کردن PCR بمنظور تعیین پروفیل حرارتی و تست دونوع آغازگر گردید. برای پیدا کردن دمای اپتیمم PCR ابتدا منابع بررسی گردید تا دامنه کلی دما برای کیلکا به دست آمد و سپس بعد از ۱۲ مرتبه PCR دمای اپتیمم برای نمونه‌های مطالعه حاضر۵۳ درجه سانتی گراد برای آغازگر به دست آمد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژن هدف برای کلیه نمونه‌ها انجام شد. پس از جدا سازی نمونه‌های DNA با کیفیت مناسب ، ۴۰ میکرو لیتر از محصول PCR و ۱۰ میکرولیتر از پرایمر مورد نظر با غلظت pmol ۱۰ را برای تخلیص و تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست و سپس به کشور کره فرستاده شد. قطعه تکثیر شده از جهت Forward توالی یابی شد.

کروماتوگرام توالی‌های بدست آمده توسط نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) بررسی و در صورت نیاز ویرایش شد. پس از انجام تعیین توالی و دریافت نتایج، آنالیز نهایی با استفاده از نرم‌افزار DNASP (Rozas.et al .2010) و نرم افزار (Mega4 (kumar .et al. 1993 و نرم‌افزار Arlequin انجام شد که پس از انجام تست‌های آماری، اقدام به تشخیص وجود یا عدم وجود جمعیت‌های متفاوت شد و جمعیت احتمالی را معرفی نمودیم. سکانس‌های مختلف مربوط به این مطالعه در ژن بانک ثبت شده است.

۳- نتایج

بررسی شدت وضوح باندهای DNA برروی ژل آگارز ۱٪ نشان داده که DNA های استخراج شده از باله دمی ماهی به روش استات آمونیوم از کیفیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش PCR برخوردار می باشد بدلیل آنکه باندهای DNA نسبتاً قوی و شفاف بودند که این خود بیانگر آنست DNA استخراجی از کیفیت مناسبی برخوردار است.



شکل شماره ۱- محصول PCR ماهی کیلکای معمولی خزری

در روش اسپکتروفتومتری DNA میزان جذب درطول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm بوسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید که نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت

می‌باشد. نمونه‌هایی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بوده انتخاب شد و در مورد نمونه‌های نامناسب، استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی کلیه نمونه ها بین۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم میباشد. در ارزیابی محصول PCR ، طول قطعه تکثیر شده درکلیه نمونه‌ها با استفاده از نشانگرDNA،۳۰pmol برای ژن D-Loop بدست آمده حدود ۶۷۰ جفت باز می‌باشد. پرایمر مورد استفاده درشیب حرارتی ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت که در دمای۰ ۵۳ جواب قابل قبول داده است.

در رابطه با درصد نوکلئوتیدی بیشترین میزان سیتوزین در نمونه های گرفته شده از منطقه مازندران (۱۲/۷۲٪) و کمترین میزان سیتوزین در نمونه های گرفته شده از منطقه گیلان (۱۲/۳۸٪) می‌باشد. بیشترین میزان گوانین در نمونه های گرفته شده از منطقه مازندران (۲۴/۱۱٪) و کمترین آن در منطقه گیلان (۲۳/۶۶٪) می باشد. بیشترین میزان آدنین در نمونه های گرفته شده از منطقه گیلان (۲۸/۶۰٪) و کمترین آن در منطقه مازندران (۲۸/۱۳٪) می باشد و در آخر بیشترین میزان تیمین در نمونه‌های گرفته شده از منطقه گیلان (۳۵/۳۶٪) و کمترین آن در منطقه مازندران (۳۵/۰۳٪) می‌باشد.

در رابطه با تنوع نوکلوتیدی، بیشترین تنوع نوکلوتیدی درمنطقه مازندران با (۰/۰۳۷) وکمترین تنوع نوکلوتیدی درمنطقه گیلان (۰/۰۱۸) میباشد. معیاری که برای تعیین میزان چند شکلی(پلی مورفیسم) جایگاهها استفاده می شود تعداد آلل های واقعی است . بیشترین تعداد آلل واقعی درجایگاه ۱۳و۱۶ در مازندران (۵ آلل) و در جایگاه ۶ در گیلان (۵ آلل) بوده است. تعداد آلل‌های قابل انتظار برای نمونه‌های مازندران (۱۱/۱۲۱) و برای نمونه‌های گیلان (۱۰/۹۵۱) بدست آمد. شاخص راجیدنس برای نمونه های مازندران (۰/۰۲۶) و برای نمونه های گیلان (۰/۰۲۹) بدست آمد.

در ۳۰ نمونه گرفته شده از باله دمی ماهی کیلکای معمولی خزری پس از تعیین توالی ۲۳ هاپلوتیپ توسط نرم افزار Arlequin 3.11 شناسایی شده که بعضی از این هاپلوتیپ‌ها در چند منطقه دیده می شوند اما بعضی از هاپلوتیپ ها بصورت اختصاصی بوده اند ، بدین معنی که فقط در یک منطقه دیده می-شوند. در منطقه مازندران از ۱۴ هاپلوتیپ ۷ هاپلوتیپ بطور اختصاصی و در منطقه گیلان از ۹ هاپلوتیپ ۹ هاپلوتیپ بطور اختصاصی در همان منطقه دیده شده است اما بین مناطق گیلان و مازندران، هاپلوتیپ مشترکی وجود نداشته است . بیشترین درصد فراوانی هاپلوتیپ در نمونه‌های گرفته شده از مناطق گیلان در هاپلوتیپ‌های شماره ۲۰ و ۲۲ با ۰/۲۰ ٪ می‌باشد.

شاخص تمایز ژنتیکی (Fst) در نمونه‌های گرفته‌شده از منطقه مازندران و گیلان با ۰/۰۷۷ مشاهده شده است.

شاخص ارزیابی تمایز ژنتیکی(Fst P values) در منطقه گیلان با مازندران (۰/۰۱ – +۰/۰۲) می باشد که کمتر از ۰/۰۵ بوده و اختلاف آن کم و تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است. فاصله ژنتیکی میان نمونه های مازندران و گیلان (۰/۰۵۷) می‌باشد.

دامنه هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He) بین مناطق نمونه‌برداری با میانگین (۰/۰۳۶) و بیشترین مقدار (۰/۰۳۷) در منطقه مازندران می‌باشد و دامنه هتروزایگوسیتی مشاهده شده یا واقعی (Ho) بین مناطق نمونه برداری با میانگین (۱۱/۰۳۶) و بیشترین مقدار (۱۱/۱۲۱) در منطقه مازندران می باشد. تعداد آلل های موثر هم می تواند بعنوان شاخص تنوع ژنتیکی قرار گیرد . تعداد آلل‌های موثر مشاهده شده از نمونه های دو منطقه مازندران و گیلان نشان می‌دهد که بیشترین تعداد آلل در نمونه‌های گرفته شده از منطقه مازندران با مقدار (۰/۹۸+ ۲/۸۱) قرار دارد.

کروماتوگرام توالی‌های بدست آمده توسط نرم افزار Bioedit بررسی و در صورت نیاز ویرایش شد. در رابطه با آنالیز فیلوژنی بررسی دندروگرام نشان‌دهنده این است که درخت به دو ریشه اصلی A و B تقسیم می شود که شاخه A درخت فیلوژنی خود به دو شاخه A1 و A2 وشاخه B به سه شاخه B1 و B2 و B3 منشعب شده است .شاخه B1 بطور اختصاصی به نمونه های کیلکای معمولی منطقه گیلان تعلق دارد ، در حالی که شاخه A1 بطور اختصاصی به نمونه‌های کیلکای معمولی مازندران متعلق است . در شاخه B3 چند زیر شاخه جداگانه است که نشان می‌دهد نمونه‌های منطقه گیلان از نمونه‌های مازندران بخوبی منشعب شده اند. شاخه A1 از لحاظ زمان تکاملی، زودتر از شاخه A2 اشتقاق پیدا کرده است. بررسی دندروگرام کیلکای معمولی خزری بطور واضح مبین این است که ژن D-Loop توانسته است که جمعیت منطقه گیلان را از مازندران جدا کند.

توالی‌های بدست‌آمده از مناطق نمونه‌برداری فوق برای کیلکای معمولی خزری در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شده است که کد دسترسی آنها برای منطقه مازندران KF731606 و کد دسترسی برای منطقه گیلان KF731607 می‌باشد.

۴- بحث

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می-باشند ولی میتوانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دو گونه از یک سو و بازسازی و مدل‌سازی تاریخچه تکاملی و رابطه اجدادی- فرزندی و در نهایت ترسیم درخت فایلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرد. این تفاوت‌ها را بطور مستقیم بر اساس توالی قطعه (Sequencing) مورد نظر میتوان تعیین کرد. از آنجاییکه پدیدآمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان

جمعیت های جدا یا نسبتا جدا از یکدیگر می باشند، بنابر این به طور قطع می‌توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه‌زایی ارتباط برقرار نمود(Ferraris and Palumbi,1996)

اولین مرحله مهم تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیتهای درحال بهره برداری است . این استراتژی درصورتیکه بر پایه روشهای دقیق و قوی مثل داده های مولکولی باشد ، می تواند علاوه بر حفظ زیستی ، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند(Thai et al., 2006).

باتوجه به اینکه در زمینه تعیین توالی ماهی کیلکا به کمک ژن D-Loop ، mtDNA در ایران کار تحقیقی انجام نگرفته است لزوم این تحقیق کاملً مشهود می‌باشد. در این تحقیق ذخایر کیلکاماهیان به روش مولکولی و با استفاده از توالی ناحیه D-Loop مولکول DNA میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفته تا وجود ژنوتیپ‌های متفاوت یا جمعیت‌های احتمالی در مناطق جنوبی دریای مازندران(مازندران، گیلان) شناسایی گردد تا ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت بر ذخایر دریای مازندران بررسی گردد. بررسی ساختار ژنتیکی و مطالعات جمعیتی ماهی کیلکای معمولی خزری از پیشینه مطالعاتی برخوردار نمی باشد به طوری که تنها پژوهش انجام شده در ایران بر روی ماهی کیلکای معمولی خزری جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون‌گونه‌ای کیلکاماهیان بمنظور اعمال مدیریت شیلاتی با روشPCR-RFLP بوده که اختلافات ژنتیکی در گونه‌های آنچوی و معمولی مشاهده کرده است(لالوئی و همکاران، ۱۳۸۵).

امروزه تمایز جمعیت‌های متفاوت آبزیان به سه روش متداول مانند استفاده از مشخصه‌های مرفولوژی، تنوع آلوزایم‌ها و تفاوت در توالی DNA انجام می‌گیرد. روش استفاده از تفاوت در توالی‌های DNA از جمله دقیق‌ترین روش در طبقه‌بندی موجودات بوده و دور از هر گونه اشتباه می‌باشد. در اکثر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود و از آنجایی‌که چنین داده‌هایی کمتر تحت تأثیر انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنی واقعی را نمایان سازند (Hedrick,1999).

در رابطه با میزان Fst ، جریان ژنی، شباهت و فواصل ژنتیکی اینگونه می‌توان گفت که بر اساس تعاریف، یک جمعیت گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولیدمثلی از گروه های دیگر همان گونه جدا هستند اما بعلت فقدان جداسازی کامل بین جمعیت‌ها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌ها) به عنوان گونه مطرح نمی‌گردد. در حقیقت رفتارهای تولیدمثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولید مثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد با جمعیت می‌باشد(صفری، ۱۳۸۵). مقدار Fst همیشه مثبت بوده و عددی بین صفر (هیچ زیر جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیر جمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغییر است. زمانی که Fst بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان‌دهنده جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. اما برای تفسیر Fst پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵

نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا است و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا است (Wright, 1987; Hartl and Clark, 1989). اما بطور معمول مقدار Fst به طور معقولانه‌ای زیر ۰/۰۵ مطرح می‌شود که محققین ممکن است ساختار بین زیر جمعیت‌ها را ضعیف تصور کنند در حالی که آن نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست. نکته دیگر آنکه میزان Fst در اکثریت موارد به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی مورفیسم ناشی از جهش به طور مؤثری میزان Fst را تغییر می‌دهد (Wright, 1987; Charlesworth, 1998; Nagylaki, 1998; Hedrick, 1999). تفاوت معنی‌دار در تفسیر Fst در تشخیص ساختار جمعیت، مورد توجه است. استفاده از آزمون-های غیر پارامتریک وسیله‌ای برای ارزیابی برآورد معنی‌دار Fst است و معنی‌داربودن آن با مقدار P آزمون می‌شود(Petit and Mayer, 1999). فاصله ژنتیکی[1] عددی بین صفر تا یک است که هرچه این عدد به یک نزدیک شود فاصله ژنتیکی بیشتر بوده و اختلاف زیادی وجود دارد و هرچه این عدد به صفر نزدیک شود فاصله ژنتیکی کمتر بوده و اختلاف کمی وجود دارد . تمام مطالعات فیلوژنتیکی بر دو امر، مدل سازی درخت فیلوژنی و تخمین زمان اشتقاق گونه‌ها استوار است(Li, 1997). درختان فیلوژنیک مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آنها برای درک روابط تکاملی استفاده نمود. به عبارت دیگر هر چه موجودات مورد بررسی مشابهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیک‌تری دارند. در بیشتر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود. از آنجاییکه چنین داده هایی (در مقایسه با داده‌هایی مانند داده‌های ریخت‌شناختی) کمتر تحت تأثیر نتایج انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنتیکی واقعی را بازتاب دهند. درختان فیلوژنتیک شامل گره‌ها و شاخه‌های متصل به این گره‌ها می‌باشند. گره‌های خارجی یا پایانی گروه‌ها را نشان می‌دهند و گره‌های داخلی گروه‌های خویشاوندی را به هم پیوند می‌دهند.

با توجه به ارزیابی مقادیر بدست‌آمده از فراوانی آلل‌ها و هتروزایگوسیتی و شاخص تمایز ژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنی ماهی کیلکای معمولی خزری در دو منطقه نمونه‌برداری می‌توان اینگونه جمع‌بندی نمود که ماهی کیلکای معمولی خزری در منطقه مازندران از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار بوده و تمایز ژنتیکی، منطقه گیلان را بوضوح از منطقه دیگر جدا کرده است. لازم به ذکر است که کاهش تنوع ژنتیکی منجر به کاهش پتانسیل ژنتیکی و کاهش سازگاری با تغییرات محیطی می‌شود، بنابراین نظارت بر هر تغییر در ساختار ژنتیک جمعیت‌های این گونه ضروری است.

با تجزیه تحلیل آماری انجام شده و انطباق نتایج حاصله با پیش‌فرض‌های معلوم، می‌توان این گونه جمع‌بندی کرد که منطقه D-Loop در میتوکندری ابزار مناسبی برای شناخت و بررسی تنوع جمعیت و

1 .Pairwise difference & Distance method

روابط تکاملی میان جمعیت‌ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیت می‌باشند. در حقیقت این تحقیق توانسته به هدف خود یعنی شناسایی ساختار ژنتیکی و شناسایی جمعیت‌های احتمالی کیلکای معمولی خزری در مناطق نمونه‌برداری (مازندران، گیلان) برسد. این تحقیق مدارک و شواهد اولیه را برای وجود جمعیت‌های مشابه و متمایز نشان می‌دهد تا با توجه به برنامه‌های ژنتیکی در درست اقدام شیلات در زمینه شناسایی ماهی کیلکای معمولی خزری در سواحل شمالی دریای مازندران، بتواند راهکارهای مناسب جهت مدیریت اصولی ذخایر اتخاذ گردد.

فهرست منابع

۱. **شجاعی کاوان، ل.، ۱۳۸۸**، بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت (ریز ماهواره) و مقایسه فاکتورهای زیستی (طول، وزن، سن) و میزان هم آوری جمعیت ها ، ۱۳۸۹، پایان نامه دکتری، ۷۶ ص.

۲. **فضلی، ح . بورانی، م.ص .جانباز، ع.ا.. .کیمرام، ف. امانی، ق ۱۳۸۲**. مونیتورینگ کیلکا ماهیان در مناطق صید تجاری. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۰ ص .

۳. **لالوئی، ف. و همکاران**. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از(mtDNA PCR-RFLP). فصلنامه علمی شیلات ایران، شماره ۶۳، تابستان ۱۳۸۷، ۶ ص.

۴. **نوروزی، م.، ناظمی، ع.، دانشور، ف.، سمیعی، م. ه.،۱۳۹۱**. ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف ماهی کیلکای معمولی سواحل حوضه جنوبی دریای خزر در استان مازندران با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره، مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ، ۱۳۹۲، ص ۳۶-۲۴.

5.**Bataillon, T.M., David, J.L., Schoen, D.J, (1996)**. Neutral genetic markers and conservation: Simulated germplasm collections. Genetics 144(1):409-417.

6.**Berthier, P., Beaumont, M.A; Cornuet, J.M. Luikart G. ,(2002).** Likelihood – Based estimation of the effective populations size using tempotal changes in allele frequencies. Agenealogical approach Genetics 160 , 741 – 751 .

7.**Billington, N., (2003).** Mitochondrial DNA. E. M. Hallerman (Ed.), Population genetics principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 59-100.

8.**Charlesworth, B., (1998).** Measures of divergence between populations and the effects of forces that reduce variability. Molecular Biologic Evolution, 5:538–543.

9.**DeWoody, J.A. Avise, J.C. (2000).** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of fish Biology, 56: 461-473.

10.**Ferraris, J.D. Palumbi, S.R. (1996)**. editors. Molecular zoology. Advances, strategies, and protocols. 76، 1117-1119. DOI: http: // dx. doi. Org / 10. 1017/ S0025315400041047.
11.**Hartl, D. L., Clark, A. G. (1989).** ``Principles of Population Genetics," 2nd ed., Sinauer, Sunderland, MA. Hassell, M. P. 1975. Density-dependence in single-species models, J. Animal Ecologic. 44: 283-296.
12.**Hedrick, P. W., (1999)**. Perspective: Highly variable genetic loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution 53: 313-318.
13.**Kohlmann K., Gross, R., (2003).** Asiya Murakaeva a,c, Petra Kersten a., Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers., Aquatic Living Resources. 16 : 421–431
14.**Murgia, R., Tola, G., Archer, S. N., Vallerga.S. and Hirano, J., (2002).** Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence. Application to identify the origin of proce. 68-81..
15.**Nagylaki T (1998)**. Fixation indices in subdivided populations.Genetics, 148, 1325–1332.
16.**NICOD, Y. Z., WANG, L., (2004).** Low levels of mitochondrial DNA variation among central and southern European Esox Lucius populations., Journal of Fish Biology (2004) 64, 1442–1449
17.**Palumbi, S. R. (1996).** Acrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In Molecular Approaches to Zoology and Evolution, J. Ferraris and S. R. Palumbi, Eds. Wiley-Liss, New York pp. 101-117.
18.**Petit, E., Mayer, F., (1999)**. Male dispersal in the noctule bat (Nyctalus noctula): where are the limits? Proceedings of the Royal Society of London B, 266: 1717–1722.
19.**Rezvani Gilkolaei, S., Shojaei Kavan, L. and Safari, R.(2012).** A Study of Genetic *Structure of Rutilus frisii kutum* in Anzali Lagoon, Using Microsatellite Markers Agriculture Science and Technology. 14: 327-337.
20.**Rivero, ER; Neves, A.C; Silva-Valenzuela, MG, Sousa, SO; Nunes, FD., (2006).** Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissuesPathol Res Pract. 202(7):523-9. Epub 2006
21.**Sabuj Kanti Mazumder., Md. Samsul Alam., (2009)**. High levels of genetic variability and differentiation in hilsa shad, *Tenualosa ilisha* (Clupeidae, Clupeiformes) populations revealed by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region., Genetics and Molecular Biology, 32, 1;190-196.
22.**Shojaei Kavan, L.; Gilkolaei, S. R.; Vossoughi, G.; Fatemi, S. M. R.; Safari, R.; Jamili, S.(2009).** Population genetic study of *Rutilus frisii kutum* (Kamansky 1901) from the Caspian Sea; Iran and Azerbaijan Regions, using microsatellite markers. Journal of Fisheries and Aquatic Science , 4: 316-322.
23.**Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
24.**Tamura, K; Nei, M., & Kumar, S., (2004)**. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (*USA*) 101:11030-11035.

25.**Thai, T.A.,. Pham b, C.M., (2006).** Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region., Aquaculture 258 (2006) 228–240.
26.**Xinhong G., Shaojun L (2003).** Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level. , Aquaculture, 224: 25–38.