بررسی ژنتیکی جمعیت‌های ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) سواحل حوضه‌جنوبی دریای‌خزر (بندرانزلی) گیلان با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت

*مهرنوش نوروزی[۱]، علی ناظمی[۲]، محمد پورکاظمی[۳]، محمدهادی سمیعی[۱] و امین روایی[۲]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه شیلات و بیولوژی دریا، تنکابن، ایران، [۲]دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، گروه زیست‌سلولی و مولکولی،تنکابن، ایران، [۳]انسیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت. ایران

تاریخ دریافت:۹۱/۲/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۷

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در جنوب دریای خزر (استان گیلان) انجام شد. در کل،۶۰ نمونه از منطقه انزلی در دو فصل بهار و تابستان، جمع‌آوری شدند. از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای ماهی کیلکای آمریکایی (*Alosa sapidissima*)، ماهی هرینگ اقیانوس آرام (*Clupea pallasi*)، ماهی هرینگ اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) و ماهی ساردین (*Sardina pilchardus*)، در بررسی DNA ژنومی استخراج شده از باله دمی ماهی کیلکای معمولی استفاده گردید. فراوانی اللی، شاخص R_{ST}، F_{ST} براساس تست AMOVA، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، تعادل هاردی- واینبرگ، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی آنها با استفاده از نرم افزار uvitec و GenAlex انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که از ۱۵ جفت پرایمر مورد استفاده پنج جفت (Cpa6، Cpa8، Cpa104، Cpa125 و AcaC051) آنها چندشکلی (پلی‌مورف) نشان دادند و از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی ماهیان بالغ کیلکای معمولی استفاده شد. میانگین اللی آنها در لوکوس‌ها ۱٤/٤ (دامنه آن ۵ تا ۲۱ لوکوس) بود. در هر دو فصل بهار و تابستان، الل‌های اختصاصی در تمامی لوکوس‌ها مشاهده شدند. میانگین هتروزایگوسیتی قابل انتظار و مشاهده شده به‌ترتیب ۰/۸۸۸ و۰/۱۵۳ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) تمامی لوکوس‌ها به‌طور معنی‌داری خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند. براساس تست AMOVA میزان R_{ST} بین آن دو ۰/۱۱۳ (Nm=۱/۹٦) و معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۱). میزان فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۳٤٤ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه است. این بررسی، مطالعات اولیه مبنی بر وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی ماهی کیلکای معمولی در فصل‌های مختلف دریای خزر (استان گیلان)را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ماهی کیلکای معمولی، ژنتیک جمعیت، بخش جنوبی دریای خزر، میکروستلایت

مقدمه

کیلکا ماهیان گروهی از ماهیان خزر می‌باشند که به‌دلیل تغذیه از سطوح پایین اکولوژیک دارای ذخایر غنی بوده و بیشترین ذخایر ماهیان دریای خزر را به خود اختصاص می‌دهند. کیلکا ماهیان اگرچه مطلوبیت سایر ماهیان ماهی خزر را از نظر بازار پسندی ندارند، لیکن به‌واسطه صید انبوه و صنعتی، تغذیه کننده تعداد زیادی کارخانه جات تولید آرد ماهی، روغن ماهی و کنسروسازی در کشورهای حاشیه دریای خزر هستند (فضلی و همکاران، ۱۳۸۱). ماهی کیلکای معمولی دارای زندگی پلاژیک است و در سطح آب مناطق ساحلی در اعماق کمتر از ۵۰ متر

*مسئول مکاتبه: mnoroozi@toniau.ac.ir

زندگی می‌کند. به‌همین علت در جنوب دریای‌خزر و در قسمت شرق و غرب تراکم بیشتری دارد. غذای اصلی آن انواع زئوپلانکتون‌ها مثل سخت‌پوستان کوچک و دوکفه‌ای‌هاست. دمای تولیدمثل ۱۰ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد است. تخم‌ریزی به‌صورت متناوب و در یک مدت نسبتاً طولانی انجام می‌گیرد. سن بلوغ نرها در یک‌سالگی و ماده‌ها دوسالگی است. فصل تولیدمثل از خرداد تا مرداد می‌باشد. این ماهی مورد تغذیه گونه‌های باارزشی مانند آزادماهیان و تاس‌ماهیان است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷).

صید کیلکا در آب‌های خزر جنوبی (استان‌های گیلان و مازندران) در سالیان اخیر به‌علت توزیع غیراصولی ناوگان صیادی، صدمه خوردن به جمعیت‌های جوان کیلکا و ظهور و گسترش جمعیت شانه‌داران سیر نزولی نشان داده است (اسماعیلی ساری و همکاران،۱۳۸۰، غفارزاده و هنربخش، ۱۳۸٦).در سال‌های اخیر به‌علت صید بیش از حد و ورود شانه‌دار جمعیت آن بسیار کاهش یافته است. با توجه به تراکم زیاد این گونه در دریای خزر و همچنین تولیدمثل آن در مناطقی از این دریا و عدم وابستگی به رودخانه این گونه در طبقه LC (کمترین نگرانی) قرار دارد. اما باید توجه داشت در صورتی‌که مدیریت درستی در زمینه بهره‌برداری صورت نگیرد، جمعیت آن در معرض تهدید قرار خواهد گرفت (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). کاهش جمعیت‌های گونه کیلکای معمولی در طول دهه اخیر اهمیت اقدامات حفاظتی در جهت بازسازی ذخایر آن را روشن می سازد. از آنجایی‌که نگهداری تمامیت ژنتیکی جمعیت‌های این ماهی اهمیت اساسی دارد، بنابراین شناسایی ساختار جمعیت به طراحی مناسب برنامه‌های بازسازی ذخایر کمک می‌کند. جهت مدیریت بهینه شیلاتی، نباید همه جمعیت‌ها را یکی فرض کرد، چه بسا جمعیت‌هایی باشد که نیاز به مراقبت ویژه و کاهش دوره صید برای آن جمعیت باشد. صید و بهره‌برداری پایدار زمانی اتفاق خواهد افتاد که از ذخایر اطلاع کافی موجود باشد.

در این راستا مطالعات ژنتیکی اندکی بر روی گونه کیلکای معمولی وجود دارد و اصولاً بررسی‌های مولکولی ساختار جمعیت یک پیش‌نیاز ضروری است. یکی از روش‌های بررسی مولکولی ساختار جمعیت، استفاده مارکرهای مولکولی میکروستلایت می باشد که قادر است سطوح بالایی از پلی‌مورفیسم را نشان دهند (Chistiakov و همکاران، ۲۰۰۵). طبیعت چند اللی میکروستلایت‌ها، توراث همبارز، پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث‌پذیری موجب شده که میکروستلایت‌ها کاربری موفقی با تنوع بالا در رشته‌های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند (Sekar و همکاران، ۲۰۰۹). تاکنون فقط یک مطالعه مولکولی در حوضه جنوبی دریای خزر بر روی این گونه توسط لالویی و همکاران (۱۳۸۵) به روش PCR-RFLP انجام شده است. از دیگر مطالعات انجام شده با استفاده از میکروستلایت بر روی شگ‌ماهیان می‌توان به Shaw و همکاران (۱۹۹۹) بر روی *Clupea harengus*، Julian و Barton (۲۰۰۷) بر روی *Alosa sapidissima*، Gonzalez و Zardoya (۲۰۰۷ ای) بر *Sardine pilchardus*، Miller و همکاران (۲۰۰۱) روی *Clupea pallasi* اشاره کرد. در مطالعه حاضر ذخایر گونه کیلکای معمولی با استفاده از مارکرهای میکروستلایتی برای مطالعه ساختار جمعیت‌های این گونه در حوضه جنوب غربی دریای خزر انجام می‌شود تا وجود جمعیت‌های احتمالی و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها شناسایی شود تا ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت بر ذخایر دریای خزر بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌گیری از منطقه انزلی در دو فصل بهار و تابستان و در هر فصل ۳۰ نمونه، از قسمت باله دمی انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶٪ فیکس و در نهایت به آزمایشگاه ژنتیک انتقال و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع مرحله استخراج نگهداری شدند.

استخراج DNA: استخراج DNA از بافت باله دمی ماهیان کیلکای معمولی با استفاده از کیت استخراج شرکت روچ آلمان با کت نامبر ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ انجام گردید. به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای بررسی ژنتیکی کیلکای معمولی از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی ده برای جنس‌های *Alosa* شامل پرایمرهای (AsaC051, 059, 249, 334؛ Julian و Barton، ۲۰۰۷)، *Clupea* شامل پرایمرهای (8, 100, 104, 107, 120, 125, 134Cap6؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۱) و (1235 و 1014؛ McPherson و همکاران، ۲۰۰۱) و *Sardina* پرایم (SAR1.12؛ Gonzalez, 2007b و Zardoya) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- شماره بانک ژنی، دمای اتصال (^oC)، دامنه اللی بر اساس جفت باز برای پرایمرهای استفاده شده

شماره بانک ژنی	دمای اتصال (^oC)	دامنه اللی (جفت باز)	لوکوس
AF309801	۵۲	۲۱۶-۱۰۴	Cpa6
AF309804	۵۲	۲۱۶-۱۰۴	Cpa8
AF309790	-	تکثیر نشد	Cpa100
AF309791	۵۱/۵	۳۹۰-۳۱۲	Cpa104
AF309792	-	تکثیر نشد	Cpa107
AF309795	-	تکثیر نشد	Cpa120
AF309796	۵۹	۲۸۰-۲۱۶	Cpa125
AF309798	-	تکثیر نشد	Cpa134
EF014992	۵٤	۱۸۰-۱٦۰	AsaC051
EF014993	-	تکثیر نشد	AsaC059
EF014994	-	تکثیر نشد	AsaC249
EF014995	-	تکثیر نشد	AsaC334
EF012617	-	تکثیر نشد	SAR1.12
AF304362	-	تکثیر نشد	1235
AF304360	-	تکثیر نشد	1014

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و دامنه مواد مصرفی در پرایمرها شامل: dNTPs، ۰/۲ میلی‌مولار؛ پرایمر ۰/۲ تا ۰/٤ میکرولیتر؛ DNA، ۲۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی‌مرازهات استارت ۰/٤-۰/۳ یونیت، PCR بافر هات استارت، ۱x؛ کلرید منیزیم ٤/۵-۲/۵میلی‌مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در ۸/۷: pH انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌ترتیب مرحله جداسازی ۹۵-۹٤ درجه سانتی‌گراد از ٤۵ ثانیه

تا ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به منطقه هدف از ۵۱/۵ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۰ ثانیه تا یک دقیقه و ۳۵ تا ۳۸ چرخه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ – ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ٤۵ ثانیه تا ۲ دقیقه بهینه‌سازی گردید. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت و تصویر ژل‌ها تهیه و با استفاده از نرم‌افزار uvitec بررسی شد.

آنالیز آماری

فراوانی اللی[1]، تعداداللی(Na) و تعدادالل‌های موثر (Ne) در جایگاه‌های میکروستلایتی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، مقادیر R_{ST} و F_{ST}، ماتریس شباهت[2] و فاصله ژنتیکی[3]براساسNei، ۱۹۷۲ و تعادل هاردی واینبرگ براساسχ^2، تمایز ژنتیکی براساس تست AMOVA[4] در سطح اطمینان ۱ درصد در نرم‌افزار (Peakall and GeneAlex(Smouse, 2009 محاسبه گردید.

نتایج

در این مطالعه از ۱۵ لوکوس مورد بررسی فقط پنج عدد از آنها تکثیر شدند (Cpa4، Cpa8، Cpa104، Cpa125 و AcaC051). در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاه‌ها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است (شکل ۱).

در این بررسی، میانگین تعداد کل الل واقعی و موثر به‌ترتیب ١٤/٤ و ۱۰/۷ می‌باشد. دامنه اللی از ۵ تا ۲۱ الل بدست آمد. تعداد زیادی الل در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر یافت شدند. در مجموع ۱۳ الل اختصاصی یافت شد. نمونه‌های تابستان دارای ٦ الل اختصاصی و نمونه‌های بهار دارای ۷ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰/۰۵ بودند. وجود الل‌های اختصاصی به مرور زمان می‌تواند به‌عنوان یک الگوی قوی در داخل جمعیت در هر یک از مناطق اکولوژیکی جدید تبدیل شود. بیشترین الل اختصاصی را لوکوس Cpa125 با تعداد ٤ الل اختصاصی (یک عدد در تابستان به فراوانی ۰/۰۸۳ و ۳ عدد در بهار به‌ترتیب با فراوانی ۰/۰٦۷، ۰/۱۳۳ و ۰/۱۱۷) نشان داد. لوکوس Cpa104 تعداد ۳ الل اختصاصی (یک عدد در تابستان به فراوانی ۰/۰٦۷ و ۲ عدد در بهار هر دو به فراوانی ۰/۰٦۷) نشان داد. لوکوس Cpa8 تعداد ۲ الل اختصاصی (یک عدد در تابستان به فراوانی ۰/۰٦۷ و یک عدد در بهار به فراوانی ۰/۰۸۳) نشان داد. لوکوس Cpa6 تعداد ۳ الل اختصاصی (دو عدد در تابستان هر دو به فراوانی ۰/۱٦۷ و یک عدد در بهار به فراوانی ۰/۰۸۳) نشان داد و لوکوسAsaC051 یک الل اختصاصی در تابستان به فراوانی ۰/۰٦۷ نشان داد.

در این بررسی، دامنه Ho بین دو فصل نمونه‌برداری در تمامی لوکوس‌ها صفر تا ۰/٤ و متوسط ۰/۱۵۳ بود که کمترین مقدار صفر در جایگاه Asac051 درنمونه‌های جمع‌آوری شده هر دو فصل و بیشترین مقدار ۰/٤ در جایگاه Cpa6 مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده از تابستان می‌باشد. دامنه He نیز بین ۰/۹٤٤–۰/۷۵٦ و متوسط ۰/۸۸۸ بدست آمد که کمترین مقدار در جایگاهAsac051 مربوط به نمونه‌های بهار و بیشترین آن در لوکوس Cpa8 در نمونه‌های تابستان ثبت شد (جدول ۲).

1- Allel frequency
2- Genetic identity
3- Genetic distance
4- Analysis of Molecular Variance

شکل ۱-محصول PCR وآرایش باند DNA ماهی کیلکای معمولیبا استفاده از پرایمر Cpa104

جدول ۲- مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل‌های مؤثر (Ne)، الل‌های اختصاصی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)،هتروزایگوسیتی قابل انتظار (He)، ماهی کیلکای معمولی با استفاده از ۵ جفت لوکوس میکروستلایت.

لوکوس	بهار	تابستان	میانگین
Cpa6 (الل اختصاصی)	۱	۲	
Na (Ne)	۱۹(۱٤)	۱٦(۹/۷)	۱۷ (۱۱/۸)
Ho (He)	۰/۲٦۷ (۰/۹۲۹)	۰/٤ (۰/۸۹۷)	۰/۳۳۳ (۰/۹۱۳)
Cpa8 (الل اختصاصی)	۱	۱	
Na (Ne)	۱۷ (۱۲)	۲۱(۱۷/۸)	۱۹(۱۵)
Ho (He)	۰/۲ (۰/۹۱۷)	۰/۲ (۰/۹٤٤)	۰/۲۰۰(۰/۹۳۰)
Cpa104 (الل اختصاصی)	۲	۱	
Na (Ne)	۱۷(۱۱/٦)	۱۷(۱۱/٦)	۱۷(۱۱/٦)
Ho (He)	۰/۱۳۳ (۰/۹۱٤)	۰/۱(۰/۹۱٤)	۰/۱۱۷(۰/۹۱٤)
Cpa125 (الل اختصاصی)	۳	۱	
Na (Ne)	۱۰(۷/۷)	۱٦(۱۳/۲)	۱۳(۱۰/٤۹)
Ho (He)	۰/۰٦۷ (۰/۸۷۱)	۰/۱٦۷ (۰/۹۲٤)	۰/۱۱۷(۰/۸۹۸)
AsaC051 (الل اختصاصی)	–	۱	
Na (Ne)	۵(٤)	٦(۵/۲)	۵/۵(٤/٦٦)
Ho (He)	۰ (۰/۷۵٦)	۰ (۰/۸۰۹)	۰(۰/۷۸۳)
فراوانی اللی> ۰/۰۵ (الل اختصاصی)	۳۵ (۷)	۳۳ (٦)	
Na (Ne) میانگین	۱۳/٦ (۱۰)	۱۵/۲(۱۱/۵)	۱٤/٤(۱۰/۷۲)
Ho (He) میانگین	۰/۱۳۳ (۰/۸۷۷)	۰/۱۷۳ (۰/۸۹۸)	۰/۱۵۳(۰/۸۸۸)

در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) همه لوکوس‌ها خارج از تعادل بودند ($p \leq ۰/۰۰۱$).

میزان F_{ST} براساس فراوانی اللی ۰/۰۱۸ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux و همکاران، ۲۰۰۲). اما میزان R_{ST} براساس تست AMOVA؛ ۰/۱۱۳ ($p \leq ۰/۰۱$) و میزان جریان ژنی ۱/۹٦ محاسبه شد.

جدول ۳- میزان جریان ژنی (Nm) و شاخص تمایز (F_{ST}) در هر لوکوس.

	Cap 6	Cap8	Cap104	Cap125	Asac051	میانگین (SE)
F_{ST}	۰/۰۲۵	۰/۰۱٦	۰/۰۱۳	۰/۰۲٦	۰/۰۱۰	۰/۰۱۸(۰/۰۰۳)
Nm	۹/٦٦	۱۵/۰۸	۱۹	۹/٤	۲۵/۱٤	۱۵/٦٤(۳)

فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۲)، ۰/۳٤٤ و میزان شباهت ژنتیکی ۰/۷۰۹ بدست آمد. بنابراین هر یک از فصل‌های نمونه‌برداری دارای جمعیت‌های مجزایی می‌باشد.

بحث

با مروری به آمار میزان صید کیلکا ماهیان دریای خزر در سال‌های اخیر معلوم می‌شود که حجم توده زنده این گونه‌های با ارزش به دلیل صید بی‌رویه، هجوم شانه‌دار روند نزولی داشته است. بنابراین نیاز به آگاهی از

ذخایر این ماهیان ضروری به‌نظر می‌رسد. از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت که برای ماهی شگ‌ماهی آمریکایی (*Alosa sapidissima*، Julian و Barton، ۲۰۰۷)، ماهی هرینگ اقیانوس آرام (*Clupea pallasi*، Miller و همکاران، ۲۰۰۱)، ماهی هرینگ اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*، McPherson و همکاران، ۲۰۰۱) و ماهی ساردین (*Sardina pilchardus*، Gonzalez و Zardoya، a۲۰۰۷) طراحی شده بود، بر روی DNA ژنومی ماهی کیلکای معمولی استفاده گردید. اما از کل پرایمرهای مورد استفاده فقط ۵ جفت آنها الگوی باندی پس از PCR را بر روی ژل نشان دادند. با وجود اینکه میکروستلایت‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری میکروستلایت‌هاست که محل باند شدن با پرایمرها می‌باشد (Cuiو همکاران، ۲۰۰۵). لالویی و همکاران (۱۳۸۵) جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP را در دو منطقه گیلان و مازندران مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصله و آنالیز آماری داده‌ها، تفاوت بین هاپلوتیپ‌ها معنی‌دار بود و ساختار ژنتیکی متفاوتی بین دو منطقه نمونه‌برداری مشاهده گردید. در بررسی حاضر، اگرچه جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری را در میزان هتروزایگوسیتی و تعداد اللی در هر لوکوس نشان ندادند، اما تفاوت معنی‌داری در تمایز ژنتیکی نشان دادند.

در بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی تعداد زیادی الل با فراوانی پایین دیده شد. وجود الل‌های زیاد با فراوانی پایین نشان‌دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon و همکاران، ۲۰۰٤). ممکن است علت این امر به تاریخچه دریاچه خزر باز گردد که ذخایر بزرگی از این ماهیان در سالیان گذشته در آن زندگی می‌کرده است، اما امروزه به‌دلایل مختلفی ذخایر آن به شدت کاهش یافته است (Ivanov و همکاران، ۲۰۰۰). کیلکا ماهیان تنها ماهیان دریای خزر هستند که صید صنعتی در مورد آنها اعمال می‌شود. اما امروزه این وضعیت تغییر کرده است، به‌طوری‌که آمار و ارقام نشان‌دهنده کاهش ذخایر این ماهی است. چند علت برای این کاهش صید می‌توان در نظر گرفت؛ از جمله توزیع غیر اصولی ناوگان صیادی، صدمه خوردن به جمعیت‌های جوان کیلکا، ظهور و گسترش جمعیت شانه‌داران (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۰؛ غفارزاده و هنربخش، ۱۳۸٦). از طرفی، کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده (Shen و Gong، ۲۰۰٤) و در صورت تداوم وضع موجود باید شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود.

هترزایگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به‌عنوان پاسخی به سازش‌پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است (Beardmore و همکاران، ۱۹۹۷). در بررسی حاضر، بر روی ماهی کیلکای معمولی میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده بسیار کمتر از مقدار اعلام شده توسط سایر محققین است. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه-برداری شده و در تمامی لوکوس‌ها هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار پایین-تر بود. البته این احتمال وجود دارد که از افراد خویشاوند در یک محل، نمونه‌برداری شده است. اما به‌طور معمول کاهش تنوع ژنتیکی در تمامی مولدین با گذر از تنگناهای ژنتیکی واقع می‌شود (Xia و همکاران، ۲۰۰۵). در این گونه تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی‌رویه (صید توده‌ای کیلکا ماهیان در فصل تکثیر) و حمله مهاجم شانه‌دار است که با گذشت زمان موجب کاهش الل و کاهش هتروزایگوسیتی در ذخایر می‌شود.

در بررسی حاضر بر روی ماهی کیلکای معمولی، در هر دو فصل نمونه‌برداری همه لوکوس‌ها خارج از تعادل هاردی–واینبرگ بودند ($p \leq ۰/۰۰۱$). چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی وجود الل‌های نول یا صفر باشد. در واقع وجود الل‌های نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است و بسیاری از محققین وجود الل‌های نول را در توارث میکروستلایت در شگ‌ماهیان تایید کرده‌اند (Julian و Barton، ۲۰۰۷؛ Gonzalez و Zardoya، b۲۰۰۷؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pereyra و همکاران، ۲۰۰٤). به نظر می‌رسد، مهاجرت و اختلاط جمعیت‌ها مهم‌ترین عاملی است که سبب می‌گردد تعادل هاردی – واینبرگ برقرار نباشد.

R_{ST} و F_{ST} به‌طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده (Balloux و Lugan، ۲۰۰۲). برای تفسیر F_{ST} 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 بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست. در این بررسی، میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۱۸ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux و همکاران، ۲۰۰۲) بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از یکدیگر جداست. براساس تست AMOVA میزان R_{ST} بین دو فصل نمونه‌برداری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). از این رو به نظر می‌رسد که حداقل دو جمعیت مختلف ژنتیکی در منطقه انزلی وجود داشته باشد. متوسط بودن مقدار F_{ST} به علت پلی‌مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در میکروستلایت‌ها و مهاجرت در این ماهی است که به‌طور موثری میزان F_{ST} را کاهش می‌دهند (Balloux و Lugan، ۲۰۰۲). به‌طورکلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند و در ماهیان بین مقدار F_{ST} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (Waples، ۱۹۸۷). طبق این فرضیه و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است و همچنین ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت در زیر جمعیت‌ها ایجاد می‌شود که علت وجود ساختار جمعیتی کم این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thorpe و Sol-Cave (۱۹۹٤)، میزان فاصله ژنتیکی (Nei، ۱۹۷۲) برای جدایی جمعیت‌ها را به‌طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۰۳ تا ۰/٦۱) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/٤۲۱) و نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

این بررسی دلایل و نتایج اولیه را برای وجود جمعیت‌های متمایز ماهی کیلکای معمولی و وجود تنگناهای ژنتیکی بر آنها را نشان می‌دهد و برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن ضروری است توجه و اقدام جدی صورت پذیرد. طبق واقعیت‌های موجود، هر سال میزان صید کیلکا ماهیان بر اثر صید بی‌رویه و حمله شانه‌دار مهاجم کاهش می‌یابد، ضروری است برنامه‌ریزی‌های جامع برای کنترل صید و برنامه‌ریزی جدی‌تر برای احیاء ذخایر این گونه صورت پذیرد.

منابع

۱– اسماعیلی‌ساری، ع.، ابطحی، ب.، سیف‌آبادی، ج. ، خدابنده، ص.، طلایی، ر.، درویشی، ف. و ارشاد، ه. ۱۳۸۰. تهاجم شانه‌دار *Mnemiopsisleidyi* و آینده دریای خزر. نقش مهر. ۱٤٤ ص.

۲– عبدلی، ا. و نادری، م. ۱۳۷۸. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان، ۲٤۲ ص.

۳– غفارزاده، ح. و هنربخش، ن. ۱۳۸٦. بررسی تبعات اقتصادی عدم مبارزه با گونه مهاجم شانه‌دار در خزر در سواحل ایرانی دریای خزر. علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نهم، شماره چهارم.

٤– فضلی، ح.، صیاد بورانی، م.، جانباز، ع.، نادری، م.، ابو، م.، مقیم، م.، عوفی، ف. و آذری، ع. ۱۳۸۱. بررسی آماری و بیولوژیک کیلکا ماهیان در مناطق صید تجاری. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۳ ص.

۵- لالوئی، ف.، رضوانی گیل‌کلاهی، س.، نیرانی، م. و تقوی، م. ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت‌های کیلکای معمولی (*Clupeionellaclutriventris*) در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران. سال پانزدهم. شماره ۲. صفحات ۱۱۹- ۱۲۸.

6.Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., and Alvarez, M.C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 230 , 65–80.

7.Balloux, F., and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Molecular Ecology. 11, 155-165.

8.Beardmore, J.A., Mair, G.C., and Lewis, R.I. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture Research. 28, 829– 839.

9.Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A., and Volckaert, F.A. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchuslabrax* L. Genetics. 170, 1821–1826.

10.Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yang, G.P., Gong, Q.L., and Gu, Q.Q. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus* . Aquaculture. 250 , 129– 137.

11.Gonzalez, E.G., and Zardoya, R. 2007. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). BMC Evolutionary Biology. 7, 197.

12.Gonzalez, E.G., and Zardoya, R. 2007. Isolation and characterization of polymorphicmicrosatellites for the sardine *Sardina pilchardus* (Clupeiformes: Clupeidae). Molecular Ecology Notes. 7, 519–521.

13.Ivanov, V.P. 2000. Biological resources of the Caspian Sea. 100P.

14.Julian, Sh.E, and Barton, M.L. 2007. Microsatellite DNA markers for American shad (*Alosa sapidissima*) and cross-species amplification within the family Clupeidae, Molecular Ecology Notes. 7, 805-807.

15.McPherson, A.A., O'Reilly, P.T., McParland, T.L., Jones, M.W., and Bentzen, P. 2001. Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*). Molecular Ecology Notes. 1, 31-32.

16.Miller, K.M., Laberee, K., Schulze, A.D., and Kaukinen, K.H. 2001. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasi*), Molecular Ecology Notes. 1, 131-132.

17.Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106, 283-292.

18.Peakall, R, and Smouse, P.E. 2009. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The AustralianNationalUniversity, Canberra, Australia. Available at: http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/

19.Pereyra, R.T., Saillant E., Pruett, C.L., Rexroad C.E., Rocha-Olivers A., and Gold G.R. 2004. Characterization of polymorphic microsatellites inthe Pacific sardine *Sardinops sagax sagax* (Clupeidae). Molecular Ecology Notes. 4, 739-741.

20.Sekar, M., Suresh, E., Kumar, N.S., Nayak, S.K., and Balakrishna, C. 2009. Microsatellite DNA markers a fisheries perspective Part 1: The nature of microsatellites. Genetics and Biodiversity. 27-29.

21.Shaklee, J.B., Tamaru C.S., and Waples R.S. 1982. Speciationand evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science. 36,141-157.

22.Shaw, P.W., Turan, C., Wright, J.M., O'Connell, M., and Carvalho, G.R. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*) with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. Heredity. 83,490–499.

23.Shen, X.Y. and Gong, Q.L. 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. Oceanol Limnology Sience. 35 (4), 332–341.

24.Thorpe, J.P. and Sole-Cava, A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zoologica Scripta, 23, 3-18.

25.Waples, R.S. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution. 41, 385–400.

26.Xia, J., Zheng, J., and Wang, D. 2005. Ex situ conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) as measured from microsatellites and mtDNA diversity. ICES Journal of Marine Science, 62: 1711-1716.