

## مقایسه بیوانفورماتیکی چهار ژن mtDNA مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی (*Syngnathus abaster*) در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه به منظور بررسی روابط فیلوژنتیک، تاریخ دموگرافیک و شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت

فتاح زارعی<sup>۱\*</sup>، هیوا علی پناه<sup>۲</sup>

۱- کارشناس ارشد بیوسیستماتیک جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

۲- دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

### چکیده

به منظور شناسایی مناسب‌ترین ژن در مطالعات فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت *Syngnathus abaster*، توالی‌های مربوط به چهار ژن میتوکندریایی شامل Cyt b، 12S rRNA، 16S rRNA و D-Loop مربوط به ۱۳ جمعیت از تالاب‌های غرب مدیترانه از طریق GenBank به دست آمد و برای آنالیز استفاده شد. نتایج تست‌های Neutrality برای ژن‌های 12S rRNA، 16S rRNA و D-Loop به طور معنی‌داری منفی شد که نشان‌دهنده گسترش جمعیتی یا اثر انتخاب جهت‌دار است، و از طرف دیگر نتایج آنالیز MMD برای هیچ یک از ژن‌ها، سازگار با مدل گسترش ناگهانی جمعیت نبود. آنالیز واریانس برای هر چهار ژن نشان داد که جمعیت‌های *S. abaster* از لحاظ ژنتیکی در سه گروه شامل گروه شرقی، غربی-مرکزی و جنوبی جای می‌گیرند، به طوری که برای هر چهار ژن، ۷۵٪-۶۳٪ تنوع کل مربوط به میان گروه‌ها بود. واگرایی ژنتیکی میان جمعیت‌های مرکزی (ساب‌کلاد A2) و غربی (ساب‌کلادهای A1 و A3) هنوز کم است و با هم در ارتباط هستند (کلاد A) در حالی که گروه‌های جنوبی و شرقی واگرایی بالایی را نشان داده‌اند و هر کدام داخل یک کلاد قرار گرفتند (به ترتیب B و C). جمعیت‌های مرکزی، جمعیت‌هایی موسسانند که منشأشان جمعیت‌های غربی در سواحل فرانسه و اسپانیا است. به علاوه یک سد ژنتیکی درون ناحیه شناسایی شد که سبب بلوکه شدن جریان ژنی میان غرب و شرق ناحیه مورد مطالعه می‌شد. واگرایی ژنتیکی ایجاد شده میان سه گروه جمعیتی می‌تواند به دلیل سدهای جغرافیایی میان گروه‌های جمعیتی و یا شرایط زیستگاهی از جمله دما، شوری، میزان اکسیژن محلول آب و همچنین اثر نیروهای تکاملی از جمله رانش، تنگناها، انتخاب و اثرات موسس باشد. با افزایش واگرایی احتمال ایجاد زیرگونه‌ها و در نتیجه گونه‌زایی پری‌پاتریک و ایجاد ناحیه هیبرید وجود خواهد داشت. با توجه به تنوع بالای مشاهده شده برای ناحیه D-Loop و نظر به معنی‌داری آن در هر سه آنالیز فیلوژنتیک، تاریخ دموگرافیک و ساختار ژنتیک جمعیت، می‌توان گفت که این ژن مناسب‌ترین ژن در مطالعات فیلوژنتیک، و ژنتیک جمعیت این گونه است.

واژگان کلیدی: *Syngnathus abaster* mtDNA، فیلوژنی، ژنتیک جمعیت.

## مقدمه

سوزن ماهیان<sup>۱</sup> گونه‌هایی هستند که اغلب در تالاب‌ها مشاهده می‌شوند (Casey et al., 2004; )  
 از میان سوزن ماهیان، گونه *Syngnathus abaster* (Lourie et al., 1999; Pollard, 1984) در  
 تالاب‌های واقع در کنار سواحل دریایی زیست می‌کند (Cakic et al., 2002). محدوده پراکنش آن  
 شامل تالاب‌های سواحل دریای مدیترانه، دریای سیاه و اقیانوس اطلس به سمت شمال تا جنوب  
 بیسکای<sup>۲</sup> و تا شمال فرانسه است. ویژگی بارز آن چرخه زندگی کوتاه همراه با تعداد اندکی فصول  
 تولیدمثلی و همچنین قدرت شنای اندک است، چنانچه این ویژگی پراکنش آن را محدود ساخته  
 است (Franzoi et al., 1993; Tomasini et al., 1991). به علاوه، پراکنش این گونه سوزن  
 ماهی توسط رفتار تولیدمثلی ویژه آن از جمله مراقبت نرها از تخم‌ها و فرزندان در کیسه دمی و  
 همچنین چندین مفهوم تکاملی مهم در تکامل سیستم جفت‌گیری آن محدود شده است (Jones  
 and Avise, 1997; Jones et al., 1998; Jones et al., 2000; Sanna et al., 2008). از دیگر  
 ویژگی‌های بارز آن می‌توان به فقدان پراکنش در فاز گامتی و همچنین پراکنش محدود در دوره  
 لاروی و بلوغ اشاره کرد (Mobley et al., 2011). تاکنون چندین مطالعه به منظور بازسازی روابط  
 فیلوژنتیک گونه‌های مختلف سوزن ماهیان انجام گرفته است (Casey et al., 2004; Jones et al., 2003;  
 Teske et al., 2004, 2005, 2007a, 2007b; Wilson et al., 2001, 2003).  
 چندین مطالعه نیز بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به گونه‌های مختلف آن صورت یافته  
 است (Galbusera et al., 2007; Lourie et al., 2005; Lourie and Vincent, 2004; Teske et al., 2003).

بهترین صفات تاکسونومیکی در ماهیان ویژگی‌های مورفومتریک<sup>۳</sup> و الگوهای رنگ آمیزی آن‌ها  
 است (Russell, 1990). با این وجود اندازه و مورفولوژی *S. abaster* بسیار تغییرپذیر است تا  
 جایی که بسیاری از پژوهشگران اسم‌های متفاوتی را به عنوان زیرگونه برای واریته‌های مختلف آن  
 انتخاب کرده‌اند. مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *S. abaster* به دلیل اثر وقایع گوناگون

1- Syngnathids

2- Biscay

3- Morphometric Characters

تکاملی از جمله رانش ژنتیکی<sup>۱</sup>، تنگناهای ژنتیکی<sup>۲</sup> و اثرات موسس<sup>۳</sup> مورد توجه بسیاری از پژوهشگران است (Cognetti and Maltagliati, 2000). در این مطالعات از ژن‌های مختلف اندامکی (ژنوم میتوکندری) و هسته‌ای استفاده شده است که هر یک دارای نرخ جهش<sup>۴</sup> متفاوتی هستند و این موضوع سبب شده است که نتایج این مطالعات از یکدیگر متفاوت و بعضاً متناقض باشند (Emerson et al., 2001). گام اول در بازسازی تاریخ تکاملی، شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت یک گونه و رفع مشکلات تاکسونومیک، انتخاب مناسب‌ترین ژن است. نرخ جهش در میان ژنوم‌های مختلف متفاوت است و ژن‌هایی که روند تکامل سریع‌تری دارند، تنوع ژنتیکی بالاتری را در مقایسه با ژن‌هایی که کندتر تکامل می‌یابند نشان می‌دهند. از ژن‌هایی که تکامل سریع‌تری دارند در مطالعه گروه‌های نزدیک به هم (یعنی جمعیت‌ها و زیرگونه‌ها) و از ژن‌هایی که دیرتر تکامل می‌یابند در مطالعه گروه‌های تاکسونومیک دورتر (یعنی گونه‌ها، جنس‌ها و خانواده‌ها) استفاده می‌شود (Avice, 2000). بنابراین، تفاوت در نرخ تکامل توالی DNA میان ژن‌های مختلف بدین معنی است که با انتخاب ژن‌هایی که تکامل سریع‌تر یا آهسته‌تری دارند می‌توان گروه‌های مختلف تاکسونومیک را مورد مطالعه قرار داد (Freeland et al., 2011). ژن‌های mtDNA به دلایل متعدد کاربرد بسیار زیادی در مطالعه ژنتیک جمعیت‌ها دارند (Drummond et al., 2005; Ballard and Whitlock, 2004). ویژگی‌هایی نظیر کوچکی اندازه و یکسان بودن ترتیب قرارگیری ژن‌های آن در میان اغلب گونه‌ها این امکان را فراهم می‌آورد که بتوان با استفاده از آغازگرهای عمومی طیف وسیعی از موجودات مهره‌دار و بی‌مهره را مورد مطالعه قرار داد. ثانیاً با وجود حفاظت شده بودن و عدم تغییر در ترتیب قرارگیری ژن‌ها، mtDNA در جانوران از نرخ جهش بالایی برخوردار است (Brown et al., 1982; Neckelmann et al., 1987; Wallace et al., 1997). ناحیه کنترل<sup>۵</sup> این ژنوم که بخشی از آن به عنوان D-Loop<sup>۶</sup> نیز شناخته می‌شود، در بسیاری از تاکسون‌های مطالعه شده نرخ تکاملی بالایی را نشان می‌دهد (Howell et al., 1996).

- 
- 1- Genetic Drift
  - 2- Bottlenecks
  - 3- Founder Effects
  - 4- Evolutionary Rate
  - 5- Control Region
  - 6- Displacement Loop

عدم وجود نوترکیبی در mtDNA جانوران از ویژگی‌های مثبت دیگر آن است. بدین گونه که mtDNA بدون هیچ‌گونه تغییری از مادر به فرزند منتقل می‌شود. این بدان معنی است که تبارهای میتوکندریایی آسان‌تر از تبارهای هسته‌ای قابل ردیابی هستند و به همین دلیل در مطالعات فیلوژنوگرافی تبارها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Avisé, 2000). از ویژگی‌های منفی mtDNA حساس بودن آن به تنگناهای ژنتیکی<sup>۱</sup> و رانش به دلیل تک‌والدی و هاپلوئید بودن آن است (Chen et al., 1995; Manfredi et al., 1997).

در میان ژن‌های میتوکندریایی نواحی‌ای وجود دارند که بیش‌ترین و قابل اطمینان‌ترین اطلاعات فیلوژنتیک را در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهند. از جمله ژن‌های میتوکندریایی که در مطالعات فیلوژنتیک و شناسایی ساختار ژنتیک جمعیتی سوزن ماهیان استفاده شده‌اند می‌توان به ژن‌های D-Loop، سیتوکروم b، 12S rRNA و 16S rRNA اشاره کرد. در این مطالعه به منظور شناسایی ژنی مناسب در مطالعات فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت *S. abaster* و همچنین حل مشکلات تاکسونومیکی آن، مقایسه بیوانفورماتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ژن میتوکندریایی شامل D-Loop، سیتوکروم b، 12S rRNA و 16S rRNA در بازسازی فیلوژنی، فیلوژنوگرافی و همچنین ساختار ژنتیک جمعیت با استفاده از مطالعه بر روی سیزده جمعیت سوزن ماهی *S. abaster* از مرداب‌های ناحیه غرب مدیترانه صورت گرفت.

### مواد و روش‌ها

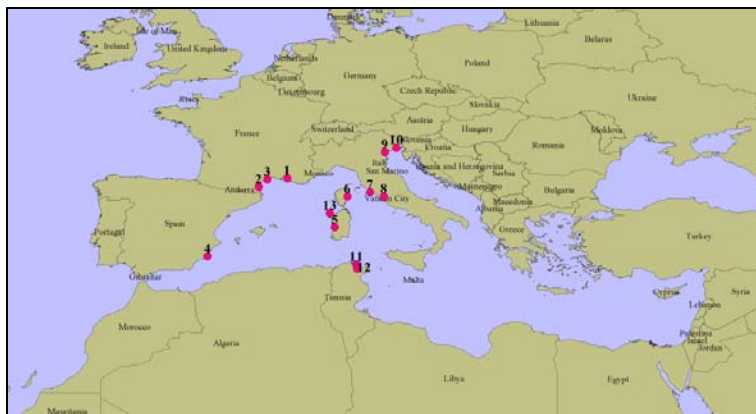
توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ژن میتوکندریایی شامل Cyt b، 12S rRNA، 16S rRNA و D-Loop مربوط به ۱۳ جمعیت *S. abaster* از تالاب‌های مختلف ناحیه غرب مدیترانه از طریق بانک ژن<sup>۲</sup> موسسه اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) به منظور انجام آنالیز به دست آمد (Demandt and Bjorklund, 2007). اطلاعات کامل مربوط به جمعیت‌های *S. abaster* مورد استفاده از تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. سپس

1- Bottlenecks  
2- GenBank

توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ژن میتوکندری ابتدا با استفاده از گزینه ClustalW در نرم‌افزار Mega ver 5.2 و سپس به صورت دستی هم‌ردیف شدند (Kumar et al., 2008).

جدول ۱: اطلاعات کامل مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه.

شماره روی نقشه	جمعیت‌ها	تعداد نمونه‌ها	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	Berre	۵	۴۳/۴۷۵	۵/۰۸۱
۲	Thau	۱۳	۴۲/۸۳۹	۲/۹۷۹
۳	Mauguio	۱۰	۴۳/۳۹۹	۳/۶۱۲
۴	Mar Menor	۱۱	۳۷/۷۳۰	-۰/۷۹۸
۵	Cabras	۱۰	۳۹/۸۶۷	۸/۵۸۹
۶	Diana	۱۰	۴۲/۱۲۸	۹/۵۳۱
۷	Orbetello	۱۱	۴۲/۴۵۱	۱۱/۲۰۲
۸	Pontinian coastal	۱۱	۴۲/۱۲۹	۱۲/۲۲۱
۹	Malamocco	۵	۴۵/۴۰۴	۱۲/۲۹۱
۱۰	Lido	۱۰	۴۵/۷۳۰	۱۳/۱۳۱
۱۱	Tunis North Lake	۵	۳۷/۱۷۴	۱۰/۱۷۸
۱۲	Salammbô Sea	۷	۳۸/۸۱۸	۱۰/۲۳۷
۱۳	Casaraccio	۱	۴۰/۹۱۰	۸/۲۲۰



شکل ۱: پراکنش جغرافیایی جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه.

### آنالیزهای آماری و فیلوژنتیک

پارامترهای اساسی تنوع ژنتیکی شامل تعداد هاپلوتایپها ( $h$ )، تنوع هاپلوتایپی ( $Hd$ )، تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ )، تعداد سایت‌های پلی‌مورف ( $s$ )، میانگین تفاوت‌های دوبه‌دو<sup>۱</sup> (MPD) با استفاده از نرم افزار Arlequin ver 3.5 محاسبه شد. به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی، تست‌های Neutrality شامل Tajima's D و Fu's Fs با استفاده از نرم‌افزار DNAsp ver 5 محاسبه و از معنی‌داری آن‌ها اطمینان حاصل شد (Fu, 1997; Librado and Rozas, 2009; Tajima, 1989). سطوح معنی‌داری برای تست‌های Tajima's D و Fu's Fs به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۲ در نظر گرفته شد. تاریخ دموگرافیک جمعیت‌های سوزن ماهی مورد مطالعه برای هر چهار ژن میتوکندریایی به وسیله آنالیز عدم تطابق<sup>۲</sup> (MMD) میان جفت هاپلوتایپها با استفاده از نرم‌افزار Arlequin ver 3.5 استنتاج شد (Excoffier and Lischer, 2010; Sherry et al., 1994). سازگاری با مدل گسترش ناگهانی جمعیت<sup>۳</sup> از معنی‌داری SSD<sup>۴</sup> شاخص ناهمواری<sup>۵</sup> با ۱۰۰۰ جایگشت ارزیابی شد (Harpending, 1994; Harpending et al., 1998). این آنالیز همچنین برای تخمین پارامترهای اساسی گسترش دموگرافیک<sup>۶</sup> شامل  $\theta_0$  و  $\theta_1$  و  $\tau$  به کار گرفته شد ( $\alpha=0/05$  و ۱۰۰۰ جایگشت). مناسب‌ترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی برای هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه برای نمونه‌های سوزن ماهی *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه با استفاده از نرم‌افزار MODELTEST محاسبه و از آن‌ها برای رسم درخت‌های فیلوژنتیک و همچنین محاسبه مقادیر فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  میان جمعیت‌ها استفاده شد (Posada and Crandall, 1998). مقادیر فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  میان جمعیت‌ها برای هر یک از چهار ژن میتوکندریایی به وسیله نرم‌افزار Arlequin ver 3.5 محاسبه و معنی‌داری این فواصل با ۱۰۰۰ جایگشت ارزیابی شد. از این مقادیر برای بررسی روابط و تمایز ژنتیکی میان نمونه‌های جمعیت‌های مختلف *S. abaster* ساکن در تالاب‌های ناحیه غرب

- 
- 1- Mean Pairwise Differences
  - 2- Mismatch Distribution
  - 3- Demographic Model Of Sudden Expansion
  - 4- Sum Of Squared Deviations (SSD)
  - 5- Raggedness Index
  - 6- Demographic Expansion

مدیترانه استفاده شد. درخت فیلوژنتیک (Maximum Likelihood (ML) در مورد هر چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Mega ver. 5.2 رسم و مورد مقایسه قرار گرفتند (Kumar et al., 2008). به منظور شناسایی گروه‌های جمعیتی همسایه دارای بیشینه تمایز ژنتیکی، از الگوریتم آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin ver 3.5 استفاده شد (Excoffier et al., 1992). درصد تنوع در زیرتقسیمات سلسله مراتبی<sup>۱</sup> مختلف شامل میان گروه‌ها<sup>۲</sup>، میان جمعیت‌ها درون گروه‌ها<sup>۳</sup> و درون جمعیت‌ها<sup>۴</sup> در گروه‌هایی که بر اساس اساس مجاورت جغرافیایی گروه‌بندی شده بودند، تخمین زده شد و بهترین ساختار جمعیتی *S. abaster* در ناحیه غرب مدیترانه برای تنوع ژنتیکی مشاهده شده در هر ژن انتخاب شد. به منظور ارزیابی همبستگی میان ماتریس فاصله ژنتیکی و ماتریس فاصله جغرافیایی جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، تست Mantel برای هر چهار ژن با استفاده از بسته نرم‌افزاری R و Vegan Library انجام شد و نتایج مربوط به هر چهار ژن میتوکندریایی تفسیر و با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند (Mantel, 1967; Oksanen et al., 2011). ماتریس فواصل جغرافیایی میان جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Geographic Matrix Generator بر حسب کیلومتر محاسبه شد (Ersts, 2011). به منظور شناسایی نواحی جغرافیایی تغییر ناگهانی فواصل ژنتیکی (سدها) درون نواحی جغرافیایی جمعیت‌های *S. abaster* در غرب مدیترانه، شبکه‌های اتصال جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری براساس Voronoi Tessellations و Delaunay Triangulations ایجاد شد. برای این منظور از الگوریتم Monmoniers Maximum Differences برای شبکه‌های Delaunary از طریق نرم‌افزار Barrier ver 2 استفاده شد (Manni and Guerard, 2004; Manni et al., 2004).

- 
- 1- Hierarchical Subdivisions
  - 2- Among Groups
  - 3- Among Populations Within Groups
  - 4- Within Populations

## نتایج

### تست‌های Neutrality

تست‌های Neutrality شامل Fu's Fs و Tajima's D به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه محاسبه و از معنی‌داری مقادیر به دست آمده اطمینان حاصل شد (جدول ۲). جمعیت‌هایی که دچار گسترش اخیر و یا افزایش معنی‌دار در اندازه جمعیت موثر<sup>۱</sup> شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار<sup>۲</sup> بر روی آن‌ها عمل کرده باشد، مقادیر D و Fs منفی و معنی‌دار تولید می‌کنند، در حالی که مقادیر مثبت و معنی‌دار D و Fs نشان دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگناهای ژنتیکی و یا اثر انتخاب متعادل‌کننده<sup>۳</sup> در طول تاریخ تکاملی جمعیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر D محاسبه شده به طور معنی‌دار تنها برای ژن 16S rRNA و مقادیر Fs به طور معنی‌دار تنها برای ژن‌های D-Loop، 12S rRNA و 16S rRNA منفی بود. الگوی متضاد مشاهده شده میان نتایج دو تست Fu's Fs و Tajima's D برای ژن‌های D-loop و 12S rRNA می‌تواند به دلیل ناهمگنی نرخ جهش در طول توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها باشد. منفی‌ترین مقدار Fs معنی‌دار مربوط به توالی ناحیه D-Loop (۲۱/۱) و مثبت‌ترین مقدار Fs معنی‌دار مربوط به ژن 12S rRNA (-۶/۶۷) است. از میان چهار ژن میتوکندری مورد مطالعه نتایج هر دو تست Neutrality به طور معنی‌دار تنها برای ژن 16S rRNA منفی شد که نشان دهنده اثر گسترش اخیر جمعیتی سوزن ماهی *S. abaster* در غرب ناحیه مدیترانه و یا اثر انتخاب جهت‌دار بر روی این ژن در طول تکامل است. از طرف دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که تست Fu's Fs برای جمعیت‌های با اندازه کوچک و تست Tajima's D برای جمعیت‌های با اندازه بزرگ کارا تر هستند (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). عدم معنی‌داری نتایج تست Tajima's D برای ژن‌های D-loop و 12S rRNA ممکن است به دلیل تعداد اندک نمونه‌های به کار گرفته شده در این آنالیز باشد، با این وجود گسترش اخیر جمعیتی توسط نتایج منفی و معنی‌دار تست Fu's Fs برای این ژن‌ها مورد تایید قرار گرفت.

1- Effective Population Size

2- Directional Selection

3- Balancing Selection



جدول ۲: نتایج مربوط به تست‌های Neutrality چهار ژن میتوکندری مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی

*S. abaster*

ژن‌ها	Tajima's D (P)*	Fu's FS (P) <sup>‡</sup>
D-Loop	-۰/۵۰۷ (۰/۷۶۸)	-۲/۱۱ (۰/۰۰۲)
Cyt b	-۰/۰۳۴ (۰/۵۸۷)	-۴/۶۴ (۰/۱۶۳)
12S rRNA	-۱/۰۰ (۰/۱۵۶)	-۶/۶۷ (۰/۰۱۲)
16S rRNA	-۱/۵۴ (۰/۰۴۱)	-۱۳/۸۸ (۰/۰۰۰)

\*P<۰/۰۵; <sup>‡</sup>P<۰/۰۲

تنوع ژنتیکی

مناسب‌ترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی برای هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه برای جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه محاسبه و از آن‌ها برای رسم درخت‌های فیلوژنتیک و محاسبه مقادیر فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  میان جفت جمعیت‌ها استفاده شد (جدول ۳). پارامترهای اساسی تنوع ژنتیکی شامل تعداد هاپلوتاایپ (h)، تنوع هاپلوتاایپی (Hd)، تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ )، تعداد سایت‌های پلی‌مورف (s) و میانگین تفاوت‌های نوکلئوتیدی دوبه‌دو (MPD) برای هر چهار ژن مورد مطالعه در جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه محاسبه شد (جدول ۴).

جدول ۳: مدل‌های جانشینی نوکلئوتیدی برای هر یک از ژن‌های میتوکندریایی مربوط به جمعیت‌های *S.*

*abaster*

ژن‌ها	مدل تکاملی	G	I
D-Loop	T92+G+I	۰/۵۳۷	۰/۷۱۰
Cyt b	K2+G	۰/۳۷۳	-
12S rRNA	K2	-	-
16S rRNA	K2+G	۰/۱۶۶	-

\*G نشانگر توزیع گاما (ناهمگنی نرخ جهش در طول توالی ژن مورد نظر) و پارامتر I نشانگر نرخ سایت‌های نوکلئوتیدی غیرمتغیر است.

جدول ۴: پارامترهای اساسی تنوع ژنتیکی مربوط به چهار ژن میتوکندریایی جمعیت‌های *S. abaster*

ژن‌ها	تعداد نمونه‌ها	S	$\pi$	h	Hd	MPD
D-Loop	۱۰۹	۶۶	۰/۰۳۱ -/+ ۰/۰۱۵	۶۰	۰/۹۶۸ -/+ ۰/۰۰۷	۱۴/۶۰۵
Cyt b	۱۰۸	۷۵	۰/۰۳۱ -/+ ۰/۰۱۵	۴۲	۰/۹۴۶ -/+ ۰/۰۰۹	۱۵/۱۳۶
12S rRNA	۱۰۹	۱۶	۰/۰۰۷ -/+ ۰/۰۰۴	۱۷	۰/۷۶۱ -/+ ۰/۰۳۰	۱/۹۵۴
16S rRNA	۱۰۹	۴۸	۰/۰۰۹ -/+ ۰/۰۰۴	۳۳	۰/۸۵۰ -/+ ۰/۰۲۰	۴/۷۲۳

S\* نشان‌گر تعداد سایت‌های نوکلئوتیدی پلی‌مورف،  $\pi$  نشان دهنده تنوع نوکلئوتیدی، h نشان دهنده تعداد هاپلوتایپ‌های مشاهده شده، Hd نشان دهنده تنوع هاپلوتایپی و MPD نشان دهنده میانگین تفاوت‌های دوبه‌دو است.

از میان چهار ژن میتوکندریایی استفاده شده، بیش‌ترین تعداد هاپلوتایپ‌ها به ترتیب مربوط به ژن D-Loop (۶۰ هاپلوتایپ) و سپس ژن Cyt b (۴۲ هاپلوتایپ) بود. کم‌ترین تعداد هاپلوتایپ در ژن 12S rRNA (۲ هاپلوتایپ) مشاهده شد. بالاترین مقدار تنوع هاپلوتایپی مربوط به ژن D-Loop (۰/۹۶۸±۰/۰۰۷) و کم‌ترین مقدار مربوط به ژن 12S rRNA (۰/۷۶۱±۰/۰۳۰) است. تنوع بالای مشاهده شده در ژن D-Loop، در مقادیر بالای تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۳۱±۰/۰۱۵) و میانگین تفاوت‌های دوبه‌دو (MPD) به خوبی آشکار است. همچنین تنوع پایین مشاهده شده در ژن 12S rRNA در مقادیر پایین تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۰۷±۰/۰۰۴) و میانگین تفاوت‌های دوبه‌دو (۱/۹۵۴) محاسبه شده مشهود است. چنانچه مشاهده شد، در بررسی سطوح تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های این گونه سوزن ماهی، ژن‌های D-Loop و Cyt b بیش‌ترین مقادیر تنوع ژنتیکی را نشان دادند و در نتیجه در بررسی سطوح تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه از شایستگی بالاتری نسبت به دو ژن 12S rRNA و 16S rRNA برخوردارند.

#### تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها

برای توالی هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه یک ماتریس فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  میان جفت جمعیت‌های *S. abaster* تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه محاسبه شد (جدول ۵ و ۶). نتایج نشان داد که بیش‌ترین معنی‌داری فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  میان جمعیت‌های *S. abaster* مورد مطالعه به ترتیب مربوط به ژن‌های D-Loop و Cyt b است، در حالی که تعداد

زیادی از فواصل ژنتیکی دو به دو  $F_{st}$  محاسبه شده با استفاده از توالی ژن‌های 12S rRNA و 16S rRNA معنی‌دار نشدند.

جدول ۵: ماتریس فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  (پایین قطر) میان جمعیت‌های *S. abaster* تالاب‌های ناحیه

غرب مدیترانه استنتاج شده با استفاده از توالی ژن **D-Loop** میتوکندری.

	Tun	Sal	Cas	Cab	Dia	Ber	Mau	Tha	Mar	Orb	Pon	Mal	Lid
<b>Tunis North</b>	./۰۰۰	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Salammbô Sea</b>	-./۰۰۵	./۰۰۰	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Casaraccio</b>	-./۵۰۸	./۵۷۵	./۰۰۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cabras</b>	-./۷۶۰	./۷۶۹	./۷۵۲	./۰۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Diana</b>	-./۷۸۹	./۷۹۴	./۸۲۱	./۶۶۱	./۰۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Berre</b>	-./۷۱۷	./۷۳۳	./۶۹۵	./۷۷۴	./۸۴۱	./۰۰۰	+	+	+	+	+	+	+
<b>Mauguio</b>	-./۷۷۵	./۷۸۳	./۷۶۲	./۶۸۴	./۸۱۴	./۴۹۴	./۰۰۰	+	+	+	+	+	+
<b>Thau</b>	-./۸۳۴	./۸۳۰	./۸۶۵	./۷۸۳	./۸۶۸	./۵۶۷	./۱۴۸	-./۰۰۰	+	+	+	+	+
<b>Mar Menor</b>	-./۷۸۶	./۷۸۷	./۹۱۸	./۷۶۵	./۸۲۹	./۸۶۳	./۷۷۶	./۸۶۱	./۰۰۰	+	+	+	+
<b>Orbetello</b>	-./۷۱۱	./۷۳۸	./۷۴۶	./۰۷۹۲	./۸۱۸	./۷۸۸	./۸۱۰	./۸۵۰	./۸۴۸	./۰۰۰	+	+	+
<b>Pontinian coast</b>	-./۸۶۴	./۸۵۴	./۰۰۰	./۹۴۴	./۹۴۲	./۹۶۵	./۹۵۳	./۹۷۳	./۹۸۰	./۳۹۰	-./۰۰۰	+	+
<b>Malamocco</b>	-./۶۸۱	./۷۱۷	./۷۵۹	./۸۲۶	./۸۵۱	./۸۱۹	./۸۴۶	./۸۹۶	./۸۹۸	./۲۷۹	./۷۷۸	./۰۰۰	-
<b>Lido</b>	-./۷۰۴	./۷۳۶	./۷۴۴	./۷۸۵	./۸۲۳	./۷۹۱	./۸۰۸	./۸۵۵	./۸۴۸	./۳۵۶	./۶۸۵	./۰۹۱	-./۰۰۰

\*علامت‌های مثبت و منفی بالای قطر به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری و عدم معنی‌داری مقادیر  $F_{st}$  است.

جدول ۶: ماتریس فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  (پایین قطر) میان جمعیت‌های *S. abaster* تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه استنتاج شده براساس توالی ژن 12S rRNA میتوکندری.

	Tun	Sal	Cas	Cab	Dia	Ber	Mau	Tha	Mar	Orb	Pon	Mal	Lid
<b>Tunis North</b>	۰/۰۰۰	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Salammbô Sea</b>	-۰/۰۴۰	۰/۰۰۰	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Casaraccio</b>	-۰/۱۷۰	۰/۱۷۴	۰/۰۰۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cabras</b>	۰/۱۵۷۰	۰/۶۴۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Diana</b>	۰/۶۵۱	۰/۷۰۰	۰/۵۱۸	۰/۷۵۹	۰/۰۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Berre</b>	۰/۳۶۹	۰/۴۸۴	-۱/۰۰۰	۰/۱۴۸	۰/۵۳۷	۰/۰۰۰	-	-	-	+	+	+	+
<b>Mauguio</b>	۰/۱۵۰۹	۰/۱۵۹۰	-۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۷۱۳	۰/۰۴۳	۰/۰۰۰	-	-	+	+	+	+
<b>Thau</b>	۰/۴۶۹	۰/۱۵۴۳	-۱/۰۰۳	-۰/۰۲۲	۰/۶۶۸	-۰/۰۰۶	-۰/۰۰۷	۰/۰۰۰	-	+	+	+	+
<b>Mar Menor</b>	۰/۴۹۶	۰/۱۵۷۳	-۰/۸۰۰	۰/۰۸۷	۰/۶۹۶	۰/۰۶۵	۰/۰۶۵	۰/۰۴۳	۰/۰۰۰	+	+	+	+
<b>Orbetello</b>	۰/۷۱۵	۰/۷۴۲	۰/۸۲۷	۰/۹۰۹	۰/۸۷۲	۰/۸۵۵	۰/۸۸۶	۰/۸۶۰	۰/۸۷۵	۰/۰۰۰	-	-	+
<b>Pontinian coast</b>	۰/۸۲۴	۰/۸۴۴	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۹۲۷	۰/۹۶۵	۰/۹۷۱	۰/۹۲۶	۰/۹۵۱	۰/۱۴۵	۰/۰۰۰	-	-
<b>Malamocco</b>	۰/۶۲۴	۰/۶۸۱	۰/۸۶۴	۰/۹۵۷	۰/۸۶۴	۰/۸۷۴	۰/۹۱۳	۰/۸۶۰	۰/۸۸۹	۰/۰۷۳	۰/۱۶۹	۰/۰۰۰	-
<b>Lido</b>	۰/۶۶۲	۰/۶۹۴	۰/۸۳۵	۰/۹۱۷	۰/۸۶۶	۰/۸۵۴	۰/۸۸۶	۰/۸۴۹	۰/۸۷۰	۰/۱۸۵	۰/۳۳۷	-۰/۱۴۶	۰/۰۰۰

\* علامت‌های مثبت و منفی بالای قطر به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری و عدم معنی‌داری مقادیر  $F_{st}$  است.

فواصل ژنتیکی به دست آمده به وسیله هر چهار ژن میتوکندریایی نشان داد که جمعیت‌های *S. abaster* مورد مطالعه درون سه گروه جمعیتی یا خوشه شامل: گروه شرقی (جمعیت‌های شرقی شامل Orbetello، Malamocco، Lido و Pontinian Coastal Lakes)، گروه غربی-مرکزی (جمعیت‌های غربی شامل Mauguio، Thau، Berre و Mar Menor) و جمعیت‌های مرکزی شامل Casaraccio، Cabras، Diana) و گروه جنوبی (جمعیت‌های جنوبی شامل Tunis North، Salammbô Sea، North Lake) جای گرفته‌اند. در درون هر یک از این سه گروه در ناحیه غرب

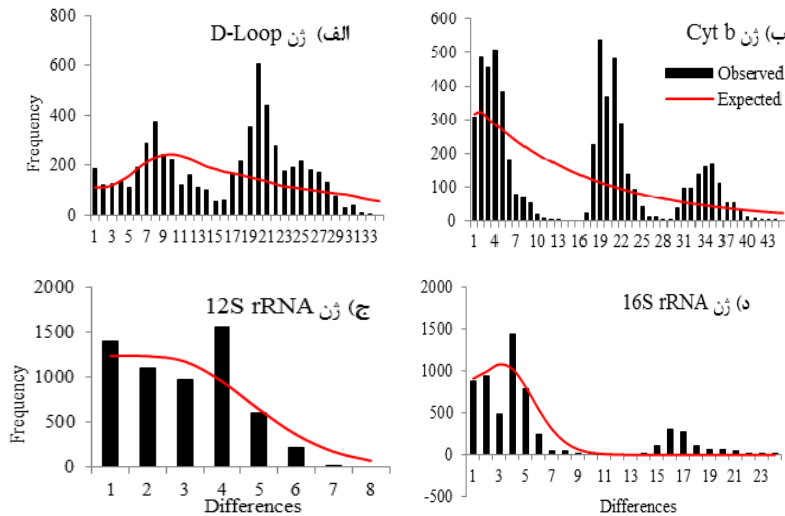
مدیترانه، جمعیت‌ها کم‌ترین سطوح تمایز ژنتیکی را با یک‌دیگر و بیش‌ترین سطوح تمایز ژنتیکی معنی‌دار را با جمعیت‌های درون سایر گروه‌ها نشان دادند. براساس معنی‌داری تعداد بیش‌تری از فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  محاسبه شده برای جفت جمعیت‌های *S. abaster* مورد مطالعه با استفاده از ژن D-Loop می‌توان نتیجه گرفت که این ژن بیش‌ترین کارایی را در نمایش روابط و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* دارد. از طرف دیگر تعداد زیادی از فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  محاسبه شده میان جفت جمعیت‌ها با استفاده از ژن‌های 12S rRNA و 16S rRNA معنی‌دار نشد که نشان دهنده عدم کارایی کافی این دو ژن در نمایش تمایز و روابط ژنتیکی میان جمعیت‌های سوزن ماهی مورد مطالعه در ناحیه غرب مدیترانه است. واگرایی ژنتیکی ایجاد شده میان سه گروه جمعیتی شامل گروه شرقی، غربی- مرکزی و جنوبی در صورت تداوم به تدریج سبب ایجاد سه زیرگونه می‌شود و اگر این واگرایی ژنتیکی به حدی برسد که اثر خود را بر روی ژن‌های تولیدمثلی بگذارد، سبب گونه‌زایی از نوع پری‌پاتریک خواهد شد. از طرف دیگر، در صورت وقوع گونه‌زایی احتمال ایجاد ناحیه هیبرید میان گونه‌های ایجاد شده نیز وجود خواهد داشت.

#### آنالیز توزیع عدم تطابق<sup>۱</sup> (MMD)

منحنی‌های توزیع تفاوت‌های نوکلوتیدی میان جفت هاپلوتایپ‌های مشاهده شده (MMD) با استفاده از توالی‌های چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه برای جمعیت‌های *S. abaster* تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه رسم شد (شکل ۲). زمانی که جمعیت‌ها نسبت به گذشته دچار گسترش اخیر در اندازه جمعیت موثر شده باشند، منحنی‌های توزیع MMD نرمال<sup>۲</sup> ایجاد می‌کنند، درحالی‌که اگر جمعیت‌ها در موازنه جهش- رانش (موازنه دموگرافیک) و یا به عبارتی در اندازه جمعیت موثر ثابت و بدون تغییر باقی مانده باشند، منحنی‌های توزیع MMD به صورت چندموجی و یا به عبارتی غیرنرمال<sup>۳</sup> خواهند بود. به علاوه، سازگاری با مدل گسترش ناگهانی جمعیت<sup>۴</sup> از SSD<sup>۱</sup> و

- 
- 1- Mismatch Distribution
  - 2- Unimodal Distribution
  - 3- Multimodal Distribution
  - 4- Model Of Sudden Expansion

شاخص Raggedness با ۱۰۰۰ جایگشت ارزیابی شد (جدول ۳). شاخص Raggedness زمانی که جمعیت‌ها برای مدت زمان طولانی، در اندازه جمعیت موثر ثابت (موازنه جهش-رانس) و یا به عبارت دیگر در موازنه دموگرافیک باشند، مقادیر بزرگ‌تر و معنی‌دار تولید می‌کند و در صورت سازگاری توزیع MMD مشاهده شده با مدل گسترش ناگهانی جمعیت (نرمال بودن توزیع MMD) مقادیر غیرمعنی‌دار تولید می‌کند.



شکل ۲: منحنی‌های توزیع تفاوت‌های نوکلئوتیدی میان جفت هاپلوتایپ‌ها (MMD) برای جمعیت‌های *S. abaster* تالاب‌های ناحیه غربی مدیترانه استنتاج شده از توالی چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه. ستون‌ها نشانگر توزیع مشاهده شده و خط منحنی نشان دهنده توزیع مورد انتظار تحت مدل گسترش ناگهانی جمعیت است. محور X نشان دهنده تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی میان جفت هاپلوتایپ‌ها و محور Y نشان‌گر فرکانس تقریبی آن است. (الف) منحنی توزیع تفاوت‌های نوکلئوتیدی میان جفت هاپلوتایپ‌ها برای ژن D-Loop، (ب) ژن Cyt b، (ج) ژن 12S rRNA و (د) ژن 16S rRNA.

نتایج آنالیز MMD برای هر چهار ژن میتوکندری مورد مطالعه برای جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، سازگار با مدل گسترش ناگهانی جمعیت نبود و هیچ یک از

منحنی‌ها نرمال نبودند (شکل ۲). در این آنالیز، تغییر در اندازه جمعیت موثر *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، توسط محاسبه دو مقدار متوالی از پارامتر  $\theta$  شامل  $\theta_0=2N_0\mu$  و  $\theta_1=2N_1\mu$  که به ترتیب  $N_0$  و  $N_1$  نشانگر اندازه جمعیت موثر در زمان گذشته و حال و  $\mu$  نشان دهنده نرخ جهش در توالی هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه است، محاسبه شد (جدول ۷). به علاوه، در این آنالیز پارامتر  $\tau$  نیز برای هر چهار ژن میتوکندریایی محاسبه شد. از مقادیر این پارامتر می‌توان با استفاده از معادله  $\tau=2\mu t$  که  $\mu$  نماینده نرخ جهش در توالی هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه و  $t$  نشانگر زمان از آغاز گسترش جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه است، به منظور تخمین زمان از آغاز گسترش جمعیتی این گونه، استفاده کرد. با این وجود، به دلیل عدم دسترسی به نرخ‌های جهش کالیبره شده و استاندارد برای ژن‌های میتوکندری در سوزن ماهی *S. abaster*، در این مطالعه، زمان از آغاز گسترش جمعیت تخمین زده نشد.

جدول ۷: پارامترهای اساسی گسترش دموگرافیک مربوط به توالی ژن‌های میتوکندری در جمعیت‌های *S. abaster*

ژن‌ها	میانگین عدم تطابق <sup>۱</sup>	$\theta_0^{\text{‡}}$	$\theta_1^{\text{‡}}$	$\tau^{\text{€}}$	SSD (P)*	Raggedness index (P)*
D-Loop	۱۴/۷۸۸	۱۶/۶۶۷	۵۲/۱۱۱	۵/۹	۰/۰۱۵ (۰/۱۰۵)	۰/۰۰۶ (۰/۲۹۰)
Cyt b	۱۴/۴۲۵	۱۵/۸۴۱	۹۹۹۹۹	۰/۰۷۴	۰/۰۲۶ (۰/۶۱۲)	۰/۰۱۰ (۰/۶۱۲)
12S rRNA	۱/۹۳۳	۰/۰۰۰	۴/۲۵۲	۳/۰۰۸	۰/۰۱۴ (۰/۳۵۵)	۰/۰۴۵ (۰/۵۶۸)
16S rRNA	۴/۶۴۱	۰/۰۰۳	۶/۱۴۲	۳/۵	۰/۰۲۵ (۰/۱۳۴)	۰/۰۵۶ (۰/۲۶۳)

\*P<۰/۰۵

<sup>‡</sup> تغییر در اندازه جمعیت موثر سوزن ماهی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، با محاسبه دو مقدار متوالی از  $\theta$  شامل  $\theta_0=2N_0\mu$  و  $\theta_1=2N_1\mu$  که به ترتیب نشانگر اندازه موثر جمعیت در گذشته و حال است.

<sup>€</sup> از پارامتر  $\tau$  (تاو) به منظور تخمین زمان از آغاز گسترش جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه استفاده می‌شود. از معنی‌داری SSD و شاخص Raggedness به منظور ارزیابی سازگاری توزیع مشاهده شده با توزیع تحت مدل گسترش ناکهانی جمعیت استفاده شد.

### ساختار ژنتیک جمعیت

به منظور شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *S. abaster* برای هر چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، از الگوریتم آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) استفاده شد (جدول ۸). الگوی گروه‌بندی جمعیتی مورد استفاده برای تنوع ژنتیکی مشاهده شده براساس جغرافیا شامل سه گروه شرقی (جمعیت‌های شرقی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شامل Orbetello، Lido، Malamocco، و Pontinian coastal lakes)، گروه غربی- مرکزی (جمعیت‌های غربی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شامل Berre، Thau، Manguio، و Mar Menor) و جمعیت‌های مرکزی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شامل Casaraccio، Cabras و Diana) و گروه جنوبی (جمعیت‌های شرقی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شامل Tunis North Lake و Salammbô Sea) است. گونه‌ای از ساختار ژنتیکی قوی برخوردار است که درصد واریانس میان گروه‌های جمعیتی<sup>۱</sup> در آن بیش‌تر از درصد واریانس میان جمعیت‌های درون گروهی<sup>۲</sup> باشد. جمعیت‌های مربوط به *S. abaster* به تغییرات محیطی- اقلیمی حساس هستند و اندازه جمعیت موثر آن‌ها به مرور زمان در حال کاهش است. بنابراین، در این گونه از زیستگاه‌های ناپایدار (تالاب‌ها)، مکانیسم‌هایی مانند رانش ژنی، تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و اثرات موسس بر روی ساختار ژنتیک جمعیت این گونه تاثیر گذاشته و سبب کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و از طرف دیگر افزایش تنوع ژنتیکی میان جمعیتی و همچنین میان گروهی می‌شود. نتایج نشان داد که جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غربی مدیترانه از ساختار ژنتیک ویژه‌ای برخوردارند. برای تمام ژن‌های مورد مطالعه ۶۳-۸۳٪ از تنوع کل مربوط به میان گروه‌ها بود که برای هر چهار ژن بسیار بالاتر از درصد واریانس درون گروهی بود. بنابراین، هر چهار ژن در بررسی ساختار ژنتیک جمعیت این گونه در غرب مدیترانه الگوی گروه‌بندی جمعیت‌ها (شامل سه گروه شرقی، غربی- مرکزی و جنوبی) برای تنوع ژنتیکی مشاهده شده را تایید کردند. از میان نتایج مربوط به چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه برحسب درصد واریانس میان گروهی بیش‌تر و واریانس درون گروهی کم‌تر به ترتیب برای ژن‌های Cyt b و 16S rRNA می‌توان نتیجه گرفت

1- Among Groups Of Populations Variance

2- Among Populations Within Groups Variance



که از میان چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه این دو ژن از شایستگی بالاتری در بررسی ساختار ژنتیک جمعیت *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه برخوردار هستند. روابط ژنتیکی نزدیک جمعیت‌های درون هر یک از این سه گروه جغرافیایی ممکن است به دلیل اشتقاق یافتن از یک جمعیت اجدادی مشترک و یا اثرات مربوط به نیروهای تکاملی از جمله جریان ژنی به دلیل فواصل جغرافیایی اندک میان جمعیت‌های درون هر گروه باشد.

جدول ۸: آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای چهار ژن میتوکندری مربوط به جمعیت‌های *S.*

*abaster*

ژن‌ها	منبع تنوع			شاخص‌های تثبیت <sup>۱</sup>		
	درصد واریانس میان گروه‌ها	درصد واریانس درون جمعیت‌های درون گروه‌ها	درصد واریانس درون جمعیت‌ها	$\Phi_{SC} (P)^*$	$\Phi_{ST} (P)^*$	$\Phi_{CT} (P)^*$
12S	۷۶/۳۳	۸/۰۹	۱۵/۵۸	۰/۳۴۱ (۰/۰۰)	۰/۸۴۴ (۰/۰۰)	۰/۷۶۳ (۰/۰۰)
16S	۷۸/۰۹	۴/۲۵	۱۷/۶۶	۰/۱۹۴ (۰/۰۰)	۰/۸۲۳ (۰/۰۰)	۰/۷۸۰ (۰/۰۰)
Cyt b	۸۳/۵۳	۵/۷۴	۱۰/۷۳	۰/۳۴۸ (۰/۰۰)	۰/۸۹۲ (۰/۰۰)	۰/۸۳۵ (۰/۰۰)
D-Loop	۶۳/۹۳	۲۰/۶۳	۱۵/۴۵	۰/۵۷۱ (۰/۰۰)	۰/۸۴۵ (۰/۰۰)	۰/۶۳۹ (۰/۰۰)

\*P < ۰/۰۵

الگوی گروه‌بندی جمعیتی مورد استفاده به منظور طبقه‌بندی جمعیت‌های سوزن ماهی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه برای تنوع ژنتیکی مشاهده شده براساس جغرافیا شامل سه گروه: گروه شرقی (جمعیت‌های شرقی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شامل Orbetello, Malamocco, Lido و Pontinian coastal lakes)، گروه غربی- مرکزی (جمعیت‌های غربی شامل Manguio, Mar Menor و Berre, Thau و جمعیت‌های مرکزی شامل Casaraccio, Cabras و Diana)، و گروه جنوبی (جمعیت‌های جنوبی شامل Tunis North Lake و Salammbô Sea) است.

**تست Mantel**

ماتریس فاصله جغرافیایی میان جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* ناحیه غرب مدیترانه برحسب کیلومتر محاسبه شد. همبستگی میان ماتریس فاصله جغرافیایی و ماتریس‌های فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{ST}$  محاسبه شده برای هر یک از چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه توسط تست Mantel و با استفاده از بسته نرم‌افزاری R و Vegan Library انجام و معنی‌داری آن‌ها

توسط ۱۰۰۰ جایگشت ارزیابی شد (جدول ۹). نتایج این تست نشان داد که برای هر چهار ژن میتوکندریایی همبستگی شدیداً مثبت معنی‌داری میان ماتریس فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  و ماتریس فاصله جغرافیایی میان جفت جمعیت‌ها برقرار است ( $P < 0.05$ ;  $r = 0.721 - 0.664$ ) و می‌توان این گونه بیان کرد که با افزایش فواصل جغرافیایی میان جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* مورد مطالعه در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، فواصل ژنتیکی میان آن‌ها نیز به صورت معنی‌دار و شدید افزایش خواهد یافت و جمعیت‌های با بیش‌ترین فواصل ژنتیکی در موقعیت‌های جغرافیایی دورتری نیز قرار گرفته‌اند. از میان مقادیر Mantel محاسبه شده برای هر یک از چهار ژن میتوکندریایی بیش‌ترین مقدار این شاخص مربوط به ژن D-Loop و سپس Cyt b و کم‌ترین مقدار مربوط به ژن 12S rRNA بود. مقدار این شاخص میان +۱ و -۱ متغیر است. مقادیر مثبت‌تر و معنی‌دار شاخص Mantel نشان دهنده همبستگی مثبت (مستقیم) شدیدتر و مقادیر منفی‌تر و معنی‌دار آن نشان دهنده همبستگی منفی (معکوس) شدیدتر میان دو ماتریس فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها است. بنابراین، با توجه به مقادیر بالا و معنی‌دار شاخص Mantel برای ژن‌های D-Loop و Cyt b در این مطالعه می‌توان این‌گونه بیان کرد که مناسب‌ترین ژن‌های میتوکندریایی در بررسی همبستگی میان فواصل ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه ژن D-Loop و سپس Cyt b است.

جدول ۹: نتایج تست Mantel برای چهار ژن میتوکندریایی مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster*

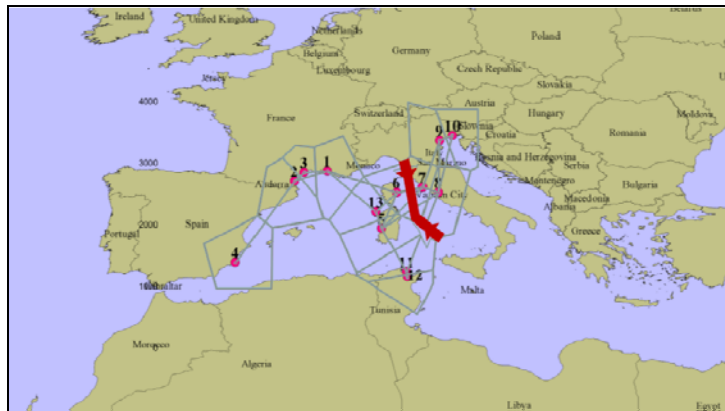
ژن‌ها	$r^*$ (P)*	همبستگی
D-Loop	۰/۷۲۱ (۰/۰۰۱)	مثبت و شدید
Cyt b	۰/۶۷۳ (۰/۰۰۱)	مثبت و شدید
12S rRNA	۰/۴۴۸ (۰/۰۰۱)	مثبت و شدید
16S rRNA	۰/۶۶۴ (۰/۰۰۱)	مثبت و شدید

\* $P < ۰/۰۰۵$

$r^*$  نشان دهنده مقدار شاخص Mantel می‌باشد.

### سدهای ژنتیکی میان جمعیت‌ها

به منظور شناسایی سدهای منع‌کننده جریان ژنی میان جمعیت‌های سوزن ماهی حاضر در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، شبکه‌های اتصال جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری براساس Voronoi Tessellations و Delaunay Triangulations ایجاد شد. سپس از الگوریتم Monmoniers Maximum Differences برای شبکه‌های Delaunay و با استفاده از مقادیر فاصله ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  برای توالی هر یک از چهار ژن مورد مطالعه استفاده شد (شکل ۳). نتایج این آنالیز برای هر چهار ژن مورد مطالعه به طور موافق یک سد ژنتیکی را در درون ناحیه غرب مدیترانه شناسایی کرد، چنان که جمعیت‌های شرقی (Lido, Malamocco, Orbetello) و Pontinian coastal lakes) را از سایر جمعیت‌ها در مرکز، غرب و جنوب ناحیه غرب مدیترانه جدا می‌کرد. این سد در مجاورت و در طول خط ساحلی کشور ایتالیا قرار گرفته و مانع از ایجاد جریان ژنی میان جمعیت‌های شرقی و سایر جمعیت‌ها می‌شود. افزایش واگرایی میان جمعیت‌های شرقی و سایر جمعیت‌ها در طول زمان به تدریج سبب ایجاد زیرگونه‌ها و درنهایت گونه‌زایی از نوع پری‌پاتریک<sup>۱</sup> خواهد شد.



شکل ۳: سد ژنتیکی میان جمعیت‌های شرقی و سایر جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه. سد جغرافیایی با خط ضخیم قرمز نشان داده شده است.

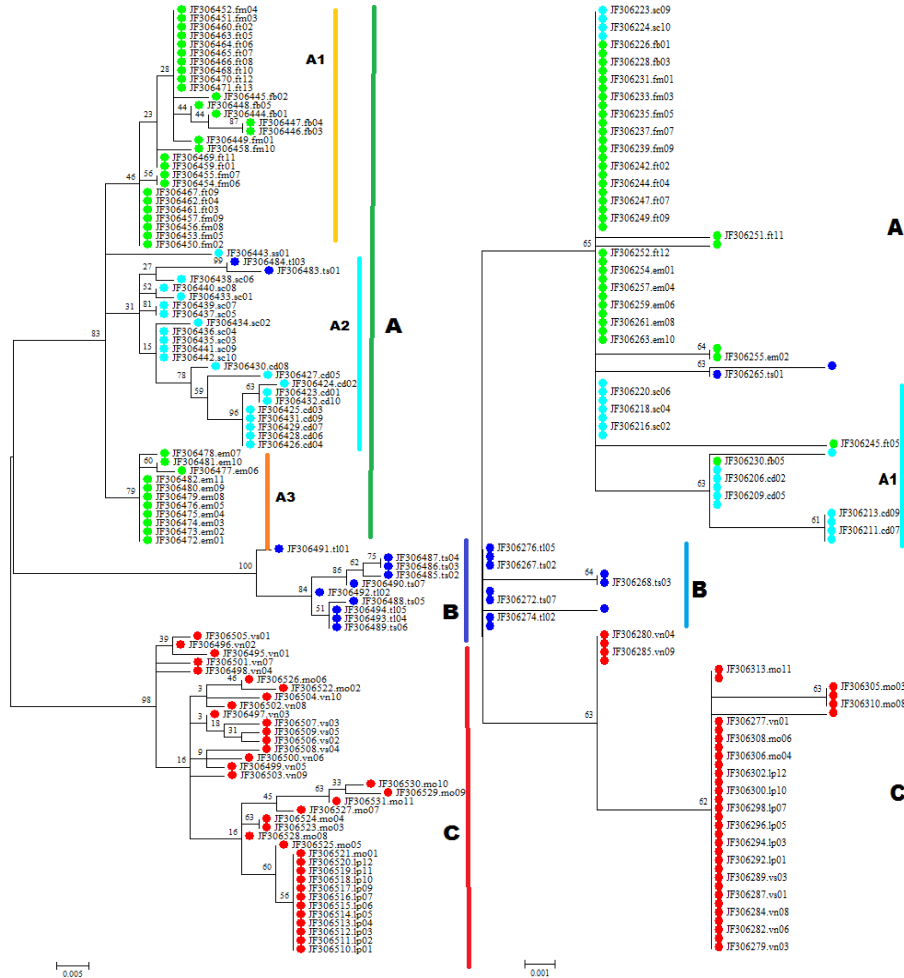
۱- مدلی از گونه‌زایی آلوپاتریک که با دخالت موانع جغرافیایی ایجاد می‌شود

### روابط فیلوژنتیک

به منظور نمایش روابط فیلوژنتیک نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های *S. abaster*، درخت‌های Maximum Likelihood (ML) برای هر چهار ژن میتوکندریایی رسم شد (شکل ۴). چنانچه نتایج بالا نشان داد که جمعیت‌های سوزن ماهی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه از لحاظ ژنتیکی به سه گروه غربی- مرکزی، شرقی و جنوبی واگرایی پیدا کرده اند، انتظار می‌رود که این ساختار ژنتیکی در درخت فیلوژنتیک ML نیز مشاهده شود. نتایج درخت فیلوژنتیک ML در هر چهار ژن میتوکندریایی مورد مطالعه برای نمونه‌های سوزن ماهی ناحیه غرب مدیترانه شامل 12S rRNA، Cyt b، 16S rRNA و D-Loop سه کلاد هم‌ارز و توپولوژی مشابهی را نشان دادند شامل گروه غربی- مرکزی (کلاد A)، گروه شرقی (کلاد C) و گروه جنوبی (کلاد B). در کلاد A نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های غربی- مرکزی شامل جمعیت‌های Diana, Berre, Thau, Manguio, Casaraccio, Cabras و Mar Menor، در کلاد C نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های شرقی شامل Pontinian coastal lakes, Orbetello, Lido, Malamocco و در کلاد B نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های جنوبی شامل Tunis North Lake و Salammbô Sea قرار گرفتند. روابط ژنتیکی نزدیک جمعیت‌های درون هر یک از این سه گروه بیانگر منشأ مشترک و یا وجود جریان ژنی میان آن‌ها است. تنوع ژنتیکی بالای ژن D-Loop در تعداد بیش‌تر شاخه‌های درخت ML (شکل ۴: درخت سمت چپ) و تنوع پایین‌تر ژن 12S rRNA در تعداد اندک شاخه‌های درخت فیلوژنتیک (شکل ۴: درخت سمت راست) به خوبی نمایان است. نتایج مربوط به درخت‌های ML حاصل از توالی دو ژن D-Loop و Cyt b ساختار ژنتیکی مشاهده شده در آنالیزهای قبل را با مقادیر Bootstrap بالا (اعداد روی نقاط انشعاب) تایید کرد. در این دو درخت حتی جمعیت‌های درون هر گروه نیز در درون ساب‌کلادهای مجزا قرار گرفتند که بیان‌گر دقت بالای این دو ژن در نشان دادن روابط ژنتیکی جمعیت‌های درون هر گروه و در نتیجه مطالعات ژنتیک جمعیت است. از طرف دیگر درخت‌های ML حاصل از توالی ژن‌های 12S و 16S rRNA در ایجاد تمایز میان جمعیت‌های درون هر یک از دو گروه شرقی و غربی- مرکزی ناتوان است که عدم کارایی لازم این دو ژن در مطالعات ژنتیک جمعیتی را نشان می‌دهد. به علاوه مقادیر Bootstrap به دست آمده در

نقاط انشعاب بسیار پایین بوده، در نتیجه تفسیر تکاملی از روی این دو درخت قابل اطمینان نیست. در درخت حاصل از توالی ژن D-Loop رابطه ژنتیکی نزدیک جمعیت‌های درون گروه غربی (ساب‌کلادهای A1 و A3) و مرکزی (ساب‌کلاد A2) به خوبی آشکار است چنانچه، نمونه‌های هر دو گروه در یک کلاد بزرگ (کلاد A) قرار گرفته‌اند و واگرایی ژنتیکی این دو گروه از یک‌دیگر کامل نشده است، در حالی که جمعیت‌های دو گروه دیگر شامل گروه شرقی (کلاد C) و جنوبی (کلاد B) هر کدام داخل یک کلاد بزرگ مجزا قرار گرفته‌اند که نشان دهنده واگرایی ژنتیکی بالا و یا منشأ جدای آن‌ها از هم است. در صورتی که واگرایی ژنتیکی به حدی برسد که سبب تاثیر بر روی ژن‌های تولیدمثلی شود گونه‌زایی در این دو گروه اتفاق خواهد افتاد و دو گونه مجزا ایجاد خواهد شد. روابط ژنتیکی نزدیک میان جمعیت‌های مرکزی و جمعیت‌های غربی ناحیه غرب مدیترانه ممکن است به دلیل جریان ژنی و یا منشأ مشترک آن‌ها و یا شرایط زیستگاهی مشابه باشد. سناریویی که در مورد روابط ژنتیکی نزدیک جمعیت‌های مرکزی و غربی می‌توان تعریف کرد به این صورت است که جمعیت‌های مرکزی (ساب‌کلاد A2)، جمعیت‌های موسسی هستند که از جمعیت‌های غربی (ساب‌کلادهای A1 و A3) در سواحل جنوبی فرانسه و اسپانیا جدا شده‌اند و به تالاب‌های مرکزی ناحیه غرب مدیترانه به قسمت غربی جزایر ساردینین مهاجرت کرده‌اند. این جدایی از جمعیت اصلی سبب واگرایی ژنتیکی آن‌ها شده است اما این جمعیت‌های مرکزی هنوز واگرایی زیادی از جمعیت منشأ خود (جمعیت‌های غربی) پیدا نکرده‌اند و هنوز در یک کلاد مشترک قرار دارند. به علاوه، غربی‌ترین جمعیت یعنی Mar Menor به دلیل فاصله جغرافیایی زیاد از سایر جمعیت‌های غربی (شامل Pontinian, Orbetello, Malamocco, Lido) و شرایط متفاوت زیستگاهی، واگرایی ژنتیکی پیدا کرده، در یک ساب‌کلاد مجزا (ساب‌کلاد A3) قرار گرفته است که در میان آن‌ها نمونه‌های مربوط به جمعیت مرکزی (ساب‌کلاد A2) قرار گرفته‌اند. در کل، قرار گرفتن این سه ساب‌کلاد (که شامل جمعیت‌های مرکزی و غربی است) در یک کلاد بزرگ و مشترک نشان دهنده منشأ مشترک جمعیت‌های مرکزی و غربی و یا وجود جریان ژنی بالا میان آن‌ها است. تمامی روابط ژنتیکی بیان شده از روی درخت ML رسم شده برای ژن D-Loop در مورد درخت ML رسم شده براساس توالی ژن Cyt b نیز صدق می‌کند و در درخت ML آن نیز سه کلاد با مقادیر Bootstrap بالا مشاهده می‌شود. به علاوه، دو نمونه مربوط به جمعیت‌های

جنوبی (کلاد B) شامل JF306484 و JF306483 در ساب کلاد مربوط به نمونه‌های جمعیت‌های مرکزی (ساب کلاد A2) قرار گرفته‌اند. حضور این دو نمونه در ساب کلاد جمعیت‌های مرکزی نشان دهنده جریان ژنی از جمعیت‌های مرکزی به سمت جمعیت‌های جنوبی ناحیه غرب مدیترانه است. مقادیر Bootstrap بالا در نقاط انشعاب درخت فیلوژنتیک و تنوع بالا باعث می‌شود که ژن D-Loop بهترین کارایی را در بررسی روابط فیلوژنتیک جمعیت‌های این گونه از سوزن ماهی داشته باشد.



شکل ۴: درخت‌های ML نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه رسم شده براساس توالی ژن‌های: D-Loop (چپ) و 12S rRNA (راست). دایر قرمز یا کلاد C نشان دهنده جمعیت‌های شرقی شامل Pontinian (پسوند lp در انتهای نمونه‌ها)، Orbetello (پسوند mo در انتهای نمونه‌ها)، Malamocco (پسوند vs در انتهای نمونه‌ها) و جمعیت Lido (پسوند vn در انتهای نمونه‌ها)، دایر آبی تیره یا کلاد B نشان دهنده جمعیت‌های جنوبی شامل جمعیت‌های Tunis (پسوند tl در انتهای نمونه‌ها) و Salammbô (پسوند ts در انتهای نمونه‌ها)، دایر آبی روشن یا ساب‌کلاد A2 نشان دهنده جمعیت‌های مرکزی شامل جمعیت‌های Casaraccio (پسوند ss در انتهای نمونه‌ها)، Cabras (پسوند sc در انتهای نمونه‌ها) و Diana (دارای پسوند cd در انتهای نمونه‌ها) و دایر سبز رنگ یا

ساب‌کلادهای A1 و A3 نشان دهنده جمعیت‌های غربی شامل جمعیت‌های *Mauguio* (پسوند fm در انتهای نمونه‌ها)، *Thau* (پسوند ft در انتهای نمونه‌ها)، *Berre* (پسوند fb در انتهای نمونه‌ها) و *Mar Menor* (دارای پسوند em در انتهای نمونه‌ها) هستند. اعداد روی نقاط انشعاب نشان دهنده مقدار *Bootstrap* هر گره است.

### بحث و نتیجه‌گیری

از ویژگی‌های بارز تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه جدایی جغرافیایی آن‌ها از یک‌دیگر و درجات بالای تمایز است. سدها و فواصل جغرافیایی میان جمعیت‌های *S. abaster* به طور چشم‌گیری سبب واگرایی ژنتیکی میان جمعیت‌های آن شده است (Baus et al., 2005; Bilton et al., 2002). به علاوه، جمعیت‌های مربوط به این گونه سوزن ماهی به تغییرات محیطی- اقلیمی حساس بوده، اندازه جمعیت موثر آن‌ها با گذشت زمان در حال کاهش است. بنابراین در این گونه از زیستگاه‌های ناپایدار (تالاب‌ها)، مکانیسم‌هایی مانند رانش ژنی، تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی<sup>۱</sup> و اثرات موسس بر روی ساختار ژنتیک جمعیتی این گونه‌ها تاثیر می‌گذارد و سبب کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و از طرف دیگر افزایش تنوع ژنتیکی میان جمعیتی و همچنین میان گروهی می‌شود (Bilton et al., 2002; Cognetti and Maltagliati, 2000; Ferrito et al., 1999; Kirchoff et al., 2003). بنابراین در این گونه از زیستگاه‌های جدا از هم، به دلیل شرایط ویژه هر زیستگاه و نیروهای تکاملی‌ای که در هر یک از این‌ها حاکم است، جمعیت‌های *S. abaster* فواصل ژنتیکی معنی‌داری را نشان می‌دهند و همچنین احتمال وقوع گونه‌زایی نیز وجود خواهد داشت (Orr, 1995).

چنانچه اشاره شد از ژن‌هایی که تکامل سریع‌تری دارند در مطالعه گروه‌های نزدیک به هم (جمعیت‌ها و زیرگونه‌ها) و از ژن‌هایی که دیرتر تکامل می‌یابند برای مطالعه گروه‌های تاکسونومیک دورتر (گونه‌ها، جنس‌ها و خانواده‌ها) استفاده می‌شوند (Avisé, 2000). بنابراین به منظور شناسایی مناسب‌ترین ژن از میان ژن‌های میتوکندریایی به کار رفته در مطالعات فیلوژنتیک، فیلوژنوگرافیک و ساختار ژنتیک جمعیت گونه *S. abaster* و همچنین حل مشکلات تاکسونومیک آن در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه، مقایسه بیوانفورماتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ژن میتوکندریایی شامل D-Loop، Cyt b، 12S rRNA و 16S rRNA مربوط به سیزده

1- Natural Selection



جمعیت سوزن ماهی *S. abaster* از مرداب‌های ناحیه غرب مدیترانه انجام شد. عوامل محیطی از جمله دما، شوری آب، میزان اکسیژن محلول، عدم پیوستگی جغرافیایی (Gaggiotti et al., 2009) و همچنین اثرات مربوط به نیروهای تکاملی از جمله جریان ژنی، رانش ژنی، تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و اثرات موسس جمعیتی از جمله فاکتورهای هستند که بر روی خزانه mtDNA جمعیت‌های این گونه سوزن ماهی تاثیر می‌گذارند و سبب ایجاد واگرایی ژنتیکی یا شباهت ژنتیکی میان جمعیت‌ها و در نتیجه ایجاد زیرگونه‌ها و گونه‌ها می‌شوند (Crandall et al., 1997; Felsenstein, 2000). نتایج این مطالعه با استفاده از هر چهار ژن میتوکندریایی نشان داد که جمعیت‌های سوزن ماهی تالاب‌های ناحیه غربی مدیترانه دارای ساختار ژنتیکی ویژه هستند، چنانچه از نظر ژنتیکی به سه گروه جمعیتی واگرایی پیدا کرده‌اند. این گروه‌ها شامل گروه غربی-مرکزی (شامل جمعیت‌های غربی و مرکزی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه) گروه جنوبی (شامل جمعیت‌های جنوبی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه) و گروه شرقی (شامل جمعیت‌های شرقی تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه) هستند. این ساختار ژنتیکی ویژه توسط نتایج مربوط به فواصل ژنتیکی دوبه‌دوی  $F_{st}$  محاسبه شده میان جمعیت‌ها، درخت فیلولزنتیک ML و نتایج مربوط به به آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) تایید شد. کلاذ مربوط به جمعیت‌های گروه غربی-مرکزی (کلاذ A) در درخت فیلولزنتیک ML حاصل از توالی ژن D-Loop نشان داد که واگرایی ژنتیکی میان جمعیت‌های مرکزی (ساب‌کلاذ A2) از جمعیت‌های غربی (ساب‌کلاذهای A1 و A3) هنوز کامل نشده است و هنوز خزانه mtDNA آن‌ها با هم در ارتباط است، در حالی که خزانه mtDNA جمعیت‌های جنوبی (کلاذ B) و جمعیت‌های شرقی (کلاذ C) کاملاً واگرا شده است و در صورت تداوم واگرایی ژنتیکی در طی تکامل سبب ایجاد زیرگونه‌ها و در نتیجه وقوع گونه‌زایی از نوع پری‌پاتریک خواهد شد. به علاوه، می‌توان گفت که جمعیت‌های مرکزی در واقع جمعیت‌های موسسی‌اند که از جمعیت‌های غربی در تالاب‌های موجود در سواحل جنوبی فرانسه و اسپانیا جدا شده، به جزایر ساردینین مهاجرت کرده‌اند که توجیه کننده شباهت ژنتیکی جمعیت‌های این دو گروه با هم است. دو فاکتور اصلی که در شکل‌گیری ساختار ژنتیک جمعیتی گونه‌های مختلف ماهیان دخالت دارند عبارتند از: قدرت پراکنش گونه (Ward, 2006; Bilton et al., 2002) و ویژگی‌های جغرافیایی منطقه پراکنش از جمله موانع طبیعی (Riginos et al., 2003; Billot et al., 2003).

and Nachman, 2001). با توجه به قدرت پراکنش محدود سوزن ماهی *S. abaster* در دوره جوانی و بلوغ (Mobley et al., 2011) ساختار ژنتیک خاص ایجاد شده در منطقه غرب مدیترانه به دلیل جدایی جغرافیایی و یا به عبارت دیگر وجود خشکی (ایتالیا و جزایر ساردینین<sup>۱</sup>) میان جمعیت‌های شرقی و سایر جمعیت‌ها است، چنانچه کشور ایتالیا و جزایر ساردینین به عنوان سدی در برابر جریان ژنی میان جمعیت‌های شرقی و سایر جمعیت‌های سوزن ماهی *S. abaster* در مرکز، غرب و جنوب ناحیه غرب مدیترانه عمل کرده، سبب واگرایی ژنتیکی شده است. نتایج مربوط به هر چهار ژن استفاده شده برای الگوریتم Monmoniers Maximum Differences (Monmonier, 1973) به منظور شناسایی سدها میان گروه‌های جمعیتی نشان داد که کشور ایتالیا به عنوان یک سد جغرافیایی میان جمعیت‌های شرقی در یک طرف ایتالیا و سایر جمعیت‌ها در سمت دیگر ایتالیا عمل کرده، سبب عدم جریان ژنی و در نتیجه واگرایی ژنتیکی شده است. با توجه به این نتایج می‌توان سناریوی مربوط به تاریخ تکاملی جمعیت‌های این گونه سوزن ماهی در ناحیه غرب مدیترانه را به صورت زیر بیان کرد: جمعیت منشأ سوزن ماهی در ناحیه غرب مدیترانه شروع به گسترش و مهاجرت جمعیتی کرد و توسط اثرات موسس جمعیتی سبب کلونیزاسیون سایر تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه شد. شرایط محیطی متفاوت تالاب‌های غربی، شرقی، مرکزی و جنوبی مثل دما، میزان شوری و اکسیژن محلول در آب در همکاری با موانع جغرافیایی و نیروهای تکاملی (Templeton, 1981) از جمله رانش ژنی، جریان ژنی، تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و اثرات موسس جمعیتی سبب واگرایی ژنتیکی جمعیت‌ها شد چنانچه خزانه mtDNA این جمعیت‌ها به سه دسته شامل خزانه جمعیت‌های غربی- مرکزی، خزانه جمعیت‌های جنوبی و خزانه جمعیت‌های شرقی واگرایی پیدا کرد. این واگرایی ژنتیکی به مرور زمان سبب شده که هر یک از این گروه‌های جمعیتی مسیر تکاملی ویژه خود را طی کند. در صورت ادامه واگرایی ژنتیکی میان این سه گروه جمعیتی به تدریج زیرگونه‌ها ایجاد می‌شود و زمانی که واگرایی ژنتیکی به حدی برسد که تاثیر خود را بر روی ژن‌های تولیدمثلی بگذارد سبب وقوع گونه‌زایی شده، گونه‌های پری‌پاتریک ایجاد خواهند شد (Gavrilets et al., 2000) نتایج تست‌های Neutrality برای ژن‌های RNA ریبوزومی 12S، 16S و ناحیه D-Loop معنی‌دار و منفی شد که نشان دهنده اثر

گسترش اخیر جمعیتی یا انتخاب طبیعی جهت‌دار است (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). بیش‌ترین معنی‌داری مقادیر فاصله ژنتیکی دوه‌دوی  $F_{st}$  میان جفت جمعیت‌ها به ترتیب مربوط به ژن‌های D-Loop و سپس Cyt b است. از طرف دیگر نتایج تست Mantel با استفاده از هر چهار ژن مورد مطالعه به طور موافق نشان داد که با افزایش فواصل جغرافیایی میان جمعیت‌ها، فواصل ژنتیکی دوه‌دوی  $F_{st}$  میان جمعیت‌های *S. abaster* نیز به طور مستقیم و شدید افزایش خواهد یافت و بنابراین سطوح شباهت‌های ژنتیکی میان جمعیت‌های *S. abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه به طور معنی‌دار به میزان فواصل جغرافیایی میان آن‌ها بستگی دارد. از میان مقادیر Mantel به دست آمده برای این چهار ژن میتوکندریایی، بیش‌ترین مقدار معنی‌دار مربوط به ژن D-Loop بود که نشان دهنده کارایی بهتر این ژن در ارزیابی همبستگی فواصل ژنتیکی و جغرافیایی است. نتایج این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین تنوع ژنتیکی مشاهده شده مربوط به ژن D-loop و بنابراین مناسب‌ترین ژن جهت مطالعه ساختار ژنتیک جمعیت‌های این گونه سوزن ماهی است. کارایی و بازده بالای ژن D-Loop در بازسازی تاریخ تکاملی و ساختار ژنتیک جمعیت تعداد زیادی از گونه‌های دیگر نیز مشاهده شده است (Ashton and Queiroz, 2001; Cheng et al., 2011; Harrison, 1989; Hofmann et al., 1997; Li et al., 2012; Lu et al., 1997). با توجه به تنوع بالای مشاهده شده برای ناحیه D-Loop و نظر به معنی‌دار بودن نتایج آن در هر سه آنالیز فیلوژنتیک، تاریخ دموگرافیک و ساختار ژنتیک جمعیت، در این مطالعه بیوانفورماتیکی، می‌توان گفت که این ژن مناسب‌ترین گزینه در زمینه مطالعات فیلوژنتیک، تاریخ دموگرافیک و ژنتیک جمعیت گونه *S. abaster* است.

## منابع

- Ashton K.G. and Queiroz A.d. 2001.** Molecular systematics of the western Rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-Loop In phylogenetic studies of snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(2): 176-189.
- Avise J.C. 2000.** *Phylogeography: the history and formation of species.* Harvard University Press.
- Ballard J.W.O. and Whitlock M.C. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4): 729-744.
- Baus E., Darrock D. and Bruford M. 2005.** Gene-flow patterns in Atlantic and Mediterranean populations of the Lusitanian sea star *Asterina gibbosa*. *Molecular Ecology*, 14(11): 3373-3382.
- Billot C., Engel C.R., Rousvoal S., Kloareg B. and Valero M. 2003.** current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the english channel. *Marine Ecology Progress Series*, 253: 111-121.
- Bilton D., Paula J. and Bishop J. 2002.** Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(6): 937-952.
- Brown W.M., Prager E.M., Wang A. and Wilson A.C. 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4): 225-239.
- Cakic P., Lenhardt M., Mićković D., Sekulic N. and Budakov L. 2002.** Biometric analysis of syngnathus abastev populations. *Journal of fish biology*, 60(6): 1562-1569.
- Casey S.P., Hall H.J., Stanley H.F. and Vincent A.C. 2004.** The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2): 261-272.
- Chen X., Prosser R., Simonetti S., Sadlock J., Jagiello G. and Schon E.A. 1995.** Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *American Journal of Human Genetics*, 57(2): 239-247.
- Cheng Y., Jin X., Shi G., Wang R. and Xu T. 2011.** Genetic diversity and population structure of miiuy croaker populations in East China Sea revealed

- by the mitochondrial DNA control region sequence. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4): 718-724.
- Cognetti G. and Maltagliati F. 2000.** Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin*, 40(1): 7-14.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R., Mace G.M. and Wayne R.K. 2000.** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(7): 290-295.
- Demandt M. and Bjorklund M. 2007.** Loss of genetic variability in reintroduced roach (*Rutilus rutilus*) populations. *Journal of Fish Biology*, 70: 255-261.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B. and Pybus O.G. 2005.** Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5): 1185-1192.
- Emerson B.C., Paradis E. and Thebaud C. 2001.** Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(12): 707-716.
- Ersts P. 2011.** Geographic distance matrix generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation.
- Excoffier L. and Lischer H.E. 2010.** Arlequin Suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- Excoffier L., Smouse P.E. and Quattro J.M. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- Felsenstein J. 1997.** Population differentiation and evolutionary processes. Genetic effects of straying of non-native hatchery fish into natural populations. University of Washington.
- Ferrito V., Maltagliati F., Mauceri A., Adorno A. and Tigano C. 2003.** Morphological and genetic variation in four Italian populations of *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Italian Journal of Zoology*, 70(2): 115-121.
- Franzoi P., Maccagnani R., Rossi R. and Ceccherelli V. 1993.** Life cycles and feeding habits of *Syngnathus taenionotus* and *S. abaster* (Pisces, Syngnathidae) in a brackish bay of the Po River Delta (Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*. Oldendorf, 97(1): 71-81.

- Freeland J.R., Petersen S.D. and Kirk H. 2011.** Molecular Ecology. Wiley.
- Fu Y.-X. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915-925.
- Gaggiotti O.E., Bekkevold D., Jorgensen H.B., Foll M., Carvalho G.R., Andre C. and Ruzzante D.E. 2009.** Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. *Evolution*, 63(11): 2939-2951.
- Galbusera P.H., Gillemot S., Jouk P., Teske P.R., Hellemans B. and Volckaert F.A. 2007.** Isolation Of Microsatellite Markers For The Endangered Knysna Seahorse *Hippocampus capensis* And Their Use In The Detection Of A Genetic Bottleneck. *Molecular Ecology Notes*, 7(4): 638-640.
- Gavrilets S., Li H. and Vose M.D. 2000.** Patterns Of Parapatric Speciation. *Evolution*, 54(4): 1126-1134.
- Harpending H. 1994.** Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*: 66(4) 591-600.
- Harpending H.C., Batzer M.A., Gurven M., Jorde L.B., Rogers A.R. and Sherry S.T. 1998.** Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4): 1961-1967.
- Harrison R.G. 1989.** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(1): 6-11.
- Hofmann S., Jaksch M., Bezold R., Mertens S., Aholt S., Paprotta A. and Gerbitz K.D. 1997.** Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Human Molecular Genetics*, 6(11): 1835-1846.
- Howell N., Kubacka I. and Mackey D.A. 1996.** How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *American Journal of Human Genetics*, 59(3): 501-509.
- Jones A. and Avise J. 1997.** Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology*, 6(3): 203-213.

- Jones A.G., Kvarnemo C., Moore G.I., Simmons L.W. and Avise J.C. 1998.** Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western Australian seahorse *Hippocampus angustus*. *Molecular Ecology*, 7(11): 1497-1505.
- Jones A.G., Moore G.I., Kvarnemo C., Walker D. and Avise J.C. 2003.** Sympatric speciation as a consequence of male pregnancy in seahorses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11): 6598-6603.
- Jones A.G., Rosenqvist G., Berglund A., Arnold S.J. and Avise J.C. 2000.** The Bateman gradient and the cause of sexual selection in a sex-role-reversed pipefish. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1444): 677-680.
- Kirchhoff S., Sevigny J. and Couillard C. 1999.** Genetic and meristic variations in the mummichog *Fundulus heteroclitus*, living in polluted and reference estuaries. *Marine Environmental Research*, 47(3): 261-283.
- Kumar S., Nei M., Dudley J. and Tamura K. 2008.** MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 299-306.
- Li H., Xu T., Cheng Y., Sun D. and Wang R. 2012.** Genetic diversity of *Setipinna taty* (Engraulidae) populations from the China Sea based on mitochondrial DNA control region sequences. *Genetics and Molecular Research*, 11(2): 1230-1237.
- Librado P. and Rozas J. 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lourie S., Green D. and Vincent A. 2005.** Dispersal, habitat differences, and comparative phylogeography of Southeast Asian seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*). *Molecular Ecology*, 14(4): 1073-1094.
- Lourie S.A., Pritchard J.C., Casey S.P., Truong S.K., Hall H.J. and Vincent A.C. 1999.** The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (Family Syngnathidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 66(2): 231-256.
- Lourie S.A. and Vincent A.C. 2004.** A marine fish follows Wallace's line: the phylogeography of the three-spot seahorse (*Hippocampus trimaculatus*, Syngnathidae, Teleostei) in Southeast Asia. *Journal of Biogeography*, 31(12): 1975-1985.
- Lu G., Li S. and Bernatchez L. 1997.** Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within

- the Yangtze River, China. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(1): 47-58.
- Manfredi G., Thyagarajan D., Papadopoulou L.C., Pallotti F. and Schon E.A. 1997.** The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *The American Journal of Human Genetics*, 61(4): 953-960.
- Manni F. and Guerard E. 2004.** Barrier version 2.2. Manual of the User. Population genetics team, Museum of Mankind (Musée de l'Homme): Paris.
- Manni F., Guerard E. and Heyer E. 2004.** Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76(2): 173-190.
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2): 209-220.
- Mobley K.B., Small C. and Jones A. 2011.** The genetics and genomics of Syngnathidae: pipefishes, seahorses and seadragons. *Journal of Fish Biology*, 78(6): 1624-1646.
- Monmonier M.S. 1973.** Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, 5(3): 245-261.
- Neckelmann N., Li K., Wade R.P., Shuster R. and Wallace D.C. 1987.** cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21): 7580-7584.
- Oksanen J., Blanchet G.F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R., Simpson G., Solymos P., Stevens M. and Wagner H. 2011.** *Vegan: Community Ecology Package*. R Package ver. 2.0-2.
- Orr H.A. 1995.** The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics*, 139(4): 1805-1813.
- Pollard D. 1984.** A review of ecological studies on seagrass—fish communities, with particular reference to recent studies in Australia. *Aquatic Botany*, 18(1): 3-42.
- Posada D. and Crandall K.A. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.



- Ramos-Onsins S.E. and Rozas J. 2002.** Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Riginos C. and Nachman M. 2001.** Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*, 10(6): 1439-1453.
- Russell B.C. 1990.** FAO Species Catalogue. v. 12: nemipterid fishes of the world (Threadfin breems, Whiptail breems, Monocle breems, Dwarf monocle breems and Coral breems) family Nemipteridae. An annotated and illustrated catalogue of Nemipterid species known to date.
- Sanna D., Addis A., Biagi F., Motzo C., Carcupino M. and Francalacci P. 2008.** mtDNA control region and D-HPLC Analysis: a method to evaluate the mating system in Syngnathidae (Teleostei). *Marine Biology*, 153(3): 269-275.
- Sherry S.T., Rogers A.R., Harpending H., Soodyall H., Jenkins T. and Stoneking M. 1994.** Mismatch distributions of mtDNA reveal recent human population expansions. *Human Biology*: 66(5): 761-775.
- Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585-595.
- Templeton A.R. 1981.** Mechanisms of speciation--a population genetic approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12: 23-48.
- Teske P., Cherry M. and Matthee C. 2003.** Population genetics of the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*. *Molecular Ecology*, 12(7): 1703-1715.
- Teske P.R., Cherry M.I. and Matthee C.A. 2004.** The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2): 273-286.
- Teske P.R., Hamilton H., Matthee C.A. and Barker N.P. 2007a.** Signatures of seaway closures and founder dispersal in the phylogeny of a circumglobally distributed seahorse lineage. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 138.
- Teske P.R., Hamilton H., Palsboll P.J., Choo C.K., Gabr H., Lourie S.A., Santos M., Sreepada A., Cherry M.I. and Matthee C.A. 2005.** Molecular

evidence for long-distance colonization in an Indo-Pacific seahorse lineage. *Marine Ecology Progress Series*, 286: 249-260.

- Teske P.R., Lourie S.A., Matthee C.A. and Green D.M. 2007b.** *Hippocampus queenslandicus* Horne, 2001—a new seahorse species or yet another synonym? *Australian Journal of Zoology*, 55(3): 139-145.
- Tomasini J., Quignard J., Capape C. and Bouchereau J. 1991.** Facteurs du succes reproductif de *Syngnathus abaster* Risso, 1826 (Pisces, Teleostei, Syngnathidae) en milieu lagunaire mediterraneen (lagune de Mauguio, France). *Acta Oecologica*, 12.
- Wallace D., Brown M. and Lott M. 1997.** Mitochondrial genetics. Emory and Rimoin's principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone.
- Ward R.D. 2006.** The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, 80(1): 9-18.
- Wilson A.B., Ahnesjo I., Vincent A.C. and Meyer A. 2003.** The dynamics of male brooding, mating patterns, and sex roles in pipefishes and seahorses (Family Syngnathidae). *Evolution*, 57(6): 1374-1386.
- Wilson A.B., Vincent A., Ahnesjo I. and Meyer A. 2001.** Male pregnancy in seahorses and pipefishes (Family Syngnathidae): rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *Journal of Heredity*, 92(2): 159-166.

## Comparative bioinformatics of four mtDNA genes in phylogenetic, demographic history and population genetic studies of *Syngnathus abaster* in west Mediterranean lagoons

Fatah Zarei<sup>1\*</sup>, Hiva Alipanah<sup>2</sup>

1- M.Sc. in Animal Biosystematics, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2- Ph.D. Student in Animal Physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Received: December 2013

Accepted: January 2014

### Abstract

For detecting the best gene in phylogenetic and population genetic studies of *S. abaster*, nucleotide sequences of four mitochondrial genes including Cyt b, 12S and 16S rRNA and D-Loop related to 13 *Syngnathus abaster* populations in west Mediterranean lagoons were obtained via GenBank and used for analysis. Neutrality tests results significantly were negative for 16S rRNA, 12S rRNA and D-Loop, indicating the effect of recent expansion or directional selection during evolution, whereas the result for MMD analyze wasn't consistent to the demographic model of sudden expansion. Analyze of molecular variance for each genes show that: the *S. abaster* populations of west Mediterranean lagoons genetically diverged in three groups including eastern group, western-central group and southern group, as 63-84% of observed diversity belongs to the among groups. Genetic divergence among the central(A2) and western(A1 and A3) populations still wasn't much and together placed in a common clade(A), whereas divergence levels of eastern and southern populations are very high and each group of populations placed in a separate clade(respectively C and B). Central populations are founder populations which those origins placed in western lagoons in the southern coasts of France and Spain. In addition, a genetic barrier was identified which block the gene flow among eastern and western parts of west Mediterranean lagoons. High divergence among the three clades may be due to geographic discontinuity, habitat conditions such as different temperature, salinity and levels of unsolved oxygen and also effects of evolutionary forces including genetic drift, bottlenecks, natural selection and founder effects. Increasing divergence among three clades during evolution cause creation of subspecies, ripatric speciations and hybrid zone. According to the high levels of genetic diversity and also significant results for phylogenetic, demographic and genetic structure analysis for D-Loop, we can say that this gene is the best one in studies of phylogenetic and genetic structure of *S. abaster*.

**Keywords:** *mtDNA*, *Syngnathus abaster*, *Phylogeny*, *Population genetic*

\*Corresponding Author: fataahzareei@gmail.com