



مقایسه جمعیت‌های مهاجر ماهی سفید (*Rutilus frisii*) بهاره و پاییزه به تالاب انزلی با استفاده از روش توالی‌یابی ژن Cyt-b

دانیال گروهی^{۱*}، سید حامد موسوی ثابت^۲

DOI: 10.22124/japb.2025.29480.1560

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۴

چکیده

در این پژوهش، ساختار جمعیت‌های ماهی سفید (*Rutilus frisii*) بهاره و پاییزه مهاجر به تالاب انزلی با استفاده از روش توالی‌یابی ژن Cyt-b مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های مورد نیاز (۶۰ نمونه از هر جمعیت) در سال‌های ۹۸ و ۹۹ صید شدند. پس از استخراج DNA از بافت نرم باله سینه‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و توالی‌یابی نمونه‌ها انجام شد. بر اساس نتایج، تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت ماهیان بهاره و پاییزه از لحاظ ژنتیکی مشاهده شد ($P < 0.05$). فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۳۸۸ و شباهت ژنتیکی ۰/۶۱۲ به دست آمد. نتایج مطالعات مولکولی نشان داد که سیتوزین و گوانین به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر میانگین ترکیب نوکلئوتیدی در دو جمعیت را داشتند. محاسبه نرخ جایگزینی انتقالی به تقاطعی بیانگر بیشتر بودن نرخ جهش‌های انتقالی به تقاطعی با در بر گرفتن ۶۷/۲۲ درصد از جهش‌ها بود. در مجموع، می‌توان گفت که ژن Cyt-b به خوبی تفاوت بین دو فرم بهاره و پاییزه را نشان داده است. با این حال، مطالعه مولکولی جمعیت‌های مورد نظر با وجود فاصله زمانی، شباهت‌های ژنتیکی قابل توجهی را در سطح گونه نشان داد و نمی‌توان این جمعیت‌ها را از نظر ژنتیکی دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای دانست.

واژگان کلیدی: ماهی سفید دریای خزر، Cyt-b، توالی ژن، جمعیت‌های مهاجر.

۱- کارشناس ارشد علوم و مهندسی شیلات، مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی شهید انصاری، سازمان شیلات ایران، رشت، ایران.

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران.

* نویسنده مسئول: d.gorouhi@gmail.com

مقدمه

تخم‌ریزی می‌کند (Berg, 1948; Sattari et al., 2019; Moezzi et al., 2022). ماهی سفید دریای خزر دارای دو نژاد یا فرم مهاجر پاییزه و مهاجر بهاره است. مهاجر پاییزه در اوایل و یا اواسط فصل پاییز به رودخانه‌هایی با بستر گیاهی (و به طور عمده تالاب انزلی) مهاجرت کرده و زمستان را در آنجا سپری می‌کند، با گرم شدن آب در اواخر زمستان، تخم‌ریزی می‌کند و بلافاصله به دریا بر می‌گردد. بخش عمده‌ای از جمعیت ماهی سفید را نژاد مهاجر بهاره تشکیل می‌دهد که این ماهیان از نیمه اسفند ماه در قالب گله‌های مهاجر به رودخانه‌هایی با بستر سنگی مهاجرت می‌کنند و این عمل در رودخانه‌های واقع در نواحی شرق استان گیلان تا اواخر فروردین و در رودخانه‌های منطقه غرب گیلان (تالش) تا آخر اردیبهشت ماه ادامه می‌یابد (Aminian Fatideh et al., 2017). تاکنون، افزایش ذخایر ماهیان سفید صرفاً با تکثیر و رهاسازی تیپ بهاره انجام شده و تیپ پاییزه مورد توجه چندانی نبوده است. اگرچه تکثیر مصنوعی توانسته ذخایر ماهی سفید را از نظر کمی افزایش دهد، اما از نظر کیفی تأثیرات سوئی در پی داشته است. مهم‌ترین اثر سوء کیفی کاهش رشد سالانه ماهی است که این امر

تالاب انزلی با مساحت تقریبی ۱۵ هزار هکتار در سواحل جنوبی دریای خزر استان گیلان واقع شده است و دارای چهار حوضه غربی، شرقی، مرکزی و جنوب غربی است (De Grave and Ghane, 2006; Alemi Safaval et al., 2024). این تالاب از جمله مهم‌ترین اکوسیستم‌های تالابی کشور به حساب می‌آید و دارای یکی از متنوع‌ترین زیستگاه‌های طبیعی برای انواع جانوران از جمله ۷۲ گونه ماهی از ۲۱ خانواده است (Mahdian et al., 2023; Salehi et al., 2024). یکی از این گونه ماهیان، ماهی سفید است.

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus frisii* یکی از مهم‌ترین ماهیان اقتصادی دریای خزر و همچنین یکی از مهم‌ترین اهداف شیلاتی و ماهیگیری در این اکوسیستم و تالاب انزلی است (Kavan et al., 2009; Safari, 2016; Moezzi et al., 2022). این گونه بیش از ۷۰ درصد از کل ماهیان استخوانی صید شده توسط صیادان در سواحل جنوبی دریای خزر را به خود اختصاص داده است (Esmaeili et al., 2014; Ghasemi et al., 2014). ماهی سفید یک گونه رودکوچ است و در رودخانه‌های مرتبط با دریای خزر در ماه‌های اسفند و فروردین

ساختار ذخایر توسعه یافت. روش‌های مبتنی بر DNA، امروزه بهترین روش‌هایی هستند که برای تمایز بین موجودات بسیار نزدیک به هم انتخاب می‌شوند (Adams and Hutchings, 2003).

نگرانی در مورد کاهش ذخایر ژنتیکی ماهیان بخشی از نگرانی جهانی بزرگ‌تر در رابطه با کاهش ذخایر ژنتیکی زیست‌کره است. از این رو، مطالعات مربوط به ژنتیک مولکولی ماهیان به ویژه ماهیان سفید، به منظور مدیریت پایدار ذخایر شیلاتی امری اجتناب‌ناپذیر است (Park and Moran, 1995). آگاهی از میزان ذخایر ژنی و تنوع ژنتیکی در بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است، به طوری که بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Karami Nasab et al., 2015). با توجه به این که ماهیان سفید بهاره و پاییزه بسیار به یکدیگر شبیه هستند و این یک عامل محدود کننده برای پاسخگویی به پرسش‌ها در مورد روابط آنها در سطح درون‌گونه‌ای (Within Group)، Intraspecific است، اما از آنجا که این شاخص‌ها بسیار حساس هستند و دستکاری در

به دلیل عدم به‌گزینی مولدین است. علاوه بر آن ترکیب جمعیتی فرم بهاره و پاییزه بهم ریخته و تقریباً می‌توان گفت، جمعیت اصلی فعلی ماهی سفید در دریای خزر متعلق به جمعیت بهاره است که بیش از ۹۸ درصد ذخایر آن را تشکیل می‌دهند (Nematdoost Haqi, 2005). از این رو به منظور مدیریت منطقی و کارآمد شیلاتی، شناسایی ساختار ذخیره‌ای گونه‌ای از ماهی که مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، اهمیت به‌سزایی دارد، چرا که هر ذخیره باید به طور جداگانه‌ای مدیریت شود تا بهره‌برداری از آن گونه در حد بهینه‌ای صورت گیرد (Salini et al., 2004; Erguden and Turan, 2005).

در گذشته ارزیابی ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها تنها با استفاده از صفات ریخت‌سنجی (مورفومتریک) و شمارشی (مریستیک) صورت می‌گرفت، اما نتایج به دست آمده از مطالعاتی که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام شده است در چندین مورد بحث برانگیز بودند. همچنین با توجه به حساسیت بالای این صفات و اثرات منفی دستکاری در نشانه‌گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه‌گذاری به زمان جمع‌آوری آنها، علم استفاده از ویژگی‌های مولکولی برای شناسایی

(*Rutilus frisii*) فرم بهاره و پاییزه (در مجموع ۱۲۰ قطعه) در سال‌های ۹۸ تا ۹۹ در کانال کشتیرانی منتهی به تالاب انزلی (از پل غازیان تا دهانه موج‌شکن قدیم) با استفاده از تور نایلونی میکروفیلامنت (لاکش) صید و جمع‌آوری شدند. به منظور استخراج DNA از هر نمونه ماهی حدود ۵ گرم از بافت نرم باله سینه‌ای جدا و در الکل ۹۶ درصد تثبیت شد. سپس نمونه‌ها برای انجام مطالعات مولکولی، به آزمایشگاه مولکولی دانشگاه گیلان انتقال یافت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت استخراج (Biobasic، کره جنوبی) طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد، به این صورت که حدود ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم از بافت ماهی که در الکل تثبیت شده بود، با هاون استریل شده له شد و سپس اجازه داده شد تا الکل موجود از آن خارج شود. ۸۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به همراه ۷۰ میکرولیتر بافر فعال‌کننده به نمونه باله ماهی درون هاون اضافه شد. پس از همگن شدن نمونه و بافر، محتویات درون هاون به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. محتویات میکروتیوب به خوبی مخلوط شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۵۵ درجه

فرایند نشانه‌گذاری می‌تواند پیامدهای نامطلوبی بر سلامت ماهیان داشته باشد و با توجه به این که داده‌های به دست آمده از نشانه‌گذاری تنها در زمان جمع‌آوری قابل تفسیر هستند، استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان رویکردی نوین برای شناسایی ساختار ذخایر گسترش یافته است. در واقع هر گونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNA که از والدین به نتاج قابل انتقال باشد به عنوان نشانگر مولکولی به کار گرفته می‌شود (Mirbakhsh, 2016). در نتیجه، در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای DNA افزایش چشمگیری پیدا کرده است.

با توجه به اهمیت شناخت دقیق و تفکیک ماهیان سفید مهاجر بهاره و پاییزه در امر بازسازی ذخائر این گونه ارزشمند و همچنین عدم اطلاعات کافی در مورد مقایسه تفاوت‌های ژنتیکی این دو جمعیت، مطالعه حاضر با هدف مقایسه و بررسی ژنتیکی دو جمعیت ماهیان سفید بهاره و پاییزه تالاب انزلی با استفاده توالی‌یابی ژن سیتوکروم b (Cyt-b) میتوکندریایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب ایستگاه و نمونه‌برداری

تعداد ۶۰ نمونه از هر جمعیت ماهی سفید

اضافه شد و برای جلوگیری از حل شدن DNA در الکل و به منظور رسوب آن، ۲۰ دقیقه با شرایط ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس الکل داخل میکروتیوب‌ها دور ریخته شد. پس از آن میکروتیوب‌ها روی دستمال کاغذی تمیز به صورت وارونه قرار گرفت تا الکل آن کامل خشک شود. به میکروتیوب‌های حاوی DNA عاری از الکل، ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه شد. سپس DNA ژنومی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (Hillis et al., 1996).

تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از طیف‌سنجی توسط دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer, D30, Eppendorf, آلمان) سنجیده شد. بدین منظور، ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده در دستگاه قرار گرفت و مقدار جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت DNA استخراجی بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر که بیانگر کمیت آن است از ضرب عدد به دست آمده از ضریب جذب ۲۶۰ نانومتر

سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. در این مدت محتویات میکروتیوب هر یک ساعت یک بار به خوبی با حرکات دست مخلوط شد تا مواد جامد در آن به صورت معلق و محلول درآید. پس از گذشت زمان یاد شده، میکروتیوب‌ها که حاوی مایع غلیظی بودند، از حمام آب گرم خارج شده تا در دمای اتاق با محیط هم دما شوند. ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به ویال اضافه و به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده شد تا از دو فازشدگی سوسپانسیون جلوگیری شود. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (ALC PK 131, Labexchange, آلمان) شدند. سپس فاز بالایی که حاوی DNA بود با استفاده از سمپلر به آرامی به میکروتیوب استریل شده دیگر انتقال داده شد. ۸۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول و یا اتانول ۱۰۰ درصد سرد به میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن، میکروتیوب‌ها از فریزر خارج و رسوب DNA ژنومی به مدت ۱۰ دقیقه با شرایط ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سپس الکل داخل میکروتیوب‌ها دور ریخته شد. در مرحله بعد، ۸۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به میکروتیوب‌ها

در ۵۰، محاسبه شد (Kalangi Miandareh et al., 2015).

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از بخشی از ژن سیتوکروم b با طول حدود ۹۴۰ جفت باز، به عنوان نشانگر مولکولی با دستگاه PCR (Eppendorf، Mastercycler Nexus، آلمان) استفاده شد. برای تکثیر این ژن از آغازگرهای Glumug1 (رفت) و Mixcyto1 (برگشت) استفاده شد (جدول ۱). مواد واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (جدول ۲) شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱ میلی‌مولار از هر

آغازگر (رفت و برگشت) و محلول پایه آماده (Amplicon، Master Mix، دانمارک) (۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$) بود. دمای بهینه برای آغازگرهای Mixcyto1-R و Glumug1-F پس از انجام آزمایش گرادیان، ۵۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد (جدول ۳). کیفیت محصول PCR، تک باند بودن و وزن مولکولی قطعه تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز یک درصد سنجیده شد. برای این منظور در هر چاهک، مقدار ۲ میکرولیتر محصول PCR ریخته و سپس، از DNA Ladder ۳ کیلوبازی برای سنجش وزن باند تکثیر شده استفاده شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b در جمعیت ماهیان سفید

نام آغازگر	توالی آغازگر
Glumug1-F	5'-GGACGGAATGTTAGACTTCG-3'
Mixcyto1-R	5'-GGCTTGAAAAACCACCGTTG-3'

جدول ۲: مواد مورد استفاده در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در هر واکنش

ماده	مقدار (میکرولیتر)
آب مقطر دوبار تقطیر	۱۳
آغازگر رفت	۱
آغازگر برگشت	۱
DNA الگو	۱
Master Mix	۹
جمع	۲۵

جدول ۳: شرایط دمایی بهینه برای واکنش PCR

مرحله	دما (C°)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۵	۳ min	۱
واسرشت	۹۵	۳۵ s	
اتصال آغازگر	۵۲	۳۵ s	۳۵
طویل‌سازی	۷۲	۱ min/kb	
طویل‌سازی نهایی	۷۲	۷ min	۱
مرحله نگهداری	۴-۱۰	نامحدود	۱

تحلیل داده‌های مولکولی

ابتدا توالی‌ها توسط نرم‌افزار Choromas نسخه ۲ کنترل و نواحی بی‌کیفیت و مبهم در ابتدا و انتهای هر قطعه حذف شد. سپس به کمک ابزار اینترنتی Blast با توالی‌های موجود در بانک ژنی هم‌ردیف (Align) شدند (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). برای انتخاب بهترین مدل جایگزین، از نرم‌افزار Mr Model Test استفاده شد (Posada and Crandall, 1998)، سپس با استفاده از روش بیشترین تشابه (Maximum Likelihood) و بیشترین تشابه بی‌زین (Maximum Bayesian Likelihood) در نرم افزارهای Mega نسخه ۷ و Mr Bayes نسخه ۳.۱.۲ توسط شاخص AIC (Akaike) توصیه شد (GTR+G+I). ترکیب نوکلئوتیدی و نسبت‌های جهش انتقالی (Transition) و

الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۷۰ ولت انجام گرفت و برای مشاهده باندهای تشکیل شده از دستگاه ژل داک (Gel Documentation System, Vilber فرانسه) استفاده شد (Kalangi Miandareh et al., 2015). تخلیص محصول PCR توسط کیت (پیشگام و تکاپو زیست، ایران) صورت گرفت.

توالی‌یابی

برای تعیین توالی قطعه تکثیر شده، مقدار حداقل ۲۰ میکرولیتر از محصول واکنش PCR به همراه ۱۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت برای هر نمونه، برای خوانش دو طرفه به شرکت‌های MacroGene و Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

کیفیت محصول PCR

بررسی کیفیت باندهای به دست آمده از PCR نشان داد که باندهای تشکیل شده در محدوده ۱۱۵۰-۱۰۰۰ جفت باز قرار داشتند (شکل ۱).

ترکیب نوکلئوتیدی و جهش‌ها

بر اساس نتایج توالی‌یابی طول بیشتر قطعات به دست آمده ۱۰۴۵ جفت باز برای ماهیان بهاره بود و ترکیب نوکلئوتیدی نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به نوکلئوتید سیتوزین (C) با ۲۸/۵ درصد و کمترین میزان فراوانی مربوط به نوکلئوتید گوانین (G) با ۱۵/۶ درصد بود. آدنین و تیمین نیز به ترتیب ۲۷/۶ و ۲۸/۳ درصد از ترکیب نوکلئوتیدی را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). در حالی که در نمونه‌های پاییزه از ۱۰۳۵ جفت باز ثبت شده، ۲۸/۵ درصد نوکلئوتید سیتوزین (C)، ۲۸/۲ درصد نوکلئوتید تیمین (T)، ۲۷ درصد نوکلئوتید آدنین (A) و ۱۷/۲ درصد نوکلئوتید گوانین (G) بود (جدول ۴).

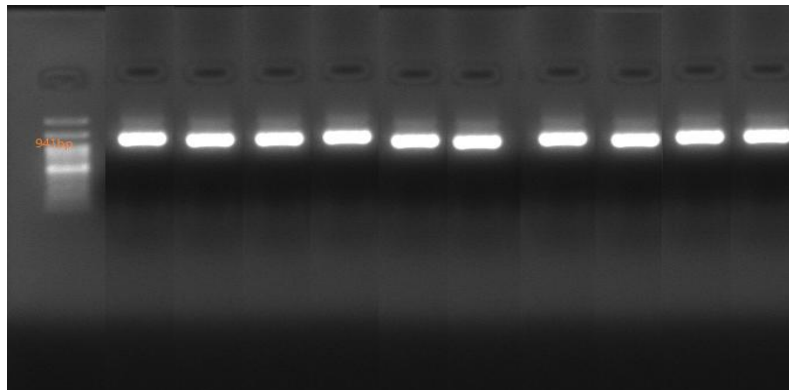
تقاطع (Transversion) و همین طور مقدار متوسط فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای بر حسب تعداد جفت باز و فاصله دو عامله کیمورا (Kimura 2 Parameters) در نرم‌افزار Mega نسخه ۷ محاسبه شد (Tamura et al., 2011).

تمام داده‌ها ابتدا از نظر نرمال بودن با استفاده از آزمون Wilk-Shapiro بررسی شدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین دو گروه (بهاره و پاییزه)، از آزمون t مستقل استفاده شد. تمامی تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی

سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از بافت نرم باله سینه‌ای ماهی سفید بهاره و پاییزه نشان داد در همه نمونه‌های استخراجی شاخص عددی کیفیت بین ۱/۷-۲ بود که بیانگر عدم آلودگی فنولی و پروتئینی است. همچنین کمیت DNA استخراجی نیز بین ۳۰-۸۰۰ نانوگرم در میکرولیتر ارزیابی شد.



شکل ۱: کیفیت باند حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز یک درصد

جدول ۴: درصد فراوانی نوکلئوتیدهای نمونه‌های بهاره و پاییزه ماهی سفید تالاب انزلی

C	T	A	G	نوکلئوتید	
				نمونه	
۲۹۸	۲۹۶	۲۸۸	۱۶۳	تعداد	مولدین بهاره
۲۸/۵	۲۸/۳	۲۷/۶	۱۵/۶	فراوانی (درصد)	
۲۹۵	۲۹۲	۲۸۰	۱۶۸	تعداد	مولدین پاییزه
۲۸/۵	۲۸/۲	۲۷	۱۶/۳	فراوانی (درصد)	

ارزیابی قرار گرفت، در دو فرم بهاره و پاییزه با میانگین ۵۳/۰۰ جفت باز و ۰/۰۳۴ (فاصله دو عامله کیمورا) بود. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت ماهیان بهاره و پاییزه مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۳۸۸ و شباهت ژنتیکی ۰/۶۱۲ به دست آمد.

محاسبه نرخ جایگزینی انتقالی به تقاطعی (Transition/Transversion) بیانگر بیشتر بودن نرخ جهش‌های انتقالی به تقاطعی با در بر گرفتن ۶۷/۲۲ درصد از جهش‌ها بود (جدول ۵).

فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای که بر حسب تعداد نوکلئوتید و فاصله دو عامله کیمورا مورد

جدول ۵: نرخ جایگزینی جهش‌های انتقالی به تقاطعی در توالی ژن Cyt-b در مولدین بهاره و پاییزه ماهی سفید

A	T	C	G	Transition/Transversion
-	۴/۸۶	۵/۱۱	۰/۸۷	A
۳/۹۲	-	۳۳/۳	۲/۵۱	T
۳/۹۲	۳۱/۶۸	-	۲/۵۱	C
۱/۳۷	۴/۸۶	۵/۱۱	-	G

تبارشناسی

در زنجیره انتقال الکترون و تنوع نسبتا بالای توالی آن، یکی از شاخص‌های رایج برای بررسی تفاوت‌ها و روابط ژنتیکی در جمعیت‌های ماهیان است. در مطالعه حاضر، ژن سیتوکروم b میتوکندریایی به خوبی تفاوت بین دو جمعیت ماهی سفید بهاره و پاییزه را نشان داد. سیتوزین و گوانین به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقادیر میانگین ترکیب نوکلئوتیدی در دو جمعیت بودند. درصد ترکیب سیتونین و گوانین در کل ژنوم میتوکندریایی ماهیان ۴۳/۲ و ۳۸/۴ درصد است (Ward et al., 2005). در این مطالعه این میزان معادل ۴۴/۱ درصد برای ماهیان بهاره و ۴۴/۸ درصد برای ماهیان پاییزه بود و بالاتر از دامنه بالا محاسبه شد. دلیل آن می‌تواند محتوای بالای این دو نوکلئوتید در جایگاه سوم کد کننده ژن Cyt-b باشد که در ماهیان استخوانی گزارش شده است (Ward et al., 2005). در این بررسی، ترکیب

تبارشناسی که با استفاده از روش Maximum Likelihood و Bayesian بر اساس بهترین مدل جایگزینی GTR+G+I و شاخص AIC4862/834 رسم شد، نشان داد نمونه‌های بهاره و پاییزه به صورت مشترک در یک خوشه و روی یک شاخه قرار گرفتند که این می‌تواند نشانه تمایز اندک نژاد بهاره و پاییزه بر اساس ژن سیتوکروم b باشد. به طور کلی، گونه‌های دو فرم بهاره و پاییزه ماهی سفید مورد بررسی در این مطالعه، به درستی گروهی هم‌تبار بودند. دو جمعیت، با پشتوانه تکرار ۹۹ و احتمال پسین ۰/۹۸ به خوبی از یکدیگر متمایز شدند و در موقعیت خواهر گروهی با یکدیگر قرار گرفتند.

بحث

ژن سیتوکروم b به دلیل نقش کلیدی آن

نسبت جهش انتقالی به تقاطعی نقش مهمی در به کارگیری روش درست فاصله تکاملی دارد و برای چند مدل تکاملی استفاده می‌شود (Wakeley, 1996; Strandberg and Salter, 2004). مقایسه نرخ جانیشینی جهش‌های انتقالی به تقاطعی نشان داد ۶۷/۲۲ درصد جهش‌ها به صورت انتقالی بودند. غالبیت نرخ جهش‌های انتقالی نسبت به تقاطعی، به طور وسیعی در دیگر گونه‌های جانوری نیز گزارش شده است (Belle et al., 2005). نتایج به دست آمده از فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای بر حسب تعداد نوکلئوتید (جفت باز) و فاصله دو عامله کیمورا (K2P) نشان داد فاصله درون‌گونه‌ای در دو فرم بهاره و پاییزه با میانگین ۵۳/۰۰ جفت باز و ۰/۰۳۴ (فاصله دو عامله کیمورا) بود. همچنین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۳۸۸ و شباهت ژنتیکی ۰/۶۱۲ به دست آمد. اختلاف زیاد محدوده فاصله بین‌گونه‌ای به خوبی بیانگر کارایی بالای ژن Cyt-b در تمایز گونه‌های شناسایی شده بود. در پژوهش Rezaei و همکاران (۲۰۱۰) مقدار شباهت ژنتیکی برای سطوح فیلوژنی مختلف ۰/۹۶۵ گزارش شد که در محدوده گونه‌های مشابه ماهیان سفید رودخانه‌های گرگانرود و چشمه کیله قرار داشت. در بررسی

نوکلئوتیدهای به دست آمده از توالی‌یابی جمعیت‌های ماهی سفید حاکی از درصد پایین نوکلئوتید گوانین و مقادیر نسبتاً مشابه در سه نوکلئوتید دیگر، سیتوزین، آدنین و تیمین، بود. چنین الگویی از ترکیب نوکلئوتیدی در گونه‌های دیگر ماهیان نیز به طور وسیع گزارش شده است (Johns and Avise, 1998; Gharibkhani et al., 2011; Firouzi, 2018).

پیش از این، روابط فیلوژنی ۲۹ گونه از خانواده کپورماهیان اروپایی با توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی توسط Briolay و همکاران (۱۹۹۸) مورد بررسی قرار گرفته بود که این بررسی اولین مطالعه انجام شده بر روی فیلوژنی و تنوع کپورماهیان با استفاده از روش‌های مولکولی بود و تمام نتایج به دست آمده از آن منطبق بر یافته‌های ریخت‌شناسی پیشین بود. بعدها فیلوژنی و جغرافیای زیستی ۶۲ گونه از خانواده کپورماهیان مناطقی از خاورمیانه با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی در مطالعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت (Durand et al., 2002).

در DNA میتوکندریایی به علت بالا بودن نرخ جایگزینی، برآورد نسبت جهش انتقالی به تقاطعی مشکل است و ترکیب نامتقارنی را نشان می‌دهد (Belle et al., 2005)، با این حال

ماهیان سفید بهاره و پاییزه وجود داشت. نمونه چنین مطالعه‌ای نیز در ساختار ژنتیک ماهیان سفید با استفاده از سیستم ریزماهورای در پژوهش Kashiri و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده شد. در بررسی Rihani (۲۰۰۸) بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های انزلی و خلیج گرگان (۰/۹۸۵) و کمترین شباهت میان نمونه‌های انزلی و روسیه (۰/۷۶۵) مشاهده شد. علاوه بر این، در مطالعه Shojaei Kavan (۲۰۱۰) بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌های گرگانرود با نمونه‌های پاییزه تالاب و خشک‌رود (۰/۶۴۶) و کمترین فاصله میان نمونه‌های گرگانرود و تنکابن (۰/۲۳۷) گزارش شد. همچنین در مطالعه‌ای که Rezaei و همکاران (۲۰۱۲) روی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سفید در دو رودخانه تجن و تنکابن انجام دادند، فاصله ژنتیکی کمی را در میان نمونه‌ها نشان دادند و همچنین عنوان کردند که درخت فیلوژنی به دست آمده نیز جدایی بین مناطق را نشان نداد. مطالعات بالا با نتیجه مطالعه حاضر همخوانی داشت. می‌توان نتیجه گرفت که کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های تمایز نشان دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها است (Pinera et al., 2007).

Chakmehduoz Ghasemi و همکاران (۱۹۹۹) نمونه‌های بهاره و پاییزه با ۹۷ درصد شباهت، ۳ درصد اختلاف تکاملی داشتند، همچنین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت ۰/۴۰۷ و شباهت ژنتیکی ۰/۵۹۳ به دست آمد که با مقادیر تمایز پایین به دست آمده مطابق است. در بررسی دیگر از Chakmehduoz Ghasemi و Bahmanesh (۲۰۱۵) روی دو گونه از جنس *Rutilus* میانگین فاصله ژنتیکی بین دو گونه ۰/۰۹ گزارش شد که نشان دهنده شباهت ژنتیکی نسبتاً بالا و تفکیک‌پذیری گونه‌ها در سطح ژنتیکی است.

وجود شباهت‌های ژنتیکی بین نمونه‌های بهاره و پاییزه تالاب انزلی (۰/۶۴۶) در مطالعه Shojaei Kavan در سال ۲۰۱۰ نیز تصدیق‌کننده وجود نژادهای بهاره و پاییزه ماهی سفید در این تالاب و دریای خزر است. Ketmaier و همکاران (۲۰۰۸) روی جنس *Rutilus* مطالعه کردند و با توجه به این که مشخصات مورفومتریک و مریستیک متفاوتی بین دو گونه *Rutilus frisii* و *Rutilus caspicus* وجود داشت، فاصله ژنتیکی بسیار کمی بین آنها به دست آوردند. در مطالعه Kalangi Miandareh و همکاران (۲۰۱۵) فاصله ژنتیکی خیلی کمی معادل ۰/۰۰۱ در

بر اساس تعاریف، یک جمعیت، گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولیدمثلی از گروه‌های دیگر همان گونه جدا هستند. اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیت‌ها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌ها) به عنوان گونه مطرح نمی‌شوند. در حقیقت، رفتارهای تولیدمثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی، نوعی رفتار تولیدمثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت است. در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه‌برداری شود. معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم‌پوشانی نسلی هستند، بنابراین اطلاعات ژنتیک جمعیت اغلب افراد را از نسل‌های مختلف بررسی می‌کنند. وقتی نمونه‌برداری در مکانی در بیش از یک فصل (زمان) صورت می‌گیرد، راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی، آزمون تمایز بین نمونه‌ها است (Viard et al., 1997). در مجموع، در این مطالعه ژن Cyt-b به خوبی تفاوت بین دو فرم بهاره و پاییزه ماهی سفید را نشان داد. با این حال، اساس مطالعه مولکولی جمعیت‌های مورد بررسی با وجود فاصله زمانی، با هم در سطح گونه شباهت‌های ژنتیکی قابل توجهی نشان دادند و نمی‌توان این جمعیت‌ها را از نظر ژنتیکی دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای دانست. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان مرجعی مناسب برای تفاوت‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Adams B.K. and Hutchings J.A. 2003.** Microgeographic population structure of brook charr: A comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62(3): 517–533. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00032.x
- Alemi Safaval P., Neshaei S.A., Heidarian P., Khanmohammadi M., Ghanbarpour F., Azizi Z., Behzadi S. and Stefanakis A. 2024.** Studying the effect of Anzali port breakwaters on sedimentation in Anzali wetland using remote sensing. *Environmental Engineering Research*, 29(1): 1–10 (230064). doi: 10.4491/eer.2023.064
- Aminian Fatideh B., Mohammadi M., Karimzadeh G., Mohammad Jafari A. and Vahdati Rad N. 2017.** Effect of biological and environmental conditions on the catch rate and migration of *Rutilus frisii kutum* in the southeast basin of the Caspian Sea (Golestan Province). *Journal of Animal Research*, 29(4): 380–400.
- Belle E.M., Piganeau G., Gardner M. and Eyre-Walker A. 2005.** An investigation of the variation in the transition bias among various animal mitochondrial DNA. *Gene*, 355: 58–66. doi: 10.1016/j.gene.2005.05.019
- Berg L.S. 1948.** *Freshwater Fishes of the U.S.S.R. and Adjacent Countries.* Trady Instituta Akademii Nauk SSSR, Russia 496P.
- Briolay J., Galtier N., Brito R.M. and Bouvet Y. 1998.** Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 100–108. doi: 10.1006/mpev.1997.0441
- Chakmehduoz Ghasemi F. and Bahmanesh S. 2015.** Genetic diversity and phylogenetic relationship of two *Rutilus* species in the southern Caspian Sea based on mitochondrial cytochrome b sequence data. *Journal of Aquatic Sciences and Development*, 9(3): 19–28.
- Chakmehduoz Ghasemi F., Pourkazemi M., Zomini A., Yarmohammadi M., Baradaran Noveiri S., Rezvani S. and Azizzadeh L. 1999.** Investigation of spring and autumn races of the Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*) using microsatellite markers. *Proceedings of the First Conference on Caspian Sea Fishery Resources.* International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Research Organization and Islamic Azad University, Iran. P: 1–8.
- De Grave S. and Ghane A. 2006.** The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan), in Anzali

- Lagoon, Iran. *Aquatic Invasions*, 4: 204–208. doi: 10.3391/ai.2006.1.4.2
- Durand J.D., Tsigenopoulos C.S., Unlu E. and Berrebi P. 2002.** Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(1): 91–100. doi: 10.1006/mpev.2001.1040
- Erguden D. and Turan C. 2005.** Examination of genetic and morphologic structure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) populations in Turkish coastal waters. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(3): 727–733.
- Esmaili H.R., Coad B.W., Mehraban H.R., Masoudi M., Khaefi R., Abbasi A., Mostafavi H. and Vatandoust S. 2014.** An updated checklist of fishes of the Caspian Sea basin of Iran with a note on their zoogeography. *Iranian Journal of Ichthyology*, 1(3): 152–184. doi: 10.22034/iji.v1i3.18
- Firouzi N. 2018.** Phylogeny of Iran mullets based on Cyt-b gene sequence and comparison of scale morphological characters [In Persian]. M.Sc. Thesis, Chabahar Maritime University, Iran. 122P.
- Gharibkhani M., Pourkazemi M., Azizzadeh L., Falah Bagheri F. and Tatina M. 2011.** The study on the phylogeny of five species of Caspian Sea cyprinids inferred from mitochondrial cytochrome b gene [In Persian]. *Animal Biology*, 3(3): 33–40.
- Ghasemi M., Zamani H., Hosseini S.M., Haghighi Karsidani S. and Bergmann S.M. 2014.** Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) as a host for spring viraemia of carp virus. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4): 408–413. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.032
- Hillis D.M. Mable B.K. and Moritz C. 1996.** Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. P: 515–543. In: Hillis D.M., Moritz C. and Mable B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, USA.
- Johns G.C. and Avise J.C. 1998.** A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11): 1481–1490. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875
- Karami Nasab M., Hosseinnia Z., Kalangi Miandareh H. and Shabani A. 2015.** Genetic diversity of *Barbus grypus* in the Karkheh River, Khuzestan Province, and the cultured strain using microsatellite markers. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 3(2): 114–123.

- Kashiri H., Shabani A., Gorgin S., Rezaei M. and Jabale A.R. 2018.** Microsatellite DNA marker analysis of genetic variation in wild and hatchery populations of Caspian kutum (*Rutilus kutum*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 18: 1101–1111. doi: 10.4194/1303-2712-v18_9_09
- Kavan L.S., Gilkolaei S.R., Vossoughi G., Fatemi S.M.R., Safari R. and 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(6): 316–322. doi: 10.3923/jfas.2009.316.322
- Ketmaier V., Bianco P.G. and Durand J.D. 2008.** Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 49: 362–367. doi: 10.1016/j.ympev.2008.07.012
- Kolangi Miandareh H., Shabany A. and Hojjati M. 2015.** Genetic diversity of *Rutilus kutum* (Kamenskii, 1901) in some rivers in southern of the Caspian Sea using cytochrome b gene (mtDNA-Cytb) sequences. Journal of Applied Ichthyological Research, 3(2): 1–12.
- Mahdian M., Hosseinzadeh M., Siadatmousavi S.M., Chalipa, Z., Delavar M., Guo M., Abolfathi S. and Noori R. 2023.** Modelling impacts of climate change and anthropogenic activities on inflows and sediment loads of wetlands: Case study of the Anzali wetland. Scientific Reports, 13: 1–18 (5399). doi: 10.1038/s41598-023-32343-8
- Mirbakhsh M. 2016.** Establishment of a genetic database of cultured shrimps and their native pathogens in Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research, Shrimp Research Center, Iran. 106P.
- Moezzi F., Poorbagher H., Eagderi S., Fegghi J., Dormann C.F., Nergi S.K. and Amiri K. 2022.** Modelling habitat preference of Caspian kutum, *Rutilus kutum*, using non-linear habitat suitability indices and generalized additive models. Regional Studies in Marine Science, 56: 102715. doi: 10.1016/j.rsma.2022.102715
- Nematdoost Haghi B. 2005.** Physiological variations of Caspian whitefish during spring and autumn catches [In Persian]. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Iran. 115P.
- Park L.K. and Moran P. 1995.** Developments in molecular genetic techniques in fisheries. P: 1–28. In: Carvalho G.R. and Pitcher T.J. (Eds.). Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and Hall, UK.

- Pinera J.A., Blanco G., Vazquez E. and Sanchez J.A. 2007.** Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: A preliminary study. *Marine Biology*, 151: 2153–2158. doi: 10.1007/s00227-007-0665-5
- Posada D. and Crandall K.A. 1998.** MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817–818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817
- Rezaei M., Shabani A., Shabanpour B. and Kashiri H. 2010.** Genetic diversity and population structure of Caspian whitefish (*Rutilus kutum*) in Gorganroud and Cheshmeh Kileh rivers using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics Journal*, 2(1): 1–14.
- Rezaei M., Shabani A., Shabanpour B. and Kashiri H. 2012.** Microsatellite diversity and population genetic structure of *Rutilus frisii kutum* in Mazandaran coasts. *Iranian Journal of Biology*, 25(4): 548–558.
- Rihani S. 2008.** Genetic variation of kalleh fish populations from Iranian and Russian coasts using microsatellite markers. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Iran. 122P.
- Safari R. 2016.** Population structure of *Rutilus frisii kutum* in Iranian coastline of the Caspian Sea using microsatellite markers. *Environmental Resources Research*, 4(1): 65–74.
- Salehi S., Sharafi S., Kazemi A. and Esmaeilbeigi M. 2024.** Unveiling hidden threats: Assessing the risks of potentially toxic elements (PTEs) in contaminated fish of the Anzali Wetland. *Regional Studies in Marine Science*, 79: 103853. doi: 10.1016/j.rsma.2024.103853
- Salini J.P., Milton D.A., Rahman M.J. and Hussain M.G. 2004.** Allozyme and morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, hilsa *Tenualosa ilisha*. *Fisheries Research*, 66: 53–69. doi: 10.1016/S0165-7836(03)00124-3
- Sattari M., Imanpour Namin J., Bibak M., Forouhar Vajargah M., Hedayati A., Khosravi A. and Mazareiy M.H. 2019.** Morphological comparison of western and eastern populations of Caspian kutum, *Rutilus kutum* (Kamensky, 1901) (Cyprinidae) in the southern Caspian Sea. *International Journal of Aquatic Biology*, 6(4): 242–247. doi: 10.22034/ijab.v6i4.529
- Shojaei Kavan L. 2010.** Investigation of genetic variation in *Rutilus frisii kutum* from Iran and Azerbaijan regions using microsatellite markers. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4: 316–322.
- Strandberg A.K. and Salter L.A. 2004.** A comparison of methods

- for estimating the transition: Transversion ratio from DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(2): 495–503. doi: 10.1016/j.ympev.2004.01.013
- Tamura K., Peterson D., Peterse N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011.** MEGA3: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msab120
- Viard F., Justy F. and Jarne P. 1997.** Population dynamics inferred from temporal variation at microsatellite loci in the selfing snail *Bulinus truncatus*. *Genetics*, 14: 6973–6982. doi: 10.1093/genetics/146.3.973
- Wakeley J. 1996.** The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(4): 158–162. doi: 10.1016/0169-5347(96)10009-4
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R. and Hebert P.D. 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360(1462): 1847–1857. doi: 10.1098/rstb.2005.1716



Research Paper

Comparison of spring and autumn migratory populations of Caspian white fish (*Rutilus frisii*) to Anzali Wetland using Cyt-b gene sequencing method

Danial Gorouhi^{1*}, Seyed Hamed Mousavi Sabet²

DOI: 10.22124/japb.2025.29480.1560

Received: February 2025

Accepted: April 2025

Abstract

In this study, the structure of spring and autumn Caspian white fish (*Rutilus frisii*) populations migrating to Anzali Wetland was studied using the Cyt-b gene sequencing method. The fish samples (60 samples from each population) were caught in 2019 and 2020. Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of the samples were performed after DNA extraction from the soft tissue of the pectoral fin. Based on results, a significant difference was observed in terms of genetics between the two populations of spring and autumn fish ($P < 0.05$). The genetic distance between the two populations was 0.388, and the genetic similarity was 0.612. The results of molecular studies showed that cytosine and guanine had the highest and lowest average nucleotide composition values in the two populations, respectively. Calculation of the transition-to-crossover substitution rate indicated a higher rate of transition-to-crossover mutations, comprising 67.22% of the mutations. In general, it can be said that the Cyt-b gene has well shown the difference between the two spring and autumn forms. However, the molecular study of the populations under investigation, despite the time gap, showed significant genetic similarities at the species level; and these populations cannot be considered to have a significant difference in terms of genetics.

Key words: Caspian Kutum, Cyt-b, Gene Sequence, Migratory Populations.

1- M.Sc. in Fisheries Science and Engineering, Shahid Ansari Teleost Fish Restocking and Genetic Conservation Center, Iranian Fisheries Organization, Rasht, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmehsara, Iran.

*Corresponding Author: d.gorouhi@gmail.com