بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) مناطق مختلف با استفاده از ردیف‌یابی منطقه کنترل DNA میتوکندریایی

مجیدرضا خوش خلق[۱*] ، سجاد نظری[۲]

*mkhoshkholgh2012@gmail.com

۱- دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان ، ایران، صندوق پستی ۱۱۴۴

۲- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات وآموزش کشاورزی ، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

چکیده

در مطالعه حاضر ساختار ژنتیک جمعیت شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) ، با استفاده از ناحیه کنترلی میتوکندریایی (D-loop) و روش توالی‌یابی DNA مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور تعداد ۱۳۲ نمونه شاه میگو از مناطق مختلف دریای خزر و دریاچه سد ارس در سال ۱۳۹۰جمع آوری گردید. سپس کمیت DNA نمونه‌ها به روش اسپکتروفتومتری و کیفیت آن از طریق الکتروفورز ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین شد. در مجموع در نمونه-های مناطق مختلف، ۳۸ هاپلوتیپ شناسایی و تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به ترتیب برابر با ۰/۰۴۹ ± ۰/۸۱۱ و ۰/۰۰۳۸ ± ۰/۰۱۲۷ اندازه گیری شد. مقدار D در آزمون بی طرفی تاجیما ۳/۱۲۰ و میانگین آزمون مربع کای χ^2 = ۷۸/۲۵ نیز بدست آمد. مقدار D بدست آمده در بین نمونه‌ها ممکن است نشان دهنده متعادل بودن فشار انتخاب باشد. از طرف دیگر، نتایج منفی آزمون گسترش و پراکنش تاریخی جمعیت‌ها (Fu's *Fs*) و همچنین شاخص هارپندینگ تایید کننده گسترش جمعیت‌ها بود. با توجه به نتایج آزمون‌های تمایز F_{ST}، آزمون دقیق و آنالیز واریانس مولکولی مناطق آستارا در دریای خزر، رودخانه سیاه درویشان و جفرود اختلاف معنی‌داری را با سایر مناطق نشان دادند (P < ۰/۰۰۱). همچنین مشخص گردید که در مناطق نمونه برداری،گروه‌های متمایزی از شاه میگوی آب شیرین وجود دارد، بطوری‌که نمونه‌های رودخانه سیاه درویشان و جفرود و ناحیه آستارا گروه‌های متمایز ژنتیکی از این گونه را نشان می دهند. بطور کلی یافته‌های این تحقیق می‌تواند نقش موثری برای شناسایی ذخایر و بهبود ژنتیکی شاه میگوی آب شیرین ایفاء نماید.

کلمات کلیدی: شاه میگوی آب شیرین، *Astacus leptodactylus* ، DNA میتوکندریایی، دریای خزر، دریاچه سد ارس

*نویسنده مسئول

مقدمه

بر اساس مطالعات انجام شده، سه خانواده شاه میگوی آب شیرین در دنیا وجود دارد که در بین آنها خانواده Astacidae بومی منطقه آسیای غربی است و در ایران نیز گونه شاه میگوی آب شیرین *Astacus leptodactylus* متعلق به این خانواده می باشد (Stucki, 1999; Chiesa *et al.*, 2011). امروزه با توجه به ارزش بالای غذایی جانوران آبزی مصرف آنها نیز افزایش پیدا نموده است که در این میان شاه میگوی آب شیرین جایگاه ویژه ای دارد و با داشتن خصوصیاتی از جمله رژیم غذایی ارزان، ارزش اقتصادی بالا و بازارپسندی مناسب در دنیا از اهمیت اقتصادی و تجاری خاصی برخوردار است (Karimpour *et al.*, 2011; Harlioğlu, 2008).

امروزه تنوع ژنتیکی بعنوان یکی از شاخص‌های وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی بکار می‌رود. یکی از راههای بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان مطالعات ژنتیک جمعیت‌ها بوده و شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA هسته ای و میتوکندری از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره‌برداری می‌باشد (Pourkazemi et al., 2012). بررسی‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) کاربردهای متعددی را در زیست شناسی آبزیان از جمله تعیین تغییرات بین افراد، بررسی تغییرات درون و بین جمعیتی، بررسی تاکسونومیکی تغییرات درون گونه‌ای و دیگر سطوح طبقه بندی مانند جنس ها داشته (Billington and Hebert, 1995; Liua and Cordes, 2004; Brown, 2008). بطوری که در مطالعات ژنتیک جمعیت سخت پوستان، ژن‌های نظیر 16S rRNA و ناحیه کنترل DNA میتوکندریایی بسیار مورد استفاده قرار گرفته اند (Tong *et al.*, 2000; Schubart *et al.*, 2000; Haye *et al.*, 2002).

محققین از سال ۱۹۸۰تلاش نموده اند تا با استفاده از روش‌های مختلف ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف سخت پوستان از جمله شاه میگوی آب شیرین را بررسی نمایند. به عنوان مثال، مطالعات اولیه بر اساس الکتروفورز پروتئین صورت گرفت که تنها سطوح پایینی را در بین جمعیت-های شاه میگوی آب شیرین اروپایی نشان دادند. در سال-های گذشته با پیشرفت فن آوری و توسعه روش‌های مولکولی، روش‌های مختلفی نظیر DNA میتوکندری (Grandjean *et al.*, 2000)، RAPD (Schulz , 1999, 2004;Gouin *et al.*, 2001)، AFLP (Fetzner and Crandall, 1999) و ریزماهواره (Gouin *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2013) در مطالعات جمعیت‌های شاه میگوی آب شیرین به کار گرفته شده‌اند. در ایران نیز مطالعات ژنتیکی برخی از گونه‌های سخت پوستان تاکنون صورت پذیرفته است (بابایی،۱۳۸۱ ؛ رضوانی گیل کلایی و همکاران ،۱۳۸۰ ؛ نهاوندی و همکاران ، ۱۳۸۴ ؛ شکوهمند و همکاران ،۱۳۹۰).

برای توصیف مناسب ساختار جمعیت بایستی از روش‌های متعدد و نشانگرها و ژن‌های مختلف بهره گرفته شود. بر همین اساس، هدف از انجام این تحقیق شناسایی و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های احتمالی مناطق مورد مطالعه با استفاده از روش ردیف‌یابی DNA میتوکندریایی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی و معرفی نشانگر مولکولی جهت تمایز آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

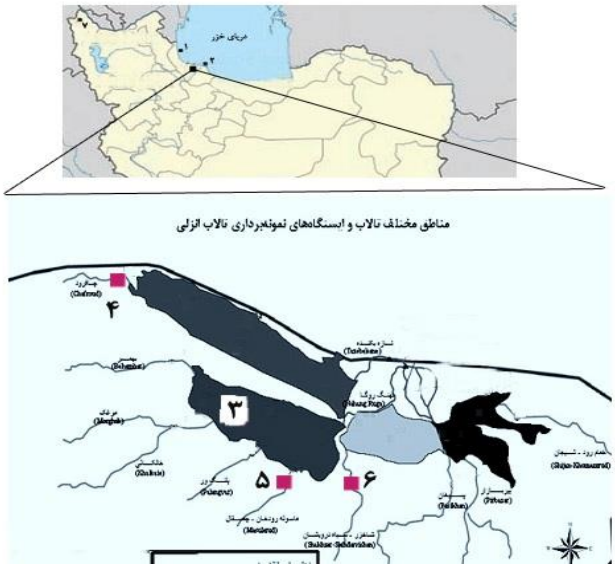
جمع آوری نمونه‌ها

به منظور تهیه نمونه ها صید مولدین شاه میگوی آب شیرین، در نقاط مختلف جغرافیایی شامل تالاب انزلی و ۴ رودخانه منتهی به دریای خزر و غرب و بخش مرکزی جنوب دریای خزر و همچنین دریاچه سد ارس در سال ۱۳۹۰ با استفاده از تله انجام گرفت (جدول ۱، شکل ۱). برای جلوگیری از آسیب به نمونه‌ها، مقدار کمی بافت از ناحیه پای اول بند اول شاه میگو توسط انبرک جدا شد و سپس در الکل اتانول ۹۶ درصد نگهداری گردید. نمونه‌ها برای انجام آزمایشات مولکولی به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گیلان منتقل شدند.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جدول ۱ : مناطق نمونه برداری و تعداد نمونه ها در روش توالی یابی

شماره ایستگاه در نقشه	نام ایستگاه	طول و عرض جغرافیایی	تعداد
۱	دریای خزر- آستارا	۴۹درجه و۵۵ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجـــه و ۸ دقیقه عرض شمالی	۲۰
۲	دریای خزر-کیاشهر	۴۹درجه و۴۲ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجـــه و ۳۳ دقیقه عرض شمالی	۲۰
۳	تالاب انزلی	۴۹درجه و ۲۰ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجـــه و ۲۶ دقیقه عرض شمالی	۲۰
۴	رودخانه جفرود	۴۹درجه و ۱۲دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجـــه و ۲۹ دقیقه عرض شمالی	۲۰
۵	رودخانه ماسوله رودخان	۴۹درجه و ۱۸ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجـــه و ۱۰ دقیقه عرض شمالی	۱۴
۶	رودخانه سیاه درویشان	۴۹درجه و ۱۷ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجـــه و ۱۷دقیقه عرض شمالی	۱۸
۷	دریاچه سد ارس	۴۵درجه و ۲ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجـــه و ۳۸ دقیقه عرض شمالی	۲۰
مجموع			**۱۳۲**



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری شاه میگوی آب شیرین در دریای خزر، تالاب انزلی و دریاچه سد ارس (جزئیات در جدول ۱ آورده شده است) .

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

آزمایشات مولکولی

در این بررسی برای استخراج کل DNA ژنومی از روش فنل –کلروفرم-ایزوآمیل الکل استفاده گردید (Hillis and Moritz,1990). در ادامه جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی (Pourkazemi *et al*, 2012) بر روی ژل آگارز (۰/۸ درصد) و میزان فلورسانس ترکیب اتیدیوم بروماید[1] جذب شده بوسیله DNA استفاده شد. همچنین تعیین کمیت DNA نمونه ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری (نانودراپ ۱۰۰۰) اندازه گیری و ثبت گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: dNTPs ،۱۰ میلی مولار؛ پرایمر، یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول)؛ DNA، ۱۰۰ نانوگرم؛ ، PCR بافر، ۲/۵ میکرولیتر با غلظت x ۱۰؛ کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار و آب مقطر انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ترتیب: مرحله جداسازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه برای ۲۵ چرخه بهینه سازی گردید (جدول ۲). پرایمرهای اختصاصی از ناحیه کنترل DNA میتوکندریایی از توالی قطعه حلقه D[2] شاه میگوی آب شیرین در بانک ژن NCBI بدست آمده و سپس به کمک نرم افزار Gunrunner 5.0.47 طراحی گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده قطعه حلقه D شامل پرایمر ۱: 5'-AAGAACCAG CTAGAATAAAATCTT-3' و پرایمر ۲: 5'-GATCCA AGAACATCCTTTACGACA-3' بودند.

بعد از انجام مراحل PCR، محصولات بدست آمده در ژل آگارز ۰/۸ درصد با نقطه جوش پایین خالص‌سازی و به نماینده شرکت ABI در آلمان برای تعیین توالی ارسال گردیدند. به این ترتیب که در ابتدا DNA به طور مستقیم در تکه‌های ذوب شده طبق روش استاندارد (Kretz and o'Brein, 1993) با ^{35}S انجام شد سپس توالی‌یابی با استفاده از کیت cyclist Taq DNA به همراه پرایمر ۱ در دمای الحاق ۵۱ درجه سانتی‌گراد با دستگاه ABI Prism Model 377 (Applied Biosystems, USA) انجام پذیرفت. در ادامه کار توالی‌های DNA در ژل واسرشت شده پلی‌اکریل آمید ۶ درصد و اوره ۷ مولار حل شدند. در نهایت نیز نمونه‌ها پس از تثبیت ژل‌ها و خشک شدن بر روی سینی شیشه‌ای، در معرض فیلم اشعه X به مدت چند روز قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی از نرم افزارهای متعددی برای آنالیز داده ها استفاده گردید. به این ترتیب که هاپلوتیپ‌های مربوط به قطعه حلقه DNA D میتوکندریایی با استفاده از نرم افزارهای آماری مشخص گردیدند. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی مخصوص جمعیت‌ها با استفاده از شاخص Nei و Tajima (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شدند. فواصل ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌ها بر اساس روش دوپارمتری Kimura (PHYLIP 3.695; Felsenstein, 2013) محاسبه گردید. برای انجام آزمون‌های Fu's F_S (Fu, 1997) و D تاجیما (Tajima, 1989) از بسته نرم افزار آماری DnaSP v5 با ۱۰۰۰۰ تکرار جهت بررسی گسترش و پراکنش تاریخی جمعیت‌ها استفاده شد (Librado and Rozas, 2009). شاخص هارپدینگ (Harpending, 1994) و آزمون دقیق جهت تمایز جمعیت‌ها (Raymond and Rousset 1995) نیز بوسیله بسته نرم افزار آماری Arlequin 3.0 بدست آمد (Excoffier *et al*., 2005).

[1] Ethidium bromide
[2] Displacement-loop

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جدول ۲: برآورد حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی منطقه کنترل mtDNA شاه میگوی آب شیرین

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	-	۶/۱۲	۲/۹۸	**۱۶/۱۵**
T	۴/۳۲	-	**۱۴/۵۶**	۳/۶۵
C	۶/۱۷	**۱۲/۰۱**	-	۲/۸۶
G	**۱۸/۰۹**	۶/۲	۲/۹۸	-

میزان احتمال جانشینی انتقالی[1] با خانه های رنگی مشخص شده است و بقیه اعداد شامل احتمال جانشینی Transversion. (Transition : تغییر یک باز پورین به جای یک باز پورین دیگر و یا یک باز پیریمیدین به جای یک باز پیریمیدین دیگر و Transversion: جانشینی یک باز پورین[2] به جای یک باز پیریمیدین[3] می باشد).

همچنین نرخ کل transition/transversion (R) با استفاده از روش Tamura و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از فرمول زیر و به کمک نرم افزار MEGA 6 بدست آمد:

$$R = [A*G*k_1 + T*C*k_2]/[(A+G)*(T+C)]$$

در فرمول k_1 : میزان احتمال جانشینی باز پورین و k_2 : میزان احتمال جانشینی باز پیریمیدین می باشد. برنامه آماری MEGA 6 ، برای ایجاد ماتریس فاصله انشعاب توالی بین هاپلوتیپ‌ها به کار گرفته شد. الگوی ساختار جغرافیایی با استفاده از واریانس مولکولی (AMOVA) برآورد گردید. فرضیه اصلی ساختار جمعیت نیز بوسیله آزمون مربع کای[4] و با ۱۰۰۰ بار تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

جهت بررسی‌های آماری، توالی‌های قطعه منطقه کنترل mtDNA شاه میگوی آب شیرین با استفاده از نرم افزار Clustal W 2 همتراز[5] شدند و در مجموع ۶۸ جایگاه متغیر در همه توالی‌ها مشاهده گردید. همه جانشینی بازها از نوع انتقالی بودند و هیچ گونه حذف یا الحاق[6] مشاهده نشد. در بین نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین مناطق مختلف نمونه برداری در مجموع ۳۸ ترکیب هاپلوتیپ مشاهده گردید (جدول ۴). در هاپلوتیپ‌های مختلف چندین جایگاه نوکلئوتیدی مشخص گردید و بیشتر تغییرات مشاهده شده شامل جهش‌های انتقالی[7] (T↔C) بودند. همچنین میانگین نسبت نوکلئوتیدی در طول توالی‌ها تقریبا ۴۲: ۵۸ ٪ ≈ (G+C) : (A+T) بود و نشان دهنده غالب بودن نسبت بازهای آدنین (A) و تیمین (T) می باشد که به صورت نوکلئوتیدهای تکراری در طول توالی‌های مشخص شدند. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی منطقه کنترل شاه میگوی آب شیرین در مناطق نمونه برداری در جدول ۲ آورده شده است و مطابق با جدول میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش Tamura و همکاران (۲۰۱۳) محاسبه گردید. در این بررسی همچنین میانگین فراوانی نوکلئوتیدی بازهای A، T ، C و G به ترتیب ۰/۳۰۵ ، ۰/۲۹۱، ۰/۲۰۶ و ۰/۱۹۸ بدست آمد.

آزمون بی طرفی Tajima برای توالی منطقه کنترل mtDNA شاه میگوی آب شیرین طبق روش Tajima (1989) میزان D را ۲/۳۶۵ را نشان داد (P < ۰/۰۵) (جدول ۳).

با مقایسه هاپلوتیپ های نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین، مشخص شد یک هاپلوتیپ (هاپلوتیپ A) در بین آنها بصورت مشترک بود. بیشترین تعداد این هاپلوتیپ (۱۰ عدد) در نمونه‌های منطقه دریای خزر-آستارا و رودخانه سیاه درویشان مشاهده گردید که به ترتیب دارای ۵ و ۴ هاپلوتیپ نادر بودند. رودخانه جفرود و ماسوله به ترتیب دارای ۷ و ۸ هاپلوتیپ که از این تعداد به ترتیب ۴ و ۳ هاپلوتیپ نادر بودند. تعداد ۲ هاپلوتیپ مشترک J و J1 نیز، در بین نمونه های مناطق جنوبی دریای خزر مشخص گردید.

[1] Transitional substitutions
[2] Purine
[3] Pyrimidine
[4] Chi-square analyses
[5] Align
[6] Insertion/Deletion
[7] Transitions

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جدول ۳: آزمون بی طرفی Tajima برای توالی منطقه کنترل mtDNA

M	S	p_s	Θ	π	D
۶۸	۲۱۴	۰/۶۷۵	۰/۲۸۶	۰/۲۱۵	۳/۱۲۰

M: تعداد جایگاه‌ها؛ **S** : تعداد جایگاه‌های متفرق[1]؛ p_s، **Θ**، S/m: p_s/a_1؛ **π**: تنوع نوکلئوتیدی

جدول ۴: توزیع هاپلوتیپ‌های منطقه کنترل mtDNA شاه میگوی آب شیرین در مناطق مختلف

شماره	هاپلوتیپ / مناطق	دریاچه ارس	سیاه درویشان	رودخانه ماسوله رودخان	رودخانه جفرود	تالاب انزلی	خزر-کیاشهر	خزر-آستارا
۱	A	۵	۲	۳	۲	۸	۱۰	۳
۲	A1	۱	۰	۰	۰	۴	۳	۱
۳	A2	۲				۱		
۴	A3					۱	۲	
۵	A4	۱						
۶	A5	۱					۱	۱
۷	B	۱	۹	۱		۲	۱	
۸	B1		۱	۱		۱		
۹	B2		۱					
۱۰	B3		۱					
۱۱	C		۱	۴		۱		
۱۲	C1			۱				
۱۳	C2			۱		۱		
۱۴	D		۱		۱۱	۱		
۱۵	D1				۲		۱	
۱۶	D2				۱			
۱۷	D3			۱				
۱۸	D4			۱				
۱۹	E				۱			
۲۰	F							۱
۲۱	G							
۲۲	G1							
۲۳	G2							
۲۴	G3							
۲۵	H							
۲۶	H1	۱						
۲۷	H2	۱						
۲۸	I	۷						
۲۹	J						۱	۹
۳۰	J1						۱	۱
۳۱	K							۱
۳۲	K1							۱
۳۳	K2							۱
۳۴	L		۱					
۳۵	L1		۱					
۳۶	M							۱
۳۷	P				۲			
۳۸	P1				۱			

[1] Segregating sites

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

تعداد ۹ هاپلوتیپ در نمونه های تالاب انزلی و دریاچه سد ارس مشاهده شدند. هاپلوتیپ B در بین نمونه‌های رودخانه سیاه درویشان، هاپلوتیپ D در بین نمونه‌های رودخانه جفرود و هاپلوتیپ J در بین نمونه‌های منطقه آستارا، بیشترین تعداد را داشتند. همچنین هاپلوتیپ A3 بین نمونه‌های تالاب انزلی و منطقه خزر-کیاشهر مشترک بود. در جدول ۵ هاپلوتیپ‌های نمونه‌های مناطق بصورت کامل، نتایج تنوع هاپلوتیپی (h) و تنوع نوکلئوتیدی (π) منطقه کنترل DNA میتوکندری شاه‌میگوی آب شیرین به همراه نتایج آزمون‌های D و Fs آورده شده است. با توجه به جدول ۵ مشخص گردد که میانگین تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در کل نمونه ها به ترتیب برابر با ۰/۰۴۹ ± ۰/۸۱۱و ۰/۰۰۳۸ ± ۰/۰۱۲۷ بود. همچنین بیشترین تنوع هاپلوتیپی مربوط به منطقه آستارا و مقدار ۰/۰۳۶ ± ۰/۸۹۶ بدست آمد. بیشترین تنوع نوکلئوتیدی نیز مربوط به همین ناحیه بود که مقدار ۰/۰۰۲۱ ± ۰/۰۱۹۸ داشت. دامنه تنوع هاپلوتیپی در کل مناطق بین ۰/۰۱ ± ۰/۷۳۸ در تالاب انزلی تا ۰/۰۳۶ ± ۰/۸۹۶ در منطقه آستارا متغیر بود (جدول ۶). نتایج آزمون Fs بجز رودخانه ماسوله معنی‌دار بودند ولی آزمون‌های D معنی‌دار نبودند. همچنین بین هاپلوتیپ‌های نادر با پراکنش تاریخی جمعیت‌ها ارتباطی مشاهده نشد.

در بررسی حاضر آنالیز داده ها مقدار سطح معنی‌داری مربع کای و اختلاف فراوانی هاپلوتیپ‌های ناحیه کنترل mtDNA وجود گروه‌های مختلفی از شاه‌میگوی آب شیرین را در مناطق نمونه برداری تایید می کند. علاوه بر این، نتایج نشان دادند که فراوانی هاپلوتیپی نمونه های شاه میگوی آب شیرین منطقه آستارا، رودخانه سیاه درویشان، جفرود، با سایر نمونه‌های شاه میگو از مناطق کیاشهر، ارس، تالاب انزلی و رودخانه ماسوله رودخان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($p <$ ۰/۰۰۰۱) و آنالیز مربع کای با روش Mont-Carlo ضمن تائید این مسئله نشان داد که جمعیت این مناطق اختلاف فراوانی هاپلوتیپی زیادی با دیگر نمونه‌ها دارد که بیانگر وجود جمعیت‌های متمایز می‌باشد. بیشترین اختلاف فراوانی هاپلوتیپی نمونه‌های منطقه آستارا در ناحیه جنوبی دریای خزر با دریاچه ارس ($p <$ ۰/۰۰۰۱ ، $\chi^2 =$ ۱۵۶/۴۳) و بعد از آن در نمونه‌های رودخانه سیاه درویشان با نمونه-های دریاچه ارس بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($p <$ ۰/۰۰۰۱، $\chi^2 =$ ۱۵۴/۵۲). کمترین اختلاف فراوانی هاپلوتیپی نیز بین نمونه‌های مناطق تالاب انزلی و دریاچه ارس ($p <$۰/۱۸۵۹، $\chi^2 =$ ۱۳/۱) و بعد از آن بین نمونه‌های مناطق تالاب انزلی، کیاشهر ($p <$ ۰/۱۷۶۶، $\chi^2 =$ ۱۹/۸۶) مشاهده گردید (جدول ۶).

نتایج آزمون AMOVA در جدول ۷، نشان می دهد که اختلاف معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۰۱) در نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین در بیشتر مناطق نمونه‌برداری وجود دارد. همچنین نتایج ان بررسی نشان داد که در برخی از مناطق تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای وجود دارد و به این ترتیب شاه میگوی آب شیرین از وجود چند جمعیت مختلف برخوردار است بطوری‌که مقدار ۷۱/۲۵ ٪ واریانس بین نمونه‌های مناطق ($p <$ ۰/۰۰۱)، ۹/۰۷٪ واریانس بین نمونه‌ها و درون جمعیت‌ها ($p =$ ۰/۰۲۸۵) و ۱۹/۶۸ ٪ نیز در بین جمعیت‌ها بدست آمد ($P <$ ۰/۰۰۱) که خود نشان دهنده این مسئله است که بیشتر تنوع ژنتیکی شاه-میگوی آب شیرین در بین مناطق است (جدول ۷).

نتایج بررسی شاخص تمایز (F_{ST}) بر اساس روش دوپارمتری Kimura (Felsenstein, 2013) نشان داد که بین نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین از ۷ منطقه مختلف تنوع ژنتیکی قابل قبولی وجود دارد چنانچه در بین نمونه-های برخی از مناطق، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده گردید ($P <$ ۰/۰۰۱ ، $F_{ST} =$ ۰/۲۴۱۶) و در بعضی از موارد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۸).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جدول ۵: تنوع هاپلوتیپی ($h \pm$ S.D) و تنوع نوکلئوتیدی ($\pi \pm$ S.D)، آزمون‌های D تاجیما و Fu's FS و شاخص هارپدینگ

مناطق	تعداد هاپلوتیپ	π	h	Fu's F_S	آزمون D تاجیما	شاخص هارپدینگ (r)
دریای خزر- آستارا	۱۰	۰/۰۱۹۸ ± ۰/۰۰۲۱	۰/۸۹۶ ± ۰/۰۳۶	-۴/۵۷۹*	-۰/۷۲۱۱	۰/۰۴۲۸۱
دریای خزر-کیاشهر	۸	۰/۰۰۹۲ ± ۰/۰۰۳۴	۰/۷۴۹ ± ۰/۰۵۲	-۱/۶۸۰*	-۰/۵۴۰۸	۰/۰۱۴۶۴
تالاب انزلی	۹	۰/۰۰۹۹ ± ۰/۰۰۸۹	۰/۷۳۸ ± ۰/۰۱	-۰/۷۴۳	-۰/۸۶۳۴	۰/۰۱۰۳۷
رودخانه جفرود	۷	۰/۰۱۵۴ ± ۰/۰۰۵	۰/۸۳۶ ± ۰/۰۹۲	-۵/۶۳۷*	-۰/۶۲۱۱	۰/۰۰۸۸
رودخانه ماسوله رودخان	۸	۰/۰۱۲۷ ± ۰/۰۰۲	۰/۸۲۲ ± ۰/۰۶	-۳/۴۰۵*	۰/۱۴۶۸	۰/۰۱۹۸
رودخانه سیاه درویشان	۹	۰/۰۱۲۲ ± ۰/۰۰۷۸	۰/۸۶۵ ± ۰/۰۶۸	-۳/۹۸۹*	-۰/۹۸۷۷	۰/۰۰۷۳۲*
دریاچه سد ارس	۹	۰/۰۱۰۲ ± ۰/۰۰۱	۰/۷۷۳ ± ۰/۰۸	-۰/۵۰۱*	-۰/۵۳۰۳	۰/۰۱۹۷۷
جمع	**۳۸**	**۰/۰۱۲۷ ± ۰/۰۰۳۸**	**۰/۸۱۱ ± ۰/۰۴۹**			

* در آزمون‌های D تاجیما و Fu's FS و شاخص هارپدینگ معنی دار بودن با علامت ستاره نشان داده شده است.

جدول ۶: مقایسه آماری مربع کای در بین شاه‌میگوی آب شیرین مکان‌های مختلف نمونه‌برداری

مناطق	آستارا	کیاشهر	تالاب انزلی	رودخانه جفرود	رودخانه ماسوله	رودخانه سیاه درویشان
دریای خزر-کیاشهر	۱۴۹/۲ (۰/۰۰۰۰)	-				
تالاب انزلی	۱۱۳/۷ (۰/۰۰۰۰)	۱۹/۸۶ (۰/۱۷۶۶)	-			
رودخانه جفرود	۹۸/۴۷ (۰/۰۰۰۰)	۴۳/۶ (۰/۰۵۷۶)	۲۵/۶۴ (۰/۰۵۴۲)	-		
رودخانه ماسوله رودخان	۸۶/۳۴ (۰/۰۰۰۰)	۳۸/۲۲ (۰/۰۰۸۴)	۲۱/۰۸ (۰/۰۴۵۰)	۱۳۱/۵۲ (۰/۰۰۰۰)	-	
رودخانه سیاه درویشان	۱۳۸/۲ (۰/۰۰۰۰)	۸۷/۶۹ (۰/۰۰۰۰)	۸۹/۶۲ (۰/۰۰۰۰)	۹۶/۲۷ (۰/۰۰۰۰)	۹۴/۲ (۰/۰۰۰۰)	-
دریاچه ارس	۱۵۶/۴۳ (۰/۰۰۰۰)	۱۵/۳۳ (۰/۰۵۴۹)	۱۳/۱ (۰/۱۸۵۹)	۸۷/۴۷ (۰/۰۰۰۰)	۲۹/۵۳ (۰/۰۰۲۶)	۱۵۴/۵۲ (۰/۰۰۰۰)

* درون پرانتز سطح معنی‌داری نشان داده شده است.

جدول ۷ : نتایج آزمون AMOVA بین نمونه‌های شاه‌میگوی آب شیرین

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد تغییرات	F_{ST}	P
بین جمعیت‌ها	۶	۱۹/۶۸	۰/۱۷۸۴	<۰/۰۰۱
بین نمونه‌ها، درون جمعیت‌ها	۶	۹/۰۷	۰/۰۷۵۶۳	۰/۰۲۸۵
در نمونه‌ها	۱۳۱	۷۱/۲۵	۰/۲۴۱۶	<۰۰۱

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جدول ۸: مقدار مقایسه شاخص F_{ST} و آزمون دقیق* در بین نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین در مناطق مختلف

منطقه	آستارا	کیاشهر	تالاب انزلی	رودخانه جفرود	رودخانه ماسوله رودخان	سیاه درویشان	دریاچه ارس
دریای خزر-کیاشهر	۰/۱۹۴	.	−	+	−	+	−
تالاب انزلی	۰/۱۲۷	۰/۰۴۵	.	+	+ −	+ −	−
رودخانه جفرود	۰/۲۳۵	۰/۱۸۴	۰/۲۱۲	.	+	+	+
رودخانه ماسوله رودخان	۰/۲۲۸	۰/۰۸۲	۰/۰۱۵	۰/۲۰۱	.	− +	+ −
رودخانه سیاه درویشان	۰/۱۸۹	۰/۲۳۰	۰/۱۹۳	۰/۱۹۹	۰/۲۱۶	.	− +
دریاچه ارس	۰/۲۶۷	۰/۰۶۱	۰/۰۴۸	۰/۲۴۴	۰/۰۸۳	۰/۱۹۰	.

* علامت‌های − = معنی دار نبودن در دو آزمون F_{ST} و آزمون دقیق . − + = معنی‌دار نبودن F_{ST} و معنی‌دار بودن آزمون دقیق،
+− = معنی‌دار بودن F_{ST} و معنی‌دار نبودن آزمون دقیق و + = معنی‌دار بودن در دو آزمون F_{ST} و آزمون دقیق را نشان می‌دهد.

همچنین نتایج شاخص تمایز F_{ST} و آزمون دقیق نشان دادند که در منطقه آستارا از سواحل جنوبی دریای خزر، رودخانه سیاه درویشان و جفرود با دیگر نمونه‌های شاه-میگوی آب شیرین از مناطق کیاشهر، ارس، تالاب انزلی و رودخانه ماسوله رودخان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($p <$ ۰/۰۰۱). نتایج آزمون AMOVA نیز نشان داد که بین نمونه‌های منطقه آستارا، رودخانه سیاه درویشان و جفرود اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p <$ ۰/۰۰۱). بعد از انجام ضریب تصحیح Bonferroni ($p =$ ۰/۰۰۲) نیز بعضی از اختلافات موجود بین مناطق معنی‌دار نبودند ولی اختلاف بین نمونه‌های مناطق آستارا، رودخانه سیاه درویشان و جفرود معنی‌دار باقی ماند ($p <$ ۰/۰۵). بین سایر مناطق قبل و بعد از آزمون Bonferroni هیچ‌گونه اختلافی مشاهده نگردید (جدول ۹).

با توجه به جدول مشخص می شود دامنه F_{ST} نمونه‌های شاه میگوی آب شیرین، از ۰/۰۱۵ بین تالاب انزلی و رودخانه ماسوله رودخان تا ۰/۲۶۷ بین نمونه‌های منطقه خزر-آستارا و دریاچه ارس متغیر است. بیشترین اختلاف F_{ST} در تمام مناطق مختلف بین نمونه‌های منطقه آستارا و دریاچه ارس با مقدار ۰/۲۶۷ بدست آمد (جدول ۹). در مجموع، یافته های بررسی توالی‌یابی ناحیه کنترل DNA میتوکندری شاه‌میگوی آب شیرین بر اساس نتایج آزمون AMOVA و همچنین شاخص تمایز F_{ST} و آزمون دقیق نشان داد که می‌توان سه جمعیت مختلف را در نظر گرفت که شامل جمعیت‌های منطقه آستارا، رودخانه جفرود و رودخانه سیاه درویشان می‌باشند.

بحث و نتیجه گیری

کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط جهان موجب شده تا محققین جهت مدیریت ذخایر به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه‌های با ارزش روی آورند و بخوبی اثبات شده که ژنتیک جمعیت آبزیان و مدیریت شیلات رابطه بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند. از طرفی یکی از عمده‌ترین مسائل در ژنتیک جمعیت، شناخت تفاوت‌ها بین جمعیتهای مناطق در محدوده جغرافیایی پراکنش آنها است که می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیریت شیلاتی از جمله بهره‌برداری پایدار و حفاظت از تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. لذا با توجه به اهمیت موضوع این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی گونه مهم شاه میگوی آب شیرین در مناطق مختلف کشور پرداخت.

نتایج این تحقیق نشان داد که منطقه کنترل DNA میتوکندری از تنوع بالایی برخوردار بوده و وجود سه

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

جمعیت شامل منطقه آستارا، رودخانه سیاه درویشان و جفرود اثبات می نماید. در تایید این مطلب می توان به نقش موثر حلقه D در مطالعات مختلف تاکید کرد. با توجه به یافته‌های محققین، حلقه D به عنوان قسمتی از ناحیه کنترل معرفی می‌شود که از منطقه آغاز همانند سازی رشته سنگین (OH) شروع و تا توالی پیوسته انتهایی (TAS[1]) ادامه دارد. علاوه بر وظیفه این قسمت‌ها نواحی چپ و راست بوسیله جهش‌های طولی و جانشینی‌های بازی به سرعت تغییر می‌یابند (Clayton, 1991). اما به دلیل حذف و الحاق بالا توزیع جهش‌ها در منطقه کنترل می‌تواند در بین گونه‌ها تغییر یابد. امروزه مطالعات گسترده‌ای از توالی‌یابی منطقه کنترل در آبزیان منتشر شده است (Baric *et al.*, 2005; Nazari *et al.*, 2013; Khoshkholgh *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014).

بنابر نظریات محققین، مطالعاتی که بر اساس توالی‌یابی منطقه کنترل صورت می‌پذیرد، ساختار فیلوژنتیکی گونه‌های نزدیک بهم و همچنین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آبزیان را معلوم می‌سازد (Avise, 1994) و در این مطالعه نیز این ناحیه از DNA میتوکندری تنوع قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در تحقیقات مختلف در برخی از گونه‌های سخت پوستان نظیر میگو وجود ساختار ژنتیکی جمعیت گزارش و دلایل متعددی از جمله فاکتورهای محیطی، مکانیسم‌های رفتاری برای توجیه این ساختار عنوان گردیده است (Aubert and Lightner 2000; Garcia Machado *et al.*, 2001).

تعداد هاپلوتیپ‌هایی که در این بررسی مشاهده شدند نشان از سطوح بالای چندشکلی در این قسمت از مولکول mtDNA دارد. همچنین در این بررسی با روش توالی یابی منطقه کنترل DNA میتوکندری تعداد ۳۸ هاپلوتیپ مشخص گردید که در مقایسه با دیگر محققان نظیر Chu و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی میگوی موزی[2] که با استفاده از ۴ آنزیم برشگر ۱۵ هاپلوتیپ بدست آوردند بیشتر بوده و نسبت به مطالعه Valles-Jimenez و همکاران (۲۰۰۶) که با بررسی جمعیت‌های میگوی سفید[3] با استفاده از ۴ آنزیم ۴۸ هاپلوتیپ بدست آوردند، کمتر بود. در مطالعه حاضر میانگین تنوع هاپلوتیپی در شاه میگوی آب شیرین بالا بوده و نسبت به میگوی ببری[4] که با روش PCR-RFLP و استفاده از ۵ آنزیم برشگر عدد ۰/۵۳۷ بدست آمده بود (Klinbunga *et al.*, 1998)، بیشتر بود. همچنین در بررسی‌های دیگر بر روی گونه میگوی ببری با استفاده از ۱۱ آنزیم و ژنهای COI–COII مولکول mtDNA، تنوع هاپلوتیپی مشابهی ۰/۸۶۴ و ۰/۸۵۵ (Klinbunga *et al.*, 1999) بدست آمد.

نتایج این بررسی همچنین نشان داد که نمونه‌هایی که در رودخانه‌ها صید شده بودند، در مقایسه با نمونه‌های دریایی این گونه از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای برخوردارند. مطالعات اولیه با استفاده از الکتروفورز پروتئین نشان داد که گونه خرچنگ دراز آب شیرین در مقایسه با دیگر گونه‌های شاه میگو از هتروزیگوسیتی پایین‌تری برخوردار است (Crandall, 1997). با وجود این مطلب، تنوع داده‌های آلوزایمی در شاه‌میگوی آب شیرین[5] توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Fevolden and Hessen ,1989; Agerberg ,1990; Fevolden *et al.*, 1994). به عنوان مثال، Agerberg در سال (۱۹۹۰) در چهار جمعیت مورد بررسی از شاه‌میگوی آب شیرین در سوئد و لهستان تنوعی ژنتیکی قابل مشخصی را مشاهده نکرد این در حالی است که Fevolden و Hessen در سال (۱۹۸۹) و Fevolden و همکاران (۱۹۹۴) اختلاف معنی‌داری را از نظر ژنتیکی در جمعیت‌های نروژ در این گونه گزارش و اذعان داشتند که احتمالا جمعیت‌های نروژی از سوئد آورده شده‌اند و علت اختلاف ژنتیکی مورد بحث را اثر بنیانگذار[6] و رانش ژنتیکی عنوان نمودند.

[1] Termination association sequence
[2] *Fenneropenaeus merguiensis*
[3] *Litopenaeus vannamei*
[4] *P. monodon*
[5] *A. astacus*
[6] Founder

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

فاصله ژنتیکی بدست آمده در این بررسی با استفاده از توالی‌یابی اختلاف معنی‌داری را بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین داده‌های این بررسی با یافته‌های Schulz در سال (۲۰۰۰) همخوانی داشت و مشخص گردید جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی به یکدیگر نزدیکتر هستند، شباهت ژنتیکی زیادتری دارند. با این توضیح که ممکن است سازگاری منطقه‌ای یا جدایی اجداد در این رابطه نقش موثری داشته باشد. در همین رابطه، Agerberg (۱۹۹۰) با استفاده از روش اللوزایم تنوع ژنتیکی سه گونه شاه میگوی آب شیرین، شاه میگوی بازو باریک[1] و میگوی راهنما[2] را مورد بررسی قرار داد و از ۲۱ آنزیم مورد استفاده، تعداد ۱۵ آنزیم را برای مطالعه تنوع ژنتیکی وفیلوژنتیکی بین سه گونه مناسب دانستند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر Alaranta و همکاران (۲۰۰۶) تنوع ژنتیکی شاه میگوی آب شیرین را در سه کشور سوئد، فنلاند و استونی با استفاده از توالی‌یابی ناحیه *ITS1* مورد بررسی و نشان دادند جمعیت‌های منطقه فنلاند بدلیل تبادل و ذخیره‌سازی مناطق مختلف با یکدیگر اختلافی نداشتند ولی دو جمعیت از ۵ جمعیت سوئد اختلاف داشتند و در نهایت ناحیه *ITS1* به عنوان یک نشانگر برای مطالعات این گونه و گونه‌های مشابه معرفی گردید. تحقیقات بیشتری از جمله اندازه جمعیت، کیفیت محیط زیست و تنوع ژنتیکی در سطح ژن‌های مختلف می‌تواند به ارزیابی محدودیت‌های محیط زیستی یا رانش ژنتیکی در کنار تفکیک ژنتیکی جمعیت‌های مختلف، برای مشخص نمودن ساختار جغرافیایی جمعیت‌های خرچنگ دراز آب شیرین کمک نماید.

شاخص تمایز F_{ST}، آزمون دقیق و همچنین آزمون هتروژنی نشان داد که اختلاف فراوانی ژنی متفاوتی در جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. در این بررسی ساختار جمعیتی معنی‌داری در بین همه نمونه‌ها در رودخانه‌ها و دریای خزر مشخص گردید. نتایج داده‌های توالی‌یابی منطقه کنترل DNA میتوکندری وجود حداقل سه گروه ژنتیکی را مشخص نمود که سه جمعیت رودخانه سیاه درویشان و جفرود و ناحیه آستارا اختلاف زیادی از نظر ژنتیکی نشان دادند. علی‌رغم فاصله جغرافیایی نزدیک جمعیت‌های مختلف نظیر رودخانه سیاه درویشان و جفرود اختلاف معنی‌داری را از خود نشان دادند. این در حالی است که نمونه‌های ارس با فاصله زیاد از نمونه‌های دیگر مناطق، شباهت ژنتیکی داشت و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشخص نگردید و این مسئله نیازمند مشخص نمودن منشاء ژنتیکی این منطقه در مطالعات آینده می‌باشد. با توجه به شاخص تمایز F_{ST} بیشتر جمعیت‌ها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. این نتایج می‌تواند در برنامه‌ریزی مدیریت استراتژیک بازسازی ذخایر مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، تعداد دو جمعیت رودخانه ماسوله رودخان و ناحیه کیاشهر در دریای خزر اختلاف ژنتیکی کمی در مقایسه با دیگر جمعیت‌ها از خود نشان دادند. از جمله دلایل اختلاف بین نمونه‌های آستارا با دیگر مناطق می‌توان به این مسئله اشاره نمود که شرایط محیطی دریای خزر و همچنین ترجیح دادن مناطق کم عمق دریا و مصب‌ها در دوره لاروی و جوانی می‌تواند ساختار ژنتیکی شاه میگوی آب شیرین را در بلندمدت با تغییر در فراوانی ژنی در کنار نوسانات اندازه جمعیت تحت تاثیر قرار دهد (Cristescu *et al.*, 2005).

یافته های این تحقیق نشان داد که نشانگرهای mtDNA ابزار مناسبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه شاه میگوی آب شیرین می باشند. اگرچه برخی جمعیت‌ها شباهت ژنتیکی از خود بروز دادند و نشان از اختلاط جمعیت‌ها داشت. جمعیت‌های منطقه آستارا در دریای خزر حاکی از جدا بودن این گروه از دیگر جمعیت‌ها بود. بدلیل اینکه جمعیت‌های طبیعی بیشتر در شمال کشور وجود دارد به طور قطعی نمی‌توان عنوان نمود اختلاف ژنتیکی موجود مربوط به چندشکلی اجدادی این گونه بوده یا تحت تاثیر معرفی این گونه به دریاچه ارس بوده است. در مطالعات آینده مقایسه تنوع ژنتیکی در مزارع

[1] *A. leptodactylus*
[2] *Pacifastacus leniusculus*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

پرورشی، دریاچه‌های ذخیره سازی شده از این گونه و یا با مقایسه با ذخایر طبیعی کشورهای همسایه نظیر آذربایجان و ترکیه می‌تواند به مطالعه جامع ژنتیکی جمعیت‌های گونه شاه میگو کمک نماید. همچنین استفاده از نمونه‌های قدیمی و همچنین بکارگیری دیگر روش‌های مطالعات تنوع ژنتیکی نظیر ریزماهواره‌ها[1] و SNP[2] و مقایسه با مطالعه حاضر بررسی‌های تنوع ژنتیکی و تکاملی اختلاف ژنتیکی را تسهیل می‌سازد.

تشکر و قدردانی

حمایت مالی این تحقیق با کد مصوب ۸۹۰۰۴۴۸۰ توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور صورت پذیرفت و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند به جهت حمایت‌های اجرایی و مالی این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از کلیه کسانی که در طول انجام این تحقیق بخصوص در جمع‌آوری نمونه‌ها کمک نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

بابایی، م. ۱۳۸۱. بررسی مولکولی ۳ گونه میگوی دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از mtDNA به روش RFLPs. پایان نامه دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۷۵ صفحه.

رضوانی گیل کلایی، س.، بابایی، س.ع و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن زیر واحد ۱ سیتوکروم اکسیداز (*COI*) به روش RFLP. مجله علمی شیلات ایران. (۲) ۱۰، ۱۹- ۱۵.

شکوهمند، م.، ذوالقرنین، ح.، لالویی، ف.، فروغمند، ع. و سواری الف.، ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی میگوی سفید (*Metapenaeus affinis*) در سواحل خلیج فارس (استان خوزستان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای. مجله علمی شیلات ایران. (۳) ۲۰، ۴۵-۵۴.

نهاوندی، ر.، رضوانی گیل کلایی، س.، وثوقی، غ و کاظمی، ب. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژن 18s rRNA در جمعیت ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از روشPCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران. (۲) ۱۴، ۱۶۸- ۱۵۷.

Agerberg A., 1990. Genetic variation in three species of freshwater crayfish, *Astacus astacus L.*, *Astacus leptodactylus Aesch*. and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis. Hereditas, 113, 101-108.

Alaranta, A., Henttonen, P., Jussila, J., Kokko, H., Prestegaard, T., Edsman, L., and Malmekyto, M., 2006. Genetic differences among noble crayfish (Astacus astacus) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the ITS1 region. Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture, 965-975.

Aubert, H, and Lightner, DV., 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. Marine Biology 137:875–885.

Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.

Baric, S., Hollrigl A., Fureder L. and Dalla Via J., 2005. Mitochondrial and microsatellite analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in

[1] Microsatellite
[2] Single Nucleotide Polymorphism

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

South Tyrol (Italy) and Tyrol (Austria). Bulletin Francais dela Peˆche et de la Pisciculture, 376–377, 599–612.

Billington, N and Strange, R. M., 1995. Mitochondrial DNA Analysis Confirms the Existence of a Genetically Divergent Walleye Population in Northeastern Mississippi. Transactions of the American Fisheries Society 5, 770–776.

Brown, K.H., 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. Journal of Fish Biology 72, 355–374.

Chu, K. H., Li, C. P., Tam, Y. K., and Lavery, S., 2003. Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp Penaeus. Molecular Ecology 3, 120–122.

Chiesa, S., Scalici, M., Negrini, R., Gibertini, G. and Marzano, F.N., 2011. Fine-scale genetic structure, phylogeny and systematic of threatened crayfish species complex.Molecular phylogenetics and evolution, 61 (1): 1–11

Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annual Review of Cell Biology. 7: 453-478.

Crandall, K.A., 1997. Genetic variation within and among crayfish species. Freshwater crayfish, 11, 135-145.

Cristescu, MEA and Hebert, PDN., 2005. The 'Crustacean Seas' an evolutionary perspective on the Ponto-Caspian peracarids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 62, 505–517.

Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., 2005. Arlequin Ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bioinformatics, 1: 47–50.

Fetzner, J.W., Crandall, K.A., 1999. Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*): a comparison using amplified fragment length polymorphism (AFLPs) and mitochondrial 16s gene sequences. Freshwater Crayfish, 12, 396-412.

Fevolden, S.E., and Hessen, D.O., 1989. Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). Hereditas, 110, 149-158.

Fevolden, S.E., Taugbøl, T., and Skurdal, J., 1994. Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management. Aquaculture and Fisheries Management, 25, 927-935.

Felsenstein, J., 2013. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.695. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Fu, Y. X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. Gene 147:915–925.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

Gouin, N., Grandjean, F., Bouchon, D., Reynolds, J.D., and Souty-Grosset, C., 2001. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. Heredity, 87, 80-87.

Gouin, N., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., and Grandjean, F., 2002. High dispersal ability of *Austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a French brook. Bulletin France Pêche Piscic., 367, 681-689.

Garcia-Machado, E, Robainas, A, Espinosa, G, Oliva, M, Pa´ez, J, Verdecia, N, and Monnerot, M., 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda).Marine Biology 138:701–707.

Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., and Crandall, K.A., 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda:Astacidae). Journal of Crustacean Biology, 20 (3), 522-529.

Gross, R., Ko ˜iv, S., P. K. Prestegaard, T., Jussila, J., Paaver, T., Geist, J., Kokko, H., Karjalainen, A., and Edsman, L., 2013. Microsatellite markers reveal clear geographic structuring among threatened noble crayfish (*Astacus astacus*) populations in Northern and Central Europe. Conservation genetic. DOI 10.1007/s10592-013-0476-9

Haye, P. A., Tam, Y. K., and Kornfield, I., 2002. Molecular phylogenetics of mole crabs (Hippidae: Emerita). Journal of Crustacean Biology 22, 903–915.

Harlioğlu, M.M., 2008. The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. Aquaculture International 16: 351-360.9145-7.

Harpending, H.C., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology, *66*, 591–600.

Hillis, D and Moritz, M. C., 1990. Molecular taxonomic. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.

Karimpour., M., Harlioğlu, M.M., and Aksu, Ö. 2011. Status of freshwater crayfish *(Astacus leptodactylus)* in Iran. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (2011) 401, 18.

Khoshkholgh, MR., Pourkazmi, M., Nazari, S., Azizzadeh, L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequence analysis. Caspian Journal of Environmental Sciences 9(2), 27-36.

Klinbunga, S, Penman, DJ, McAndrew, BJ, and Tassanakajon A.,1999. Mitochondrial DNA diversity in three populations of the

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

Giant Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Marine Biotechnology 1:113–121

Klinbunga, S, Penman, DJ, McAndrew, BJ, Tassanakajon, A, and Jarayabhand, P., 1998. Genetic variation, populations differentiation, gene flow of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) inferred from mtDNA-RFLP data. In: Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Kretz, K.A., and O'Brien, J. S., 1993. Direct sequencing of polymerase chain reaction products from low melting temperature agarose. Methods in Enzymology 218:72–79.

Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics **25:** 1451-1452.

Liua, Z.J. and Cordes. J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1 –37.

Nazari, S., Pourkazemi, M., Khoshkholgh, MR. and Azizzadeh, L., 2013. Population structure and variation in Persian sturgeon (*Acipenser percicus*) from the Caspian Sea as determind from mitochondrial DNA sequences of the control region. Progress in Biological Sciences, 3(2), 67-80.

Nei, M and Tajima, M., 1981. Molecular evolutionary genetics. New York, NY: Columbia University Press.

Pourkazemi, M., Nazari, S., Khoshkholgh, MR. and Azizzadeh, L., 2012. Genetic Relationships among Populations of the Persian sturgeon, *Acipenser percicus*, in the south Caspian Sea Detected by Mitochondrial DNA–Restriction Fragment Length Polymorphisms.. Caspian Journal of Environmental Sciences 10(2), 215-226.

Raymond, M. and Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. Evolution 49, 1280-1283.

Schubart, C.D., Neigel, J.E. and Felder, D.L., 2000. Use of mitochondrialb16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. Crustacea 12, 817–830.

Schulz, R., and Sypke, J. 1999. Freshwater crayfish populations *Astacus astacus* (L.) in Northeast Brandenburg (Germany): Analysis of Genetic Structure using RAPD-PCR. Freshwater Crayfish, *12*, 387-395.

Schulz, R., 2000. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations. Bulletin France Pêche Piscic., 356, 123-138.

Schulz, H.K., Smietana, P and Schulz, R., 2004. Assessment of DNA variation of Noble crayfish (*Astacus astacus*) in Germany and Poland using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). Bulletin France Péche.piscis, 372-373: 387-399.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

Stucki, T.P., 1999. Life cycle and life history of *Astacus leptodactylus* in Chatzensec Lake (Zurich) and Lake Ageri in Switzerland. Freshwater Crayfish, 12, 430–448.

Tajima, F., 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585-595.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Tong, J. G., Chan, T. Y., and Chu, K. H., 2000. A preliminary phylogenetic analysis of Metapenaeopsis (Decapoda: Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the Indo-West Pacific. Journal of Crustacean Biology 20, 543–551.

Valles-Jimenez, R., Gaffney, P. M. and Perez-Enriquez, R., 2006. RFLP analysis of the mtDNA control region in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) populations from the eastern Pacific. Marine Biology, 148 ,(4), 867.

Wang, J., Yang, M, Sun, C Yang, Z Cui, In K Jang, and L Song., 2014. The genetic diversity and differentiation of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in the Yellow Sea revealed by polymorphism in control region of mitochondrial DNA. International Scientific Journal 11: 309-318.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]

Population genetic structure analysis of the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) in different region inferred from mtDNA control region sequencing

Majidreza Khoshkholgh[1*], Sajad Nazari [2]

*mkhoshkholgh2012@gmail.com

1- Faculty of Natural Resources, University of Guilan, P.O. Box 1144 Sowmehsara, Iran
2- Cold-water Fishes Genetic and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yasouj, Iran

Received: September 2015 Accepted:March 2016

Keywords: freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*, mtDNA, Caspian Sea, Aras River

Abstract

In this study population genetic structure of freshwater crayfish *(Astacus leptodactylus)* in Iran was investigated using direct sequencing of mtDNA control region. A total of 132 samples were collected from the different locations. The quality and quantity of total DNA were determined by agarose gel electrophoresis ethidium bromide staining and spectrophotometery, respectively. The results showed that 38 haplotypes were observed between samples in sequencing analyses. The haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity (π) were 0.811±0.049 and 0.0127±0.0038 sequencing techniques, respectively. Tajima's D and chi-square ($\chi^{2)}$ values were 3.120 and 78.25, respectively. The significant positive D value for the samples might suggest balancing selection. Significantly negative Fu's *Fs* values and significantly positive *Harpending test* values were taken as evidence of a population expansion.The results of F_{ST} ,Exact test and analysis of molecular variance (AMOVA) demonstrated that samples between Siahdarvishan River , Jafrood River and Astara region in the southwest Caspian sea statistically are significant in sequencing techniques (P<0.0001).Therefore three distinct groups were identified. These results showed that haplotype distributions in different locations were significant and populations of Siahdarvishan River and Astara region statistically were significant (P < 0.0001). These results suggests that the unique genetic structure of Siahdarvishan River, Jafrood River and Astara region represent a highly valuable genetic resource and provide useful information for identifying populations and genetic improvemnet.

* Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.7.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110244]