



بررسی تأثیر مانع فیزیکی بر تمایز ژنتیکی ماهی قزل‌آلای خال قرمز (*Salmo caspius*) در رودخانه دلیچای در پارک ملی لار با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید

سیده نرجس طباطبائی^{۱*}، اصغر عبدلی^{۱*}، ایرج هاشم زاده سقرلو^۲، فراهم احمدزاده^۱ و لوئیس برناتچز^۳

^۱ گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم‌ها، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۲ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه لاول، کبک، کانادا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۳

طباطبائی، س.ن.، ا. عبدلی، ا. هاشم زاده سقرلو، ف. احمدزاده و ل. برناتچز. ۱۴۰۰. بررسی تأثیر مانع فیزیکی بر تمایز ژنتیکی ماهی قزل‌آلای خال قرمز (*Salmo caspius*) در رودخانه دلیچای در پارک ملی لار با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید. فصلنامه علوم محیطی. ۱۹(۱): ۸۹-۱۰۲.

سابقه و هدف: پارک ملی لار احتمالاً به‌عنوان بهترین و منحصر به فردترین زیستگاه قزل‌آلای خال قرمز در ایران است. این ماهی در دیگر زیستگاه‌های ایران به‌دلیل‌های مختلفی مانند تخریب زیستگاه‌ها، آلودگی، برداشت شن و ماسه، وجود سد در مسیر رودخانه‌ها، ورود گونه‌های غیر بومی، صید بیش از حد و دیگر تغییرهای ناشی از فعالیت‌های انسانی در معرض تهدید قرار گرفته است. رودخانه دلیچای، یکی از زیستگاه‌های اصلی ماهی قزل‌آلای خال قرمز، شرایط اکولوژیک متفاوتی نسبت به دیگر رودخانه‌های پارک ملی لار دارد. در این مطالعه با توجه به وجود مانع فیزیکی غیر قابل عبور در دهانه رودخانه دلیچای، ترکیب ژنتیکی ماهیان قزل‌آلای خال قرمز این رودخانه با ماهیان دریاچه‌ای مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از باله‌های جدا شده ماهیانی که با الکتروشوکر در رودخانه صید شده بودند و از باله‌های ماهیانی که در دریاچه با استفاده از قلاب صید شده بودند، استفاده شد. استخراج DNA با روش استخراج نمکی با یک تیمار RNAas برای از بین بردن مولکول‌های RNA انجام شد. برای مقایسه تفاوت‌های ژنتیکی میان ماهیان رودخانه دلیچای و دریاچه سد لار از روش تعیین توالی نسل جدید استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل‌های آماری، آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، خوشه‌بندی و تشخیص ترکیب ژنتیکی ماهیان و آماره F_{st} به کار گرفته شد.

نتایج و بحث: در نتایج آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ماهیان قزل‌آلای خال قرمز دریاچه و رودخانه دلیچای با توجه به اولین مؤلفه اصلی (۲۵/۱۱ درصد تغییرات) از یکدیگر جدا شدند. اما در راستای دیگر مؤلفه‌های اصلی با یکدیگر همپوشانی داشتند. تحلیل داده‌ها به روش خوشه‌بندی نیز در تمام گروه‌بندی‌ها، افراد متعلق به رودخانه دلیچای و دریاچه را به‌صورت دو گروه مجزا نشان داد که سهم هر یک از گروه‌های دلیچای و دریاچه در یکدیگر بسیار جزئی و ناچیز بود. همچنین میزان تمایز محاسبه شده در بین جمعیت‌های رودخانه دلیچای

و دریاچه معنی دار بود. دلیل این تمایز می‌تواند نبود امکان مهاجرت و دسترسی ماهیان رودخانه دلیچای به دریاچه سد لار و برعکس، به دلیل وجود تور فلزی در لوله‌های انتقال آب پایه پل جاده روی رودخانه در دهانه رودخانه دلیچای باشد. از سوی دیگر این احتمال نیز وجود دارد که ماهیان قزل‌آلای خال قرمز رودخانه دلیچای، رفتار ساکن بودن داشته و تمایلی به مهاجرت به دریاچه حتی در صورت نبود این مانع فیزیکی نداشته‌اند. رفتار ساکن بودن به دلیل کم بودن تراکم ماهیان و برآورده شدن نیازهای زیستی و زیستگاهی آن‌ها و نیاز نداشتن به مهاجرت پدید می‌آید.

نتیجه‌گیری: در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که ماهیان قزل‌آلای خال قرمز رودخانه دلیچای و ماهیان دریاچه ترکیب ژنتیکی متفاوتی داشته و به طور معنی داری از یکدیگر متمایز هستند. در هر صورت، تمایز بالای ماهیان رودخانه دلیچای و احتمال ایزوله شدن این جمعیت و عدم امکان دسترسی ماهیان دریاچه و دیگر رودخانه‌های پارک ملی لار به این رودخانه نیازمند بازنگری و اتخاذ روش‌های مدیریتی مطلوب‌تر و کارآمدتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تعیین توالی نسل جدید، تمایز ژنتیکی، مانع فیزیکی و *Salmo caspius*.

مقدمه

دو فرم مهاجر و ساکن دارد که به لحاظ ظاهری متفاوت هستند. فرم مهاجر که پس از ساخته شدن سد لار، احتمالاً به جای مهاجرت به دریای خزر، به دریاچه سد لار مهاجرت می‌کند، اندازه بزرگتر با خال‌های قرمز کمتر، رنگ تیره‌تر و لکه‌های سیاه ستاره‌ای شکل بیشتری دارد (Estève et al., 2017). پارک ملی لار یکی از منطقه‌های حفاظت‌شده در ایران است و تحت حفاظت سازمان محیط زیست قرار دارد و در حال حاضر صید این ماهی در آن‌جا ممنوع است (Sedighkia et al., 2018). اما جمعیت این ماهی در رودخانه لار نسبت به گذشته (قبل از احداث سد) رو به کاهش است (Fazli et al., 2011) و بیشترین تنوع زیستی در قسمت‌های شرق و جنوب شرقی پارک وجود دارد، که خارج از محدوده حفاظتی (زون طبیعت محدود شده) قرار دارد (Heidari, 2015). با توجه به اهمیت زیستی، اقتصادی و صید ورزشی قزل‌آلای خال قرمز (که تا سال ۱۳۹۱ به‌طور متوسط سالانه ۱۰ هزار مجوز صید با قلاب برای صید این گونه در دریاچه پشت سد لار صادر می‌شد)، حفظ ذخایر ژنتیکی این ماهی دارای اهمیت است (Abdoli, 2016; Abdoli and Naderi, 2008). در مطالعات مختلفی در پارک ملی لار مشخص شده است که متوسط طول کل و وزن ماهیان، ساختار سنی، شکل

ماهی قزل‌آلای خال قرمز^۱، از خانواده آزادماهیان است، که از نظر تکاملی، اقتصادی، صید ورزشی و زیبایی-شناختی دارای اهمیت می‌باشد، در ایران به دلیل تخریب زیستگاه‌ها، آلودگی، برداشت شن و ماسه، وجود سد در مسیر رودخانه‌ها، ورود گونه‌های غیر بومی، صید بیش از حد و دیگر تغییرهای ناشی از فعالیت‌های انسانی کاهش قابل توجهی یافته و در معرض تهدید قرار گرفته است (Abdoli, 2016; Abdoli and Naderi, 2008; Hashemzadeh Segherloo et al., 2009; Mostafavi et al., 2014). پراکنش اصلی این گونه در ایران، در حوضه جنوبی دریای خزر، حوضه ارومیه و حوضه نمک می‌باشد؛ و پارک ملی لار یکی از منطقه‌هایی است که بیشترین فراوانی قزل‌آلای خال قرمز را دارد و از بهترین زیستگاه‌های این ماهی محسوب می‌شود (Abdoli, 2016; Abdoli and Naderi, 2008). رودخانه‌های کمابیش بکر و وجود زیستگاه‌های آبی متنوع (چشمه‌ها و نهرها با شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف و دریاچه سد لار)، بر اهمیت و منحصر به فرد بودن پارک ملی لار افزوده است (Abdoli et al., 2016). ماهیان این ناحیه تحت تأثیر فعالیت‌های پرورش و بازسازی ذخیره‌ها نبوده‌اند، بنابراین می‌توان آن‌ها را به عنوان یک جمعیت وحشی و طبیعی در نظر گرفت. قزل‌آلای پارک ملی لار،

خواهند کرد.

بنابراین، با توجه به موارد بیان شده و اهمیت رودخانه دلیچای در پارک ملی لار، در این مطالعه، میزان تمایز ژنتیکی ماهیان قزل‌آلای خال قرمز و میزان مهاجرت این ماهیان از رودخانه دلیچای به دریاچه سد لار و برعکس مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه برای بهتر مشخص شدن تمایزات ژنتیکی، به جای استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و روش‌های ژنتیکی سنتی (استفاده از آلوزایم، ژنوم میتوکندریایی یا ریزماهورها) که ممکن است اطلاعات محدود، تک‌والدی، همراه با خطا و غیرواقعی ایجاد کنند (Ballard and Whitlock, 2004; Benestan *et al.*, 2015; Hallerman, 2003; McGuire *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2007). از روش‌های تعیین توالی نسل جدید (Next Generation Sequencing)، که ابزار قدرتمندی برای بررسی انواع جایگاه‌های موجود در سراسر ژنوم هستند و داده‌های مفیدتر و دقیق‌تری را با استفاده از تعداد نمونه کمتر فراهم می‌کند (Andrews *et al.*, 2016; Benestan *et al.*, 2015; Jeffries *et al.*, 2015; Puritz *et al.*, 2012) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

رودخانه دلیچای (شکل ۱)، یکی از شاخه‌های رودخانه لار محسوب می‌شود؛ که با شیب متوسط ۳ درصد در منطقه‌های بی‌کربناته کلسیک جریان دارد. این رودخانه سردترین، پرتلاطم‌ترین و پرحجم‌ترین آب را در میان رودخانه‌های پارک ملی لار دارد. منشأ اصلی آب رودخانه از ذوب برف‌هاست و چشمه نقش کمی در تأمین آب این رودخانه دارد.

نمونه‌برداری از رودخانه دلیچای در دو نوبت، در سال ۱۳۸۸ و در سال ۱۳۹۶ در مکان مشخصی از رودخانه دلیچای، با مختصات جغرافیایی $35^{\circ} 55' 17'' N$ و $51^{\circ} 59' 48'' E$ ، انجام شد (شکل ۱). در طی هر دوره

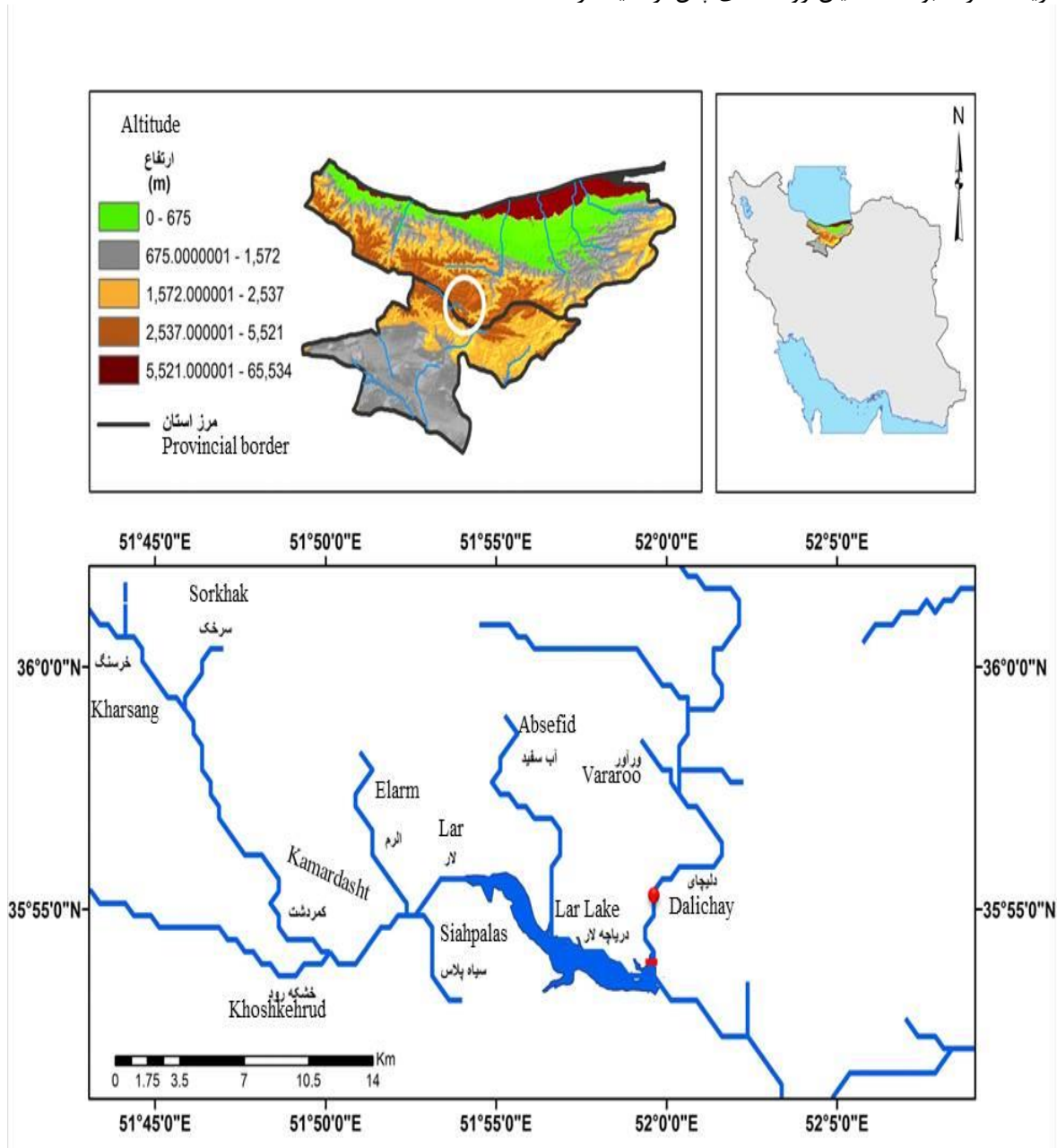
فلس و اتولیت ماهیان قزل‌آلای خال قرمز بین رودخانه‌های مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بود (Rashidabadi *et al.*, 2019; Salavatian *et al.*, 2015). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل اختلاف در میزان و کیفیت غذای در دسترس، کیفیت آب، سرعت جریان و متوسط دمای آب، تراکم ماهیان، حضور گونه‌های دیگر، استرس-های محیطی، توانایی بازگشت ماهیان به زیستگاه محل تولد، و وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی مربوط شود (Rashidabadi *et al.*, 2019).

رودخانه دلیچای، یکی از زیستگاه‌های اصلی ماهی قزل-آلای خال قرمز در پارک ملی لار است (Sedighkia *et al.*, 2018)، که به‌طور مستقیم وارد دریاچه سد لار می‌شود. تاکنون، هیچ نمونه ماهی دریاچه‌ای در این رودخانه مشاهده نشده است و احتمال می‌رود به دلیل موانعی مانند مسیر جاده و پل روی رودخانه و لوله‌های انتقال آب در ساختار پل که دارای تور فلزی هستند، ماهیان از رودخانه دلیچای به دریاچه و برعکس نتوانند مهاجرت کنند، که احتمالاً جدایی تولیدمثلی در پی خواهد داشت؛ زیرا چنانچه جمعیتی از یک گونه دارای مهاجرت بسیار کم باشد و ارتباطی با سایر جمعیت‌ها نداشته باشد، از نظر ژنتیکی نسبت به دیگر جمعیت‌های آن گونه متمایز شده و یک واحد مدیریتی محسوب می‌شود و بنابراین نیازمند مدیریت خاص و تلاش‌های حفاظتی مجزا است (Frankham *et al.*, 2004).

جمعیت‌های حاشیه‌ای و کوچک قزل‌آلا در نتیجه فعالیت‌های مخرب انسانی و تغییرات اقلیمی بیشتر آماده انقراض‌های محلی هستند (Almodóvar *et al.*, 2012). در مطالعه (Sedighkia *et al.*, 2018)، به‌طور کلی، شرایط در رودخانه دلیچای برای قزل‌آلای خال قرمز مطلوب برآورد شده است اما با افزایش گرمایش جهانی قسمت‌های پایین‌دست رودخانه دلیچای در کوتاه مدت در معرض خطر بوده که احتمالاً ماهیان به سمت قسمت‌های میانی و بالادست رودخانه دلیچای مهاجرت

محلول گل میخک (۵/۰ گرم پودر گل میخک در هر لیتر آب) بی‌هوش شدند و باله شکمی آن‌ها پس از جدا سازی برای بررسی‌های ژنتیکی در محلول الکل ۹۵٪ نگهداری شد. سپس ماهیان برای بازیابی حالت طبیعی در کرانه‌هایی از رودخانه که دارای جریان آب آرامی بود قرار داده شدند.

نمونه‌برداری، ۱۵ قطعه ماهی قزل‌آلای خال قرمز، با استفاده از دستگاه الکتروشوکر، صید گردید. نمونه‌های ماهیان دریاچه‌ای شامل ۱۳۴ قطعه باله جدا شده از ماهیان صیدشده توسط ماهیگیری بود که در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ برای صید باقلاب در دریاچه سد مجوز دریافت کرده بودند. ماهیان رودخانه‌ای پس از صید در



شکل ۱- موقعیت پارک ملی لار، دریاچه سد لار و رودخانه دلچای. دایره قرمز، نشان دهنده محل نمونه برداری از رودخانه دلچای و خط تیره قرمز رنگ نشان دهنده محل مانع فیزیکی در دهانه رودخانه دلچای است.

Fig. 1- Location of the Lar National Park, Lar Lake and Dalichay River. The red circle denotes sampling locality in Dalichay River and the red hyphen denotes the physical barrier in the mouth of the river

پردازش و تحلیل داده‌ها

توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از مجموعه نرم‌افزار STACKS V.1.35 (Catchen *et al.*, 2013) در محیط لینوکس پردازش شدند. خوانش‌های توالی‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt (Martin, 2011) به‌منظور جداکردن توالی‌های آداپتور ویرایش شده و سپس کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC (Andrews, 2010) ارزیابی شد. توالی‌ها در مرحله بعد با در نظر گرفتن طول ۸۰ جفت باز، با استفاده از برنامه process_radtags موجود در مجموعه STACKS V.1.48 استخراج و ویرایش شدند (Catchen *et al.*, 2013). توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزارهای bwa (0.7.17-r1188) و samtools 1.9 به ژنوم ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* انطباق داده شدند (PRJNA72713). سپس برای استخراج مجموعه آلل‌های انطباق داده شده به ژنوم ماهی آزاد اقیانوس اطلس و برای شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در هر جایگاه (لوکوس) از نرم‌افزار pstacks استفاده شد. جایگاه‌های شناخته شده در همه افراد گروه-بندی شده و کاتالوگ آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار cstacks با در نظر گرفتن بیشینه تفاوت بین جایگاهی برابر با ۱ تهیه شد. در مرحله بعد جایگاه‌های هر فرد با استفاده از نرم افزار sstacks با کاتالوگ جایگاه‌های ژنتیکی برای شناسایی آلل‌های هر جایگاه مقایسه شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Populations ژنوتیپ هر کدام از جایگاه‌ها به-صورت یک فایل VCF تهیه شد. فایل VCF ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار Populations و برنامه 05_filter_vcf.py موجود در مجموعه stacks دوباره فیلتر شد. در مجموع تعداد ۷۹۷۸ جهش تک نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد بررسی نگهداشته شده و برای آنالیزها به-کار گرفته شد. برای بررسی خوشه‌های ژنتیکی موجود در ماهیان رودخانه دلیچای و ماهیان مربوط به دریاچه سد لار از نرم‌افزار Admixture v.1.23 (Alexander *et al.*, 2009) با فرض وجود ۱ تا ۵ خوشه ژنتیکی ($K = 1-5$)،

برای بررسی‌های ژنوم، DNA با روش استخراج نمکی (Aljanabi and Martinez, 1997)، با تیمار RNase (برای از بین بردن RNA) استخراج شد. کیفیت DNA به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. مقدار DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر^۲ قطره‌ای تعیین شد. سپس غلظت دقیق نمونه‌های DNA، با استفاده از دستگاه Spark™ 10M، تعیین و روی عدد ۱۰ ng/μl تنظیم شد.

نمونه‌های یادشده (۱۶۴ قطعه باله شامل ۳۰ قطعه باله از رودخانه دلیچای و ۱۳۴ قطعه باله از دریاچه) برای تعیین توالی نسل جدید با استفاده از آنزیم‌های برشی *PstI* و *MspI* برش داده شده و سپس به هر نمونه یک بارکد اختصاصی و یک آداپتور جهت اتصال پرایمر مشخص با استفاده از آنزیم لیگاز متصل شد. سپس همه نمونه‌ها در یک تیوپ با هم مخلوط شده و با استفاده از پرایمر مخصوص آداپتور تکثیر شدند. همه مرحله‌های یادشده شامل برش‌های آنزیمی، اتصال بارکد، آداپتور، عملیات مخلوط کردن نمونه‌ها و تکثیر و تعیین توالی توسط مرکز خدمات ژنومیکس دانشگاه لاوال کبک (کانادا) با استفاده از تکنولوژی Ion Torrent انجام شد. این تکنولوژی یکی از روش‌های تعیین توالی DNA است که بر پایه شناسایی یون‌های هیدروژن آزاد شده در طی پلیمریزاسیون DNA استوار است. در این روش، تعیین توالی همگام با سنتز DNA مکمل از روی رشته DNA الگو انجام می‌شود. در این روند در هر چرخه یک نوع نوکلئوتید وارد محیط واکنش می‌شود و در صورتی که نوکلئوتید یادشده مکمل نوکلئوتیدی در توالی DNA ای باشد که همانندسازی می‌شود، با قرار گرفتن آن در رشته DNA یون هیدروژن آزاد می‌شود که نشان‌دهنده انجام واکنش و نوع نوکلئوتید است؛ در غیر اینصورت عدم تولید یون هیدروژن نشان‌دهنده مطابقت نداشتن نوکلئوتید موجود در محیط با نوکلئوتید موجود در توالی DNA الگو است (Rusk, 2010).

جایگاه ژنی (لوکوس) مشترکی بودند، برای پرهیز از اثرات مرتبط با پیوستگی چندشکلی‌ها در فایل VCF نهایی، فقط یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی^۲ دارای بیشترین فراوانی آلل نادر^۶ برای تحلیل‌های بعدی نگه داشته شد. در فایل نهایی تعداد ۷۹۷۸ جهش تک نوکلئوتیدی در ۷۹۷۸ جایگاه ژنتیکی وجود داشت.

در تحلیل داده‌ها به روش خوشه‌بندی^۷ بر پایه ضریب خطای CV محاسبه شده محتمل‌ترین تعداد خوشه‌های ژنتیکی موجود در بین نمونه‌های مورد بررسی، تعداد دو خوشه ($K=2$) بود، زیرا مقدار ضریب خطای محاسبه شده برای این گروه‌بندی کمتر از دیگر گروه‌ها بود (شکل ۲). افزون بر این، گروه‌بندی سه خوشه‌ای ($K=3$) نیز با اختلاف اندکی با داشتن دومین ضریب خطای کوچک بعد از گروه-بندی دو خوشه‌ای یکی دیگر از گروه‌بندی‌های محتمل بود. در مجموع در تمام گروه‌بندی‌ها ترکیب ژنتیکی ماهیان رودخانه دلیچای تا حد زیادی با ترکیب ژنتیکی مشاهده شده در دریاچه متفاوت است و ترکیب ژنتیکی دریاچه‌ای به میزان کمی در ماهیان این رودخانه قابل تشخیص است. در دریاچه نیز آثار بسیار کم و قابل چشم‌پوشی از ترکیب ژنتیکی ماهیان رودخانه دلیچای وجود دارد که شاید بتوان آن را به عدم وجود ترکیب ژنتیکی ماهیان این رودخانه در دریاچه تفسیر کرد. با افزایش تعداد خوشه‌ها (K)، گروه‌های جزئی‌تری در دریاچه و رودخانه دلیچای قابل تشخیص است که چه‌بسا مربوط به ماهیان سایر رودخانه‌های پارک ملی لار است که در این مطالعه بررسی نشده‌اند.

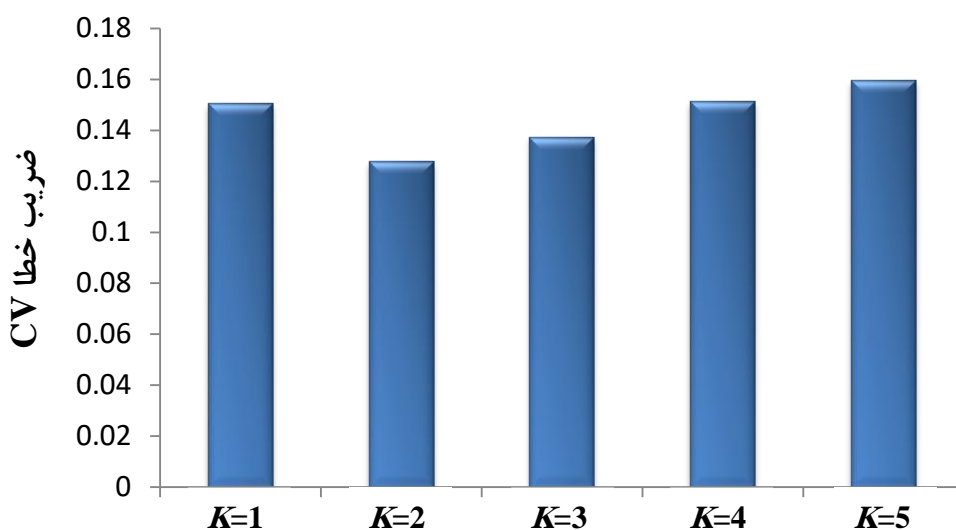
در مجموع در آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) چهار مؤلفه اصلی اول ۲۸/۸۲ درصد از تغییرات موجود در بین داده‌های ژنومی را نشان داد (شکل ۴). ماهیان دریاچه و رودخانه دلیچای در امتداد اولین مؤلفه اصلی (۲۵/۱۱) درصد تغییرات) به‌صورت واضح از یکدیگر جدا شدند، اما جمعیت‌های یادشده در امتداد سایر مؤلفه‌های اصلی از هم جدا نشدند. مقدار تمایز محاسبه شده در بین جمعیت‌های رودخانه دلیچای و دریاچه (Fst) برابر با ۰/۲۸ بود.

با ۲۰۰۰ تکرار بوت استرپ استفاده شد. برای انتخاب محتمل‌ترین تعداد خوشه‌های ژنتیکی (K) موجود در بین ماهیان مورد بررسی، از ضریب خطای ارزیابی^۴ محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار ADMIXTURE استفاده شد؛ به این مفهوم که تعداد خوشه ژنتیکی دارای کمترین خطای CV به عنوان محتمل‌ترین تعداد خوشه‌ها انتخاب شد.

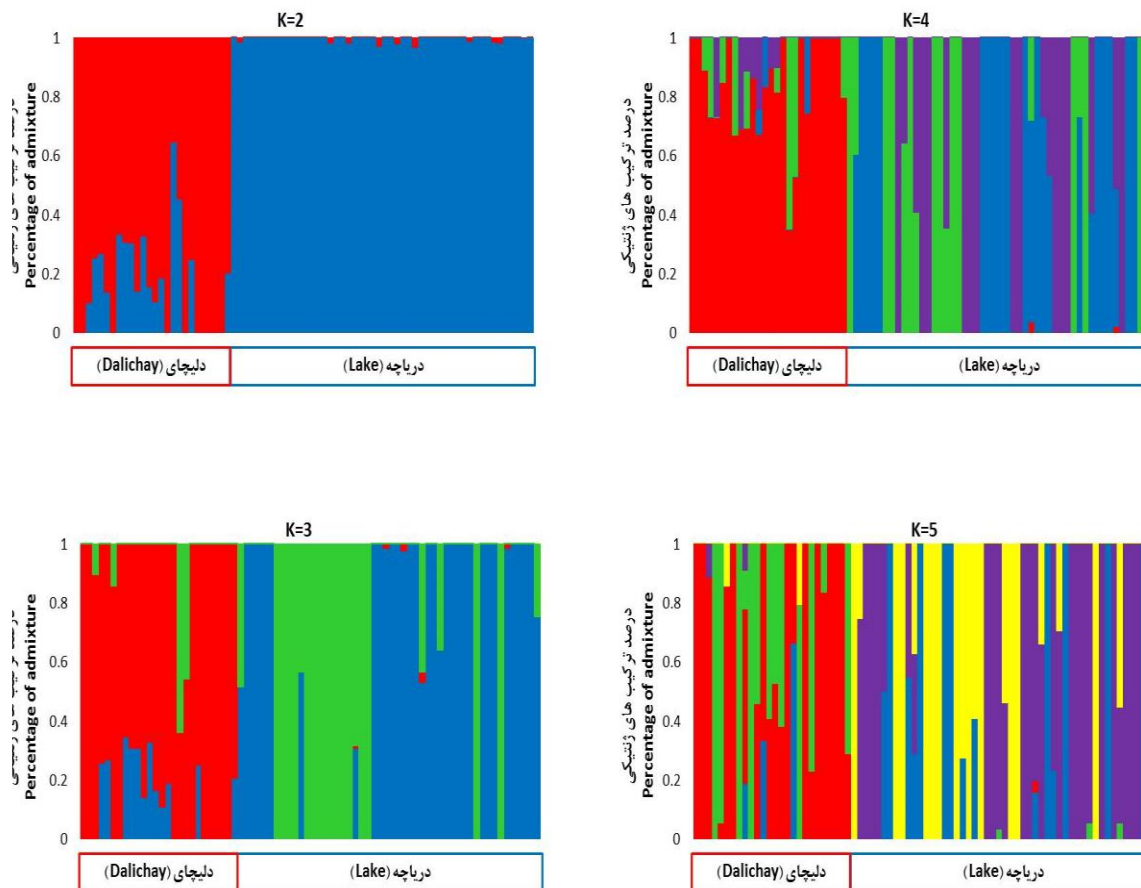
افزون بر آزمون Admixture برای مشاهده تنوع موجود در بین نمونه‌ها، داده‌های مرتبط با جهش‌های تک نوکلئوتیدی در محیط نرم‌افزاری R با استفاده از بسته نرم‌افزاری adegenet (Jombart and Collins, 2015) با روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی^۵ مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه برای قضاوت در مورد میزان تفاوت جمعیت ماهیان رودخانه دلیچای نسبت به ماهیان دریاچه‌ای، مقدار تمایز ژنتیکی (F_{st}) دو گروه ماهیان یادشده با استفاده از بسته نرم‌افزاری STAAMP در محیط R محاسبه شد.

نتایج و بحث

پس از انجام توالی‌یابی نسل جدید ۱۱۰ نمونه (۲۶ نمونه از ۳۰ نمونه جمعیت دلیچای و ۸۴ نمونه از ۱۳۴ نمونه دریاچه‌ای) از ۱۶۴ نمونه مورد بررسی در این مطالعه دارای بیش از ۲۰۰۰۰۰۰ خوانش و کمتر از ۲۰ درصد داده از دست رفته بودند؛ و نمونه‌های دارای تعداد خوانش کمتر از ۲۰۰۰۰۰۰ خوانش و یا بیش از ۲۰ درصد داده از دست رفته کنار گذاشته شدند. حد آستانه ۲۰۰۰۰۰۰ خوانش و مقدار حداکثر ۲۰ درصد داده از دست رفته به این دلیل در نظر گرفته شد که وجود تعداد کافی توالی برای هر فرد در بیشتر جایگاه‌ها تضمین شود. فایل VCF ایجاد شده توسط نرم‌افزار Populations دارای ۶۱۸۲۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ۴۳۰۳۵ جایگاه بود که پس از فیلتر کردن تعداد ۹۲۵۵ جهش تک نوکلئوتیدی در ۷۹۷۸ جایگاه مشترک در همه افراد باقی ماند. با توجه به اینکه تعدادی از چندشکلی‌ها دارای

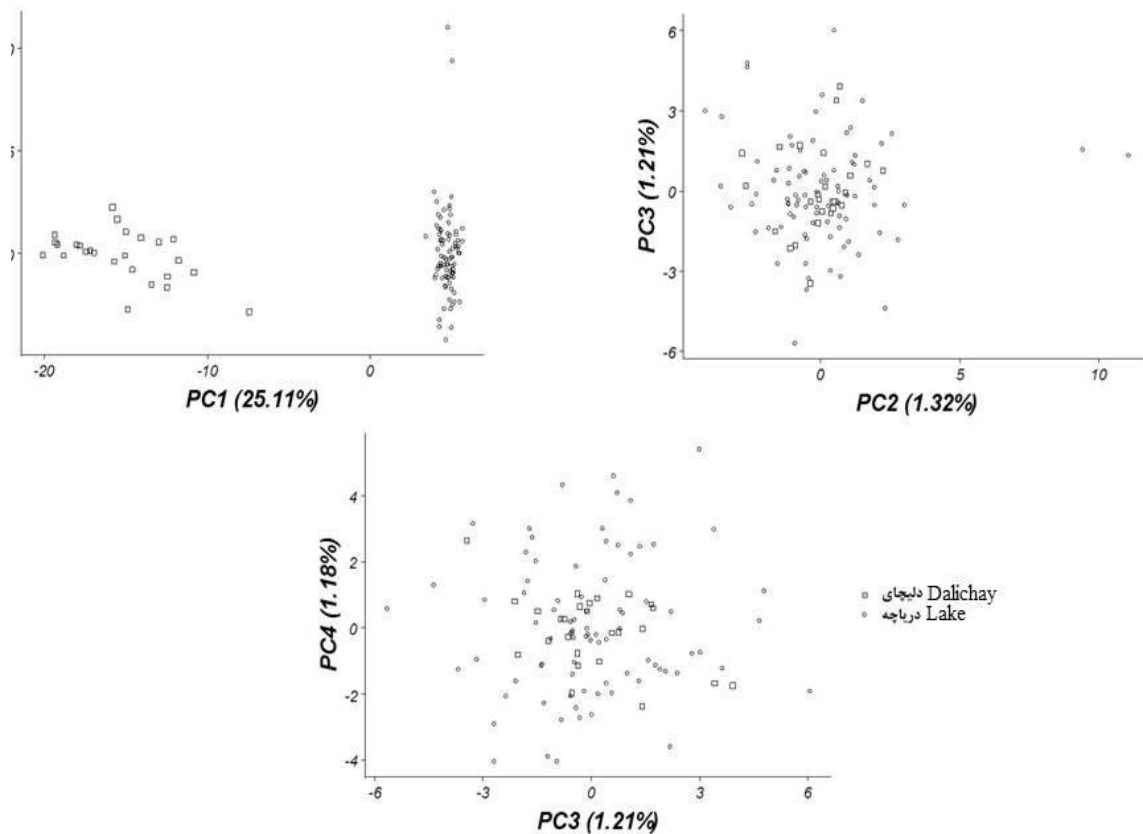


شکل ۲- نمودار ضریب خطای (cv) محاسبه شده برای گروه بندی های (K) مختلف
 Fig. 2- Cross validation error calculated for different number of clusters (K)



شکل ۳- نمودارهای ترکیب ژنتیکی افراد مورد بررسی با گروه بندی های متفاوت. در این نمودارها ترکیب رنگی هر ستون نشان دهنده ترکیب ژنتیکی فرد مرتبط با ستون مورد نظر است. در صورتیکه یک ستون یا یک فرد تنها دارای یک رنگ باشد به مفهوم آن است که فرد یادشده خالص بوده و در ترکیب ژنتیکی خود ترکیب ژنتیکی مرتبط با سایر گروه ها یا خوشه های ژنتیکی ندارد.

Fig. 3- The admixture graphs for the analyzed individuals for different k values. In each graph, the color composition of each bar denotes the genetic composition of the related individual. If a bar is composed of one color it means that the related individual is composed of only a single genetic cluster and has no contribution from other genetic clusters



شکل ۴- پراکنش جمعیت‌های مورد مطالعه در امتداد مؤلفه‌های اصلی (PC) اول تا چهارم
 Fig. 4- Distribution of the studied populations along the first four principal components (PC)

نشان می‌دهند که وجود مانع کمابیش غیرقابل عبوری مانند آنچه در دهانه رودخانه دلیچای وجود دارد، امکان مهاجرت ماهیان قزل‌آلای خال قرمز از دریاچه سد به این رودخانه و برعکس را غیرممکن ساخته است. نبود امکان مهاجرت از یک سو سبب ایزوله شدن جمعیت رودخانه دلیچای شده که در گذر زمان می‌تواند این جمعیت را نسبت به تغییرات محیطی و رانش ژنتیکی تصادفی آسیب‌پذیرتر کند و از سوی دیگر ماهیان نمی‌توانند از مهاجرت به دریاچه برای دسترسی به غذای بیشتر و در نتیجه رشد بهتر استفاده کنند (Olsson and Greenberg, 2004). همچنین با وجود خاص بودن رودخانه دلیچای که سردترین، پرتلاطم‌ترین و پر حجم‌ترین آب را در میان رودخانه‌های پارک ملی لار دارد، وجود مانع غیرقابل عبور در دهانه این رودخانه امکان گریز و استفاده ماهیان دیگر

مهمترین هدف زیست‌شناسی، حفاظت در عصر جدید و مدیریت جمعیت‌ها، تفکیک ژنتیکی جمعیت‌ها و واحدهای متناسب مدیریتی است (Benestan *et al.*, 2015). یکی از تبعات منفی وجود سد در مسیر رودخانه‌ها این است که از مهاجرت ماهیان در زمان تغییر شرایط محیطی مانند تغییر اقلیم و گرمایش جهانی که پدیده اجتناب ناپذیری است، به بخش‌های بالادست جلوگیری کرده و سبب انقراض تدریجی ماهیان حساس به درجه حرارت مانند قزل‌آلا خواهد شد (Almodóvar *et al.*, 2012). پارک ملی لار یکی از زیستگاه‌های بسیار مطلوب برای قزل‌آلای خال قرمز است (Esteve *et al.*, 2017)؛ اما با این وجود پدیده تغییر اقلیم که گستره جهانی دارد در این منطقه نیز تأثیرهای منفی خود را خواهد داشت (Sedighkia *et al.*, 2018). با توجه به نتایج این مطالعه همه شواهد

رودخانه دلیچای به دریاچه خواهند داشت.

نتیجه گیری

در هر حال، محیط رودخانه دلیچای یک زیستگاه منحصر به فرد برای ماهی قزل آلائی خال قرمز در پارک ملی لار محسوب می شود که در مجموع بر پایه نتایج مطالعه حاضر، جمعیت ماهیان رودخانه دلیچای نسبت به ماهیان دریاچه-ای که با سایر رودخانه های این حوضه در ارتباط است، دارای تمایز قابل توجهی می باشد.

با استناد به این نتایج پیشنهاد می شود که جمعیت ماهیان قزل آلائی خال قرمز رودخانه دلیچای را می توان به عنوان یک واحد مدیریتی مجزا در نظر گرفت و جهت حفاظت از آن محدوده پارک ملی را تا سرشاخه های این رودخانه (دشت و آرو) گسترش داد.

همچنین با توجه به اینکه، یکی از برنامه های بازسازی و مدیریتی قزل آلا، در مدیریت پدیده گرمایش جهانی، ایجاد و سهولت دسترسی به مکان های مطلوب از نظر دما برای حفظ و پایداری این گونه است (Almodóvar et al., 2012)، پیشنهاد می شود تا در مورد حذف و یا تعدیل مانع غیر قابل عبور در دهانه رودخانه دلیچای اقدام های لازم صورت گیرد.

سیاسگزاری

این مطالعه با حمایت های دانشگاه شهید بهشتی، دانشگاه شهرکرد و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری انجام شد. نگارندگان بر خود لازم می دانند تا از زحمات بی دریغ آقایان امیرمحمد علمی و امیر زمانی و سایر کارشناسان محترم دفتر آبریان سازمان محیط زیست نیز سپاسگزاری کنند.

پی نوشت ها

¹ *Salmo caspius* L.

² NanoDrop spectrophotometer

³ Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

⁴ Cross validation

⁵ Principal Components Analysis (PCA)

⁶ MAF Minor allele frequency

⁷ Admixture

رودخانه ها و دریاچه از این رودخانه را، در شرایطی که نیاز به استفاده از این رودخانه باشد (مانند تغییرات محیطی)، بسیار محدود کرده است.

در کنار مانع فیزیکی موجود در دهانه رودخانه دلیچای که مانع از مهاجرت ماهیان در بین دریاچه و رودخانه می شود، این احتمال نیز وجود دارد که ماهیان رودخانه دلیچای کلاً رفتار ساکن بودن در رودخانه را داشته باشند و حتی قبل از وجود مانع نیز جزو ماهیان مهاجر نبوده و یا مهاجرت بسیار کم صورت می گرفته است. در یک جمعیت هر دو عامل تراکم و نرخ رشد بر پدیده مهاجرت اثرگذار است، زمانی که ماهیان ترجیح می دهند ساکن باشند، تراکم پایین و نرخ رشد بالاست و رفتار مهاجرتی هم زمانی ترجیح داده می شود که تراکم بالا و نرخ رشد پایین است (Jonsson and Jonsson, 1993). حتی در یک رودخانه کوچک بدون مانع مشهود (Olsson and Greenberg, 2004)، گرایش به مهاجرت، به اینکه ماهی از کدام قسمت رودخانه منشأ می گیرد بستگی دارد. این تفاوت در رفتار مهاجرتی بین بخش های مختلف یک رودخانه به عامل های محیطی که روی تراکم و رشد اثرگذار است، بستگی دارد. با این وجود ممکن است این تفاوت ها به لحاظ ژنتیکی برنامه ریزی شده باشند که بر مبنای هزینه مهاجرت انتخاب شده اند (Olsson and Greenberg, 2004). در بررسی های میدانی انجام شده تراکم ماهیان قزل آلائی خال قرمز در رودخانه دلیچای در مقایسه با سایر رودخانه های حوضه لار کمتر بود. مطلوبیت زیستگاه در رودخانه دلیچای به دلیل شیب زیاد بستر، سرعت جریان بالا و بستر درشت قلوه سنگی تا حدی کم است اما در عین حال وسعت زیستگاه و تراکم مواد غذایی مناسب بوده و در نتیجه چه بسا ماهیان رودخانه دلیچای به واسطه تراکم کمتر و به تبع آن با صرف انرژی رقابتی کمتر، می توانند نیازهای زیستی خود را در همان رودخانه دلیچای تأمین کنند. بنابراین، این ماهیان نیاز کمتری به انجام مهاجرت های تغذیه ای از

منابع

- Abdoli, A., 2016. Field Guided of Inland Water Fishes of Iran. Iran Shenasi Press, Tehran, Iran.
- Abdoli, A., Azizi, Z., Kiabi, B., Ahmadi, A.A., and Golzarianpour, K., 2016. Study of Summer food habits of the brown trout, *Salmo trutta fario*, in Lar dam lake and streams in Lar National Park. Fisheries Science and Technology. 5, 1-17. (In Persian with English Abstract).
- Abdoli, A. and Naderi, M., 2008. The Biodiversity of Southern Caspian Sea Basin. Abzian Press, Tehran, Iran.
- Alexander, D.H., Novembre, J. and Lange, K., 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. Genome Research. 19, 1655-1664 .
- Aljanabi, S.M. and Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research. 25, 4692-4693 .
- Almodóvar, A., Nicola, G.G., Ayllón, D. and Elvira, B. 2012. Global warming threatens the persistence of Mediterranean brown trout. Global Change Biology. 18, 1549-1560 .
- Andrews, S., 2010. A quality control tool for high throughput sequence data. Fast QC. 390-391.
- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G. and Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. Nature Reviews Genetics. 17, 81-92 .
- Ballard, J.W.O. and Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology. 13, 729-744.
- Benestan, L., Gosselin, T., Perrier, C., Sainte-Marie, B., Rochette, R. and Bernatchez, L., 2015. RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American lobster (*Homarus americanus*). Molecular Ecology. 24, 3299-3315 .
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. and Cresko, W. A., 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. Molecular Ecology. 22, 3124-3140 .
- Esteve, M., Abdoli, A., Segherloo, I.H., Golzarianpour, K. and Ahmadi, A.A., 2017. Observations of male choice in brown Trout (*Salmo trutta*) from Lar National Park, Iran. Brown Trout: Biology, Ecology and Management. 165-178.
- Fazli, H., Azari, H., Moghim, M., Kor, D., Nabavi Jelodar, E., and Taleshian, H., 2011. Growth and mortality of brown trout, *Salmo trutta fario* in Lar dam, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 11, 47-37.
- Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A., 2004. A Primer of ConservationG. Cambridge University Press. New York. 234 p.
- Hallerman, E.M., 2003. Population genetics: Principles And Applications For Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 458 pp.
- Hashemzadeh Segherloo, I., Farahmand, H., Abdoli, A., Karami, M. and Bernatchez, L., 2009. Morphological comparison of brown trout, *Salmo trutta fario*, populations of Haraz, Lighvan and Mardagh Rivers. Journal of Fisheries, Iranian Journal of the Natural Resources. 62, 69-80. (In Persian with English Abstract).

- Heidari, S., 2015. Assessment of efficiency of management strategies in the Lar National Park and analysis of the existing gaps in order to preservation of maximal biodiversity. MSc. Thesis, Shahid Beheshti University, Iran.
- Jombart, T. and Collins, C., 2015. A Tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) Using Adegnet 2.0.0. London: Imperial College London, MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling. UK.
- Jeffries, D.L., Copp, G.H., Handley, L.L., Olsén, H., Sayer, C.D. and Hänfling, B., 2015. Comparing RADseq and microsatellites to infer complex phylogeographic patterns, a real data informed perspective in the Crucian carp, *Carassius carassius* L. *Molecular Ecology*, 25(13), 2997-3018.
- Jonsson, B. and Jonsson, N., 1993. Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 3, 348-365 .
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*. 17(1), 10-12.
- McGuire, J.A., Linkem, C.W., Koo, M.S., Hutchison, D.W., Lappin, A.K., Orange, D.I., Lemos-Espinal, J., Riddle, B.R. and Jaeger, J.R., 2007. Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution*. 61, 2879-2897 .
- Mostafavi, H., Pletterbauer, F., Coad, B.W., Mahini, A.S., Schinegger, R., Unfer, G., Trautwein, C. and Schmutz, S., 2014. Predicting presence and absence of trout (*Salmo trutta*) in Iran. *Limnologica*. 46, 1-8 .
- Olsson, I. and Greenberg, L., 2004. Partial migration in a landlocked brown trout population. *Journal of Fish Biology*. 65, 106-121 .
- Puritz, J.B., Addison, J.A. and Toonen, R.J., 2012. Next-generation phylogeography: a targeted approach for multilocus sequencing of non-model organisms. *PLoS One*. 7, e34241 .
- Rashidabadi, F., Abdoli, A., Tajbakhsh, F., Nejat, F. and Avigliano, E., 2019. Unravelling the stocks structure of the Persian brown trout by otolith and scale shape. *Journal of Fish Biology*. 96(2), 307-315 .
- Rusk, N., 2010. Torrents of sequence. *Nature Methods*, 8(1), p.44.
- Salavatian, S.M., Abbasi, K., Azari Takami, Q., Moradi Chafi, M. and Bakhtiari Agh-Masjed, S., 2015. Investigation of grows condition of *Salmo trutta fario* in Lar Reservoir Lake. *Journa of Animal Biology*. 7, 35-48. (In Persian with English Abstract).
- Sedighkia, M., Abdoli, A., Ayyoubzadeh, S.A. and Ahmadi, A., 2018. Modelling of thermal habitat loss of brown trout (*Salmo trutta*) due to the impact of climate warming. *Ecology and Hydrobiology*. 19, 167-177 .
- Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M. and Okada, N., 2001. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. *Molecular Biology and Evolution*. 18, 2057-2066





Environmental Sciences Vol.19 / No.1 / Spring 2021

89-102

Analysis of the effect of physical barriers on genetic divergence of the Caspian trout *Salmo caspius* in the Dalichay River of the Lar National Park, Iran using next-generation sequencing

Seyedeh Narjes Tabatabaei ^{1*}, Asghar Abdoli ^{1*}, Iraj Hashemzade Segherloo ², Faraham Ahmadzadeh ¹ and Louis Bernatchez ³

¹ Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

³ Department of Biology, Institute of Integrative Biology and System (IBIS), Laval University, Quebec G1V 0A6, Canada

Received: 202.01.31

Accepted: 2020.05.02

Tabatabaei, S.N., Abdoli, A., Hashemzade Segherloo, I., Ahmadzadeh, F. and Bernatchez L., 2021. Analysis of the effect of physical barriers on genetic divergence of the Caspian trout *Salmo caspius* in the Dalichay River of the Lar National Park, Iran using next-generation sequencing Environmental Sciences. 19(1): 89-102.

Introduction: The Lar National Park is probably the best habitat for *Salmo caspius* in Iran. In other habitats located in Iran, the species has been threatened by different factors including habitat destruction, pollution, sand removal from the riverbed, dam construction, introduction of exotic species, over-fishing, and other human-mediated changes. Dalichay River, as one of the major habitats of *S. caspius*, is ecologically different from other rivers in the Lar National Park. In this study, we assessed genetic differences (by applying next-generation sequencing) of *S. caspius* in Dalichay River and Lar Lake, considering an impassable barrier in the mouth of Dalichay River.

Material and methods: In this study, fin clips were collected from electrofished specimens from the Dalichay River and fish caught by anglers from the Lake. DNA extraction was performed using the saline extraction method with additional treatment with RNase to degrade RNA molecules. To compare fish from Dalichay River and the Lar Lake, next-generation sequencing was used. Analyses including principal components analysis (PCA) and Admixture, in addition to the calculation of genetic differentiation (F_{st}) were used to compare the studied populations.

* Corresponding Authors: *Email Address.* a_abdoli@sbu.ac.ir
<http://dx.doi.org/10.52547/envs.32496>

Results and discussion: According to the results of the principal components analysis (PCA), fish from the Dalichay River and the Lake were separated clearly along the first PC axis (25.11% of variation). However, they were overlapped along other PCs. The results of Admixture analysis showed that Dalichay and Lake fish were always represented with different admixture clusters with little contribution from one another. Additionally, the genetic differentiation between Dalichay and the Lake was significant. The reason for this differentiation may be the existence of a physical barrier in the mouth of Dalichay that blocks the path for migration from Dalichay to the Lake and vice versa. On the other hand, it is possible that the fish in Dalichay were resident and did not show any preference for migration to the Lake. The residency behavior may appear as a result of the low density of fish and satisfaction of biological and habitat-related needs of the fish and hence no need for migration.

Conclusion: Overall, the results of this study showed that the fish in the Dalichay River and the Lake differ in their genetic composition and were significantly differentiated from one another. In any case, the high differentiation of the fish in the Dalichay River and their isolation, in addition to the inability of fish from the Lake and other rivers in the Lar National Park to migrate to Dalichay, necessitates taking better management approaches.

Keywords: Next-generation sequencing, Genetic differentiation, Physical barrier, *Salmo caspius*

