

بررسی DNA ریزماهواره در ساختار ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*)

مهرنوش نوروزی^{۱*}، محمد بهروز^۱

*mnoroozi@toniau.ac.ir

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه شیلات و بیولوژی دریا.

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۳

چکیده

ساختار ژنتیکی ماهی کفال طلایی *Liza aurata* در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از جایگاههای ریزماهواره بررسی گردید. در مجموع ۱۲۰ نمونه ماهی کفال بالغ از چهار منطقه تالاب انزلی، رامسر، فریدونکنار و تالاب گمیشان جمع آوری شد. در این بررسی تمام پرایمرها الگوی بانندی چند شکلی (پلی مورفیسم) نشان دادند که از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی استفاده شد. میانگین اللی در جایگاههای مختلف ۵/۷ (با دامنه ۳ تا ۹ ال) بود. نمونههای برخی مناطق دارای الهای اختصاصی بودند. میانگین ضریب خویشاوندی در جایگاههای ریزماهواره مثبت بود. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۷۳۹ و ۰/۳۶۵ محاسبه شد. تمامی جایگاهها خارج از تعادل هاردی وینبرگ بودند. میزان شاخص تمایز و جریان ژنی بر اساس فراوانی اللی بترتیب ۰/۱۲۷ و ۲/۱۱ محاسبه شد. بر اساس تست AMOVA، شاخص های تمایز F_{st} و R_{st} تفاوت معنی داری بین مناطق نمونه برداری نشان داد. میزان فاصله ژنتیکی نیز نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت های مورد مطالعه بود. این بررسی، وجود گروههای متمایز ژنتیکی ماهی کفال طلایی در جنوب دریای خزر را نشان می دهد.

کلمات کلیدی: کفال طلایی، *Liza aurata*، ژنتیک جمعیت، ریزماهواره، دریای خزر

*نویسنده مسئول

مقدمه

پیشرفت علم استفاده از نشانگرهای مولکولی را که متأثر از شاخص‌های محیطی نمی‌باشد، جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است. از جمله آنها، نشانگرهای ریزماهوره هستند که قادرند سطوح بالایی از پلی مورفیسم را نشان دهند (Zhao et al., 2005). طبیعت چند الی ریزماهوره‌ها، توارث همباز، پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث پذیری موجب شده که ریزماهوره‌ها کاربری موفق‌تری در زمینه‌های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند (Chen et al., 2008). پراکنش و فراوانی اندازه جمعیت بسیاری از گونه‌ها در طول قرن گذشته به شدت تحت تاثیر فعالیت‌های انسانی قرار داشته است (Zhao et al., 2005). تکثیر مصنوعی و یا حمل انواع گونه‌ها به محل دیگر به یک امر متداول تبدیل شده است و مطالعات اندکی وجود دارد که این اعمال چگونه پراکنش افراد و تنوع ژنتیکی در یک جمعیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. فعالیت‌های انسانی ساختار جمعیت‌ها را تحت تاثیر قرار داده‌است تا جاییکه افزایش تکثیر مصنوعی می‌تواند موجب یکسان سازی ساختار ژنتیکی شود، بنابراین شناخت ترکیب طبیعی و ساختار ژنتیک جمعیتها امری مهم است (Zhao et al., 2005).

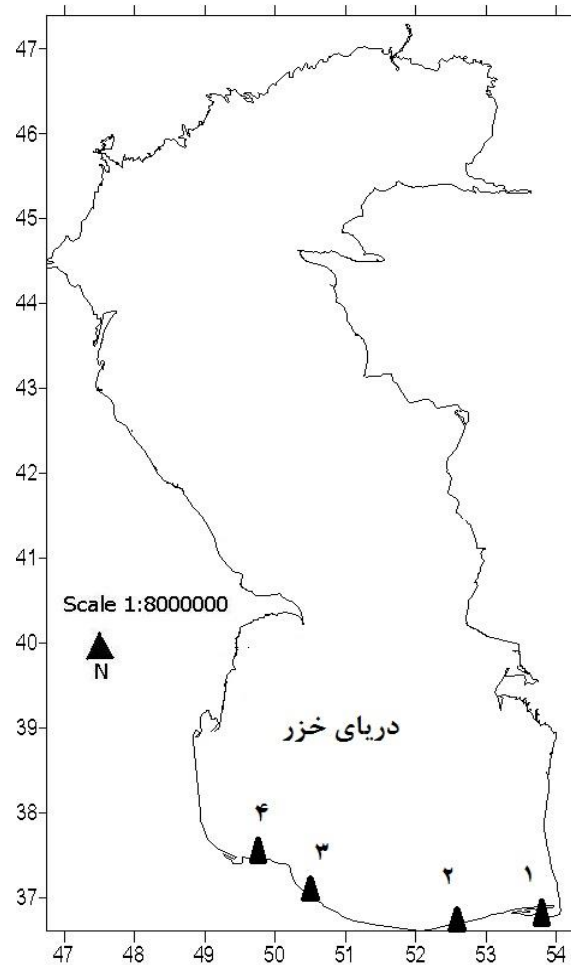
ماهی کفال طلایی، *Liza aurata* از ماهیان ارزشمندی است که در فصول سرد زمستان درحوزه جنوبی دریای خزر، درنواحی ساحلی ایران بویژه در سواحل مازندران تجمع می‌یابد. این ماهی در تمام فصول سال از غذاهای مختلف تغذیه می‌کند و وابستگی خاصی به نوع غذا ندارد و از مواد غذایی بستر و همچنین مواد معلق در آب استفاده می‌کند. ماهی کفال طلایی یوری ترم است و دمای ۳ تا ۳۵ درجه سانتیگراد را تحمل می‌کند. همچنین این ماهی یوری هالین بوده و در دامنه شوری صفر (آب شیرین) تا ۳۵ در هزار نیز می‌تواند زندگی کند. امروزه صید و بهره برداری از ماهیان کفال در سطح وسیعی رونق گرفته است. میزان صید ماهی کفال در ایران در طی سالهای ۵۶ - ۴۲ در دریای خزر بین ۵۲۴۳ - ۴۹ تن متغیر بوده است (امینی، ۱۳۶۸). این ماهی به همراه دو گونه دیگر از کفال

ماهیان بین سالهای ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ توسط دانشمندان روسی به تعداد حدود ۲ میلیون بچه ماهی ۱ تا ۲ ساله از دریای سیاه به دریای مازندران معرفی شد که در کمتر از ۱۰ سال در تمام نواحی دریای خزر گسترش یافت (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). صید کفال ماهیان در ایران از سال ۱۹۴۲ آغاز شد. طی سال‌های ۱۳۶۱-۱۳۶۲، به علت صید بی‌رویه به میزان ۶۹۷۵ تن لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد گردید (رضوی صیاد، ۱۳۶۹).

بررسی ژنتیک جمعیت ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آنها و بهره برداری پایدار بسیار ضروری است. در سالهای اخیر محققین مختلفی بر روی ساختار ژنتیکی خانواده کفال ماهیان با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره مطالعه کرده‌اند که از جمله می‌توان به مطالعات Xu و همکاران (۲۰۰۹) بر روی کفال سویی *Mugil soiuu*؛ Miggiano و همکاران (۲۰۰۵) و Xu و همکاران (۲۰۱۰) بر روی کفال خاکستری *Mugil cephalus*؛ و قدسی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی کفال طلایی اشاره نمود. مطالعه حاضر با این فرض انجام پذیرفت که ماهی کفال طلایی دارای جمعیت‌های متفاوت در حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد و فراوانی ژنوتیپی و الی هر یک از جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از ۱۲۰ نمونه ماهی بالغ کفال طلایی از چهار منطقه (هر منطقه ۳۰ نمونه) در جنوب دریای خزر شامل تالاب انزلی (E 44' 27' 49°, N 16' 28' 37°)، رامسر (E 57' 40' 50°, N 1.08' 54' 36°)، فریدونکنار (E 8.88' 32' 52°, N 20.04' 41' 36°) و تالاب گمیشان (E 53' 58' 54°, N 2' 20' 37°) از قسمت باله‌ی سینه‌ای صورت گرفت (شکل ۱). هر یک از نمونه‌ها جداگانه درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی الکل ۹۶ درصد قرار گرفت. برای نگهداری بهتر، نمونه‌ها تا شروع مرحله ی استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.



شکل ۱- نمایی از مناطق نمونه برداری از ماهی کفال طلایی (۱- تالاب گمیشان، ۲- فریدونکنار، ۳- رامسر، ۴- تالاب انزلی)

Xu *et al.*,) Muso22, Muso19, Muco16, Muso10 (2009) استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs، ۰/۲ میلی مولار؛ پرایمر یک میکرولیتر؛ DNA، ۱۰۰ نانوگرم؛ HotStarTaq™ DNA polymerase، ۰/۳ واحد؛ PCR بافر ۱x؛ کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در ۸/۷ pH انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره ای پلیمرز به ترتیب مرحله جداسازی ۹۵ - ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۴۷ تا ۵۶ درجه

استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت روچ آلمان، کد ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱) انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی از ۶ جفت نشانگر ریزماهواره استفاده گردید. از آنجاییکه ماهی کفال طلایی فاقد پرایمر اختصاصی است از ۶ جفت نشانگر ریزماهواره طراحی شده برای کفال خاکستری و کفال سویی استفاده شد. نشانگرهای طراحی شده برای کفال خاکستری شامل پرایمرهای Muce55 و Muce37 (Xu *et al.*, 2010) و کفال سویی شامل پرایمرهای

را نشان داد. حداکثر فراوانی اللی در مناطق نمونه برداری، در نمونه‌های تالاب گمیشان در جایگاه Muso-10، الل شماره ۳ با ۳۵۰ جفت باز؛ در نمونه‌های فریدون کنار در جایگاه Muso-10، الل شماره ۵ با ۳۹۶ جفت باز؛ در نمونه‌های رامسر در جایگاه Muso-22، الل شماره ۴ با ۱۹۸ جفت باز و در نمونه‌های تالاب انزلی در جایگاه Muso-16، الل شماره ۲ با ۲۷۴ جفت باز بدست آمد. مجموعاً ۶ الل اختصاصی در مناطق نمونه برداری یافت شد، ۳ الل در نمونه‌های تالاب گمیشان در جایگاه Muso-22 (آلل‌های ۲۰۴، ۲۰۸ و ۲۱۰ جفت باز)، ۲ الل در نمونه‌های فریدون کنار در جایگاه Muso-16 (آلل‌های ۳۰۰ جفت باز) و Muso-19 (آلل‌های ۲۸۴ جفت باز) و یک الل در نمونه‌های تالاب انزلی در جایگاه Muso-10 (۴۰۰ جفت باز) دیده شد. تمامی اللهای اختصاصی در فراوانی بیشتر از ۰/۰۵ قرار داشتند.

میانگین تعداد الل واقعی و موثر به ترتیب ۵/۷ و ۴/۲ و دامنه اللی از ۳ تا ۹ الل بدست آمد. دامنه اللی در جایگاه Muso-10 از ۳ تا ۷ الل ($A_R = 8/9$)، Muso-16 از ۳ تا ۶ الل ($A_R = 6/9$)، Muso-55 از ۵ تا ۸ الل ($A_R = 8/8$)، Muso-22 از ۴ تا ۹ الل ($A_R = 11/2$)، Muso-19 از ۵ تا ۸ الل ($A_R = 8/8$)، Muso-37 از ۵ تا ۹ الل ($A_R = 9/4$) و کاهش آن در نمونه‌های تالاب گمیشان و انزلی مشاهده گردید (جدول ۲).

در این بررسی دامنه H_0 در تمامی جایگاه‌ها از صفر تا یک با میانگین ۰/۳۶۵ و دامنه H_e از ۰/۵۸۰ تا ۰/۸۶۰ با میانگین ۰/۷۳۹ بود (جدول ۳). کمترین مقدار H_0 عدد صفر در جایگاه‌های Muso-10 (در نمونه‌های فریدون کنار و تالاب گمیشان)، Muso-22 (در نمونه‌های فریدون کنار، تالاب گمیشان و رامسر) و Muso-16 (در نمونه‌های تالاب انزلی) بدست آمد. بیشترین، ۰/۹۳۳ در جایگاه Muso-37 (در نمونه‌های فریدون کنار) بود. کمترین مقدار H_e ۰/۵۸۰ در جایگاه Muso-10 مربوط به نمونه‌های تالاب گمیشان و بیشترین آن، ۰/۸۶۲ در جایگاه Muso-19 در نمونه‌های فریدون کنار بود (جدول ۳).

سانتیگراد به مدت ۲۵ تا ۴۰ ثانیه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه برای ۳۵ چرخه بهینه سازی گردید (جدول ۱). محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت (Bassam et al., 1991). سپس تصویر ژل‌ها با استفاده از نرم افزار Uvitec مورد بررسی قرار گرفت.

پس از رتبه‌دهی به الل‌ها محاسبات آماری شامل فراوانی اللی^۱، تعداد اللهای (N_a) و تعداد اللهای موثر (N_e)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) و مشاهده شده (H_o)، ضریب خویشاوندی درون جمعیت (F_{is}) و ضریب خویشاوندی کل (F_{it})، تعادل هاردی وینبرگ براساس χ^2 ، تست تمایز بر اساس فراوانی اللی، فاصله ژنتیکی^۲ بر اساس Nei (۱۹۷۸) با نرم افزار GeneAlex محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2006). همچنین مقادیر شاخص تمایز R_{st} و F_{st} بر اساس تست AMOVA^۳ در سطح اطمینان ۹۹ درصد و غنی سازی اللی^۴ (A_R) با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.5 (Excoffier and Schneider, 2005) با استفاده از ۱۰۰۰۰ شبیه سازی در هر مورد نیز محاسبه گردید.

نتایج

در این مطالعه ۶ جایگاه مورد بررسی در واکنش زنجیره‌های پلیمرز تکثیر شدند و چند شکلی نشان دادند. در هنگام شمارش الگوی باندهای یک باند (با اندازه‌های اللی متفاوت) و در برخی موارد دو باند دیده شد. اندازه اللی بدست آمده از ۱۱۶ تا ۴۰۰ جفت باز بود (جدول ۱). در کل ۵۸ الل در ۱۲۰ نمونه شناسایی شد. که از میان آن در منطقه تالاب گمیشان ۲۷ الل، فریدون کنار ۳۲ الل، رامسر ۲۸ الل و تالاب انزلی ۲۷ الل غیر اختصاصی (الل مشترک) با فراوانی بیش از ۰/۰۵ درصد دیده شد. جایگاه Muso-22 بیشترین میزان فراوانی اللی (۰/۰۶۷ تا ۰/۵۶۷ درصد)

¹ Allel frequency

² Genetic distance

³ Analysis of Molecular Variance

⁴ Allelic Richment

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ریزماهواره مورد استفاده برای ماهی کفال طلائی

منبع	اندازه اللها	چرخه/دما(°C)	شماره بانک ژن	توالی پرایمرها	جایگاه
Xu et al., 2009	۳۴۰-۴۰۰	۵۴/۳۰	EU570285	F:TTGCTCAGGGAACACATTGA R:CAAACAGAGACGTGATGCAAA	Muso10
	۲۷۲-۳۰۰	۵۶/۳۰	EU570291	F:TGAACTGTGACCCTCGTGA R:GGAGAGGTTGGCTCGTCATA	Muso16
	۱۶۶-۲۸۴	۵۶/۳۰	EU570294	F:CACCACTATGGCATCCTTCA R:AACCCCTTTTCTTGCTCAA	Muso19
Xu et al., 2010	۱۸۲-۲۱۰	۵۱/۴۰	EU570297	F:TGATGAGAATGGTGGTGACG R:TTTTGGGCTGCTTGTCTCTC	Muso22
	۱۹۲-۲۴۸	۵۱/۲۵	HM060973	F:TACTCAGCCAGCAGGTGT R:AATACAGGGTTGTTGTCG	Muce-37
	۱۱۶-۱۵۲	۴۷/۴۰	HM060977	F:AGAAGAAGACAGGGACTC R:AGAAATACTCTGCTAACCT	Muce-55

جدول ۲- تعداد اللها (تعداد اللها: N_a ، تعداد اللهای موثر: N_e ، غنی سازی اللی: A_R) در جایگاههای مورد بررسی و در مناطق مختلف

نمونه برداری ماهی کفال طلائی

تالاب گمیشان	فریدونکنار	رامسر	تالاب انزلی	جایگاه / مناطق نمونه برداری
۳	۴	۶	۴	N_a
۲/۳	۲/۴۷۳	۴/۴۸۹	۳/۹	N_e Muso10
۴	۷	۳	۳	A_R
۴	۷	۳	۳	N_a
۳/۶	۴/۹۴۵	۲/۹۳۶	۲/۹	N_e Muso16
۳	۴	۶	۴	A_R
۴	۹	۹	۴	N_a
۲/۷	۷/۲۵۸	۵/۱۶۷	۳/۲	N_e Muso19
۸	۸	۵	۸	A_R
۴	۵	۵	۵	N_a
۳/۷	۴/۲۰۶	۲/۶۷۹	۵/۸	N_e Muso22
۴	۹	۹	۴	A_R
۸	۵	۹	۹	N_a
۵/۸	۴/۳۲۷	۶/۶۹۱	۷/۱	N_e Muce-37
۸	۵	۹	۹	A_R
۸	۸	۵	۸	N_a
۵/۶	۳/۷۹۷	۳/۰۹۳	۴/۶	N_e Muce-55
۸	۸	۵	۸	A_R
۵/۱	۶/۳	۶/۱	۵/۵	N_a میانگین
۳/۹	۴/۵	۴/۱	۴/۲	N_e

دامنه شاخص تمایز F_{st} بر اساس فراوانی اللی از $0/049$ تا $0/182$ و جریان ژنی $1/12$ تا $4/87$ بدست آمد (جدول ۴)، که نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط می باشد (Balloux and Lugan, 2002). میزان F_{st} ($0/141$) و R_{st} ($0/350$) بر اساس تست AMOVA، معنی دار بود ($P < 0/01$). دامنه فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، $0/603$ تا $0/551$ و دامنه شباهت ژنتیکی $0/397$ تا $0/449$ بدست آمد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس شاخص تمایز R_{st} نیز نشان داد که 44 درصد تنوع مربوط به درون جمعیتها، 35 درصد به بین جمعیتها و 21 درصد بین افراد می باشد.

در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاهها خارج از تعادل بودند ($P \leq 0/001$). میانگین ضریب خویشاوندی درون جمعیت (F_{is})، $0/178 \pm 0/528$ و ضریب خویشاوندی کل (F_{it})، $0/168 \pm 0/572$ به دست آمد. F_{is} به جز در جایگاه Muso-37 در تمامی جایگاههای ریزماهواره مثبت بود و دامنه آن از $-0/068$ در جایگاه Muso-37 تا $0/938$ در جایگاه Muso-10 محاسبه گردید (جدول ۳). مقادیر مثبت F_{is} نشان دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Muso-37 با کمترین میزان F_{is} به طور میانگین بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاهها نشان داد.

جدول ۳- مقادیر ضریب خویشاوندی (F_{is})، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و قابل انتظار (H_e)، انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ ($P < 0/001$ ***؛ $P < 0/01$ **)

F_{is}	تالاب گمیشان	فریدونکنار	رامسر	تالاب انزلی	جایگاه / مناطق نمونه برداری
	.	.	$0/167$	$0/900$	H_o
$0/938$	$0/580$	$0/596$	$0/777$	$0/860$	H_e
	***	***	***	***	Signif _{HW}
	$0/267$	$0/467$	$0/167$.	H_o
$0/684$	$0/729$	$0/798$	$0/659$	$0/658$	H_e
	***	***	***	***	Signif _{HW}
	$0/200$	$0/333$	$0/267$	$0/067$	H_o
$0/711$	$0/638$	$0/862$	$0/807$	$0/694$	H_e
	***	***	***	***	Signif _{HW}
	.	.	.	$0/367$	H_o
$0/872$	$0/731$	$0/762$	$0/627$	$0/738$	H_e
	***	***	***	***	Signif _{HW}
	$0/700$	$0/933$	۱	$0/900$	H_o
$-0/068$	$0/828$	$0/769$	$0/851$	$0/860$	H_e
	***	***	***	***	Signif _{HW}
	$0/900$	$0/700$	$0/700$	$0/633$	H_o
$0/029$	$0/822$	$0/737$	$0/677$	$0/786$	H_e
	***	**	***	***	Signif _{HW}
	$0/344$	$0/406$	$0/383$	$0/328$	
	$0/721$	$0/754$	$0/723$	$0/747$	میانگین

جدول ۴- شاخص تمایز F_{st} (در بالای قطر) و جریان ژنی Nm (در قسمت پایین قطر) در مناطق نمونه برداری شده ماهی کفال طلایی

F_{st}				
نمونه‌ها	تالاب گمیشان	فریدونکنار	رامسر	تالاب انزلی
تالاب گمیشان		۰/۱۱۱	۰/۰۸۴	۰/۱۱۳
فریدونکنار	۱/۹۹۸		۰/۰۷۸	۰/۰۶۲
رامسر	۲/۷۴۳	۲/۹۶۹		۰/۰۸۱
تالاب انزلی	۱/۹۷۱	۳/۸۱۰	۲/۸۲۵	

بحث

تعدادی از ال‌ها می‌گردد) بازگردد. طی سال‌های پس از انقلاب، صید بی‌رویه کفال ماهیان در وزن اندک ۲۱۰ گرم، لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد نموده است (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). به طور کلی، تعداد کم ال نشانه‌ای از تنگنای ژنتیکی^۵ است که در جمعیت‌های وحشی، ممکن است به علت جدا شدن جمعیت و یا کاهش شدید اندازه مؤثر ایجاد شود (Ha et al., 2006). با توجه به اینکه ماهی کفال طلایی بومی دریای خزر نمی‌باشد این احتمال وجود دارد که کوچک بودن جمعیت مؤثر در ابتدای ورود از دریای سیاه به دریای خزر عامل تنوع الی اندک باشد (قدسی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین، وجود ال‌های زیاد با فراوانی پایین علاوه بر احتمال تنگنای ژنتیکی، می‌تواند به علت اثرات آمیزش خویشاوندی باشد (Alarcon et al., 2004). میانگین ضریب خویشاوندی F_{is} و مثبت بودن F_{it} نیز در دو منطقه تایید کننده این امر است. در مقایسه مناطق نمونه برداری این بررسی، تعداد ال‌ها در مناطق نمونه برداری فریدونکنار و رامسر کمی بیشتر از تالاب گمیشان و انزلی بود. علت آنرا می‌توان صید بی‌رویه، وضعیت نامناسب زیست محیطی تالابهای گمیشان و انزلی به علت وجود آلودگی و تخریب تالابها دانست که شرایط زیست را برای ماهیان این مناطق دشوار کرده است.

در مقایسه هتروزیگوستی، قدسی و همکاران در سال (۱۳۹۰) در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی دامنه هتروزیگوستی مشاهده شده را بین ۱-۰/۷۱۴ اعلام

نشانگرهای ژنتیکی مختلفی برای بررسی ساختار جمعیت وجود دارد اما در بین تمامی آنها ریزماهورها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده نمود (Cui et al., 2005). در بررسی حاضر دامنه الی در ماهی کفال طلایی ۳ تا ۹ ال در جایگاه‌های مختلف بدست آمد. این در حالی است که قدسی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تنوع ژنتیکی کفال طلایی در سواحل استان گلستان با استفاده از پنج جایگاه ریزماهوره میانگین دامنه الی را ۲۰-۸ ال به دست آوردند. در مقایسه دامنه الی با سایر کفال ماهیان، Xu و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کفال خاکستری، میانگین دامنه الی ۱۱-۲ به دست آوردند. Xu و همکاران (۲۰۰۹) در کفال سویی میانگین دامنه الی ۹-۳ اعلام کردند. Miggiano و همکاران (۲۰۰۵) در کفال مخطط میانگین دامنه الی را برای نمونه‌های جزیره ساردینیا ۳۸-۱۴ ال و برای نمونه‌های استرالیا ۲۵-۱۱ ال محاسبه کردند. نتایج بررسی حاصل بر روی ماهیان کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین تعداد ال‌های به دست آمده در این بررسی (۵/۷) کمتر از دامنه اعلام شده ($19/9 \pm 6/6$) برای ماهیان آب شور است (Dewoody and Avis, 2000). تفاوت در تعداد ال به عوامل متعددی از جمله به تعداد نمونه، تعداد جایگاه مورد بررسی، زمان نمونه برداری، دقت در اندازه گیری باندها و غیره دارد. همچنین ممکن است علت این امر به صید بی‌رویه این گونه و در نتیجه کوچک شدن جمعیت‌ها در سالیان گذشته (که منجر به از دست رفتن

⁵ geneticbottleneck

شده، آلودگی زیست محیطی، تخریب زیستگاه اصلی (تالاب انزلی) طی چند دهه گذشته است که بر آیند آن از بین رفتن زیستگاههای طبیعی و کاهش منابع غذایی (ماهی کفال طلایی) در سالهای اخیر بوده، که منجر به کاهش ذخایر آن در تالاب انزلی شده است (زبردست و جعفری، ۱۳۹۰). منطقه تالاب گمیشان نیز تحت تاثیر یک اقلیم خشک و نیمه خشک و در نتیجه تناوب بارانهای سالانه است. بنابراین نوسان سطح تالاب در گرو تناوب (سالهای پر باران و کم باران) است (خطیبی، ۱۳۸۴). علاوه بر شرایط اقلیمی خاص، اجرای پروژه های نفتی از جمله طرح پالایشگاه و پتروشیمی، تخلیه زباله و فاضلاب، پساب و ضایعات مزارع پرورش میگو گمیشان که وارد تالاب می شود، موجب مرگ ماهیان تالاب (از جمله کفال طلایی) می گردد (حسن پور و همکاران، ۱۳۹۰). ادامه چنین روندی در این دو تالاب موجب مرگ و میر ماهیان، کوچک شدن اندازه جمعیت و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی می گردد و در صورت تداوم وضع موجود احتمال کاهش شدید ذخایر این گونه در این تالابها در آینده نزدیک وجود دارد. از آنجاییکه در این بررسی میانگین ضریب خویشاوندی مثبت بود، این احتمال وجود دارد که کاهش هتروزیگوسیتی به این علت باشد که از افراد خویشاوند در یک محل، نمونه برداری شده باشد و یا ناشی از تنوع ژنتیکی پایین در بچه کفال ماهیان اولیه ای باشد که از دریای سیاه به دریای خزر وارد شده اند. ممکن است مولدین اولیه از یک یا دو منطقه نزدیک به هم در دریای سیاه انتخاب شده اند و یا تنوع ژنتیکی این گونه در دریای سیاه پایین باشد، که متأسفانه اطلاع کافی از محل برداشت کفال در دریای سیاه موجود نیست (قدسی، ۱۳۹۰).

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، کلیه نمونه ها در تمامی جایگاه ها و همه مناطق خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). انحراف از تعادل هاردی -واینبرگ در جمعیت ماهیان زیاد است (Lucentini et al., 2009). چنین نتیجه ای در مورد کفال ماهیان توسط سایر محققین گزارش شده است و علت آنرا در ماهی کفال طلایی ناشی از وجود الل های نول دانستند (Xu et al., 2009; Xu et al., 2010). در صورت وجود الل های نول، هتروزیگوسیتها به اشتباه به

کردند. در مقایسه با مطالعات مشابه بر روی سایر کفال ماهیان، Xu و همکاران (۲۰۱۰) دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ماهی کفال خاکستری را بین ۰/۸۹۶ - ۰/۲۵۹ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۴۵ - ۰/۳۰۴ بدست آوردند. Xu و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی کفال سویی، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۹۱۶ - ۰/۲۰۸ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۸۱ - ۰/۲۶۵ بدست آوردند. Miggiano و همکاران (۲۰۰۵) دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ماهی کفال مخطط را بین ۱ - ۰/۳۸۹ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۲۶ تا ۰/۹۵۲ بدست آوردند. نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کفال طلایی نشان می دهد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۳۶۵ ± ۰/۰۷) کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان آب شور (۰/۲۲ ± ۰/۰۷) است (Dewoody and Avis, 2000). در این بررسی هتروزیگوسیتی مشاهده شده در برخی جایگاه ها و در همه مناطق نمونه برداری، نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. با این حال، کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار، کاهش تنوع اللها و همچنین وجود اللهایی با فراوانی پایین، نشان از وجود تنگنای ژنتیکی در ذخایر این گونه می باشد. از آنجاییکه کفال ماهیان گرما دوست هستند و نسبت به کاهش درجه حرارت آب حساسیت فوق العاده ای دارند، به دلیل سرد شدن هوا از سواحل شمالی دریای خزر به سمت سواحل ایران مهاجرت می کنند و در اواخر پاییز به دلیل افت درجه حرارت به زیر ۱۰ درجه سانتیگراد و نیز کمبود مواد غذایی، به سواحل نزدیک می شوند. صید بی رویه و عوامل زیست محیطی (آلاینده های زیستی) همگی منجر به کاهش تکثیر طبیعی این ماهی می شوند، بنابراین به تدریج موجب کوچک شدن جمعیت و کاهش تنوع ژنتیکی می گردد. کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده و در نتیجه موجب کاهش در اندازه جمعیت می شود (Shen and Gong, 2004). بر اساس نتایج این بررسی (جدول ۳)، کاهش هتروزیگوسیتی در نمونه های تالاب انزلی را می توان به مشکلاتی از قبیل صید بی رویه خصوصاً در مناطق حفاظت

ورود این گونه به دریای خزر (قدسی و همکاران، ۱۳۹۰)، صید بی‌رویه و آلودگی زیست محیطی در حوضه جنوبی دریای خزر بویژه تالابهای انزلی و گمیشان، وجود آمیزش‌های خویشاوندی همگی از دلایل کاهش اندازه جمعیت و در نتیجه کاهش تنوع الل‌ها در این ماهی می‌تواند باشد. وجود اللهای اختصاصی و تفاوت در فراوانی الل غالب در هر یک از مناطق نمونه برداری و شاخص تمایز معنی‌دار نشان دهنده وجود گروه‌های ژنتیکی متفاوت ماهی کفال طلایی در جنوب دریای خزر است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام پذیرفت. از تمامی همکاران گرامی در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

امینی، ف، ۱۳۶۸. بررسی ماهیان کفال و آدابتاسیون آنها به آب شیرین، پایان نامه جهت دریافت دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

حسن پور، م؛ پورخباز، ع؛ قربانی، ر.، ۱۳۹۰. اندازه گیری فلزات سنگین در آب، رسوب و پرند و وحشی چنغر در حاشیه جنوب شرقی دریای خزر. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱، ص. ۱۸۳-۱۹۴.

خطیبی، ن.، ۱۳۸۴. تالاب بین المللی گمیشان در تهدید جدی طرح های نفتی، گزارش کانون دیده بانان زمین، <http://www.earthwatchers.org/gomishan.html>.

رضوی صیاد، ب.، ۱۳۶۹. مدیریت ذخایر ماهیان استخوانی اقتصادی دریایی مازندران. اولین کنفرانس ملی بهره برداری مناسب از ذخایر آبزیان، سازمان شیلات استان مازندران، بابلرسر.

زبردست، ل؛ جعفری، ح.، ۱۳۹۰. ارزیابی روند تغییرات تالاب انزلی با استفاده از سنجش از دور و ارائه راه حل مدیریتی، محیط شناسی، شماره ۵۷، سال سی و هفتم، ص. ۶۴-۵۷.

عنوان هموزیگوت‌هایی برای الل دیگر در نظر گرفته شوند که می‌تواند علتی برای کاهش هتروزیگوسیت‌ها در جمعیت باشد. قدسی و همکاران (۱۳۹۰) علت آنرا اشتباه در هنگام خواندن الل و انحراف تصادفی بیان نمودند. در بررسی حاضر به نظر می‌رسد علت انحراف از تعادل، مخلوط شدن نمونه‌های مناطق مختلف در هنگام مهاجرت و ترکیب زیرجمعیت‌ها (ارتباط ژنی)، و شاید وجود خطای نمونه برداری با توجه به احتمال کوچک شدن جمعیت این ماهیان و تعداد کم نمونه‌ها باشد.

شاخص تمایز F_{st} نشان دهنده درجه تمایز ژنتیکی است و برای جداکردن جمعیت‌ها استفاده می‌شود. مقدار این شاخص بر اساس فراوانی اللی، بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و بیشتر از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Wright, 1965). میزان F_{st} بر اساس فراوانی اللی ۰/۱۲۷ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی متوسط می‌باشد و میزان جریان ژنی ۲/۱ محاسبه گردید. شاخص تمایز R_{st} و F_{st} بر اساس تست AMOVA بین نمونه‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.01$)، بنابراین احتمالاً گروه‌های مختلف ژنتیکی در این مناطق زیست می‌کنند. با وجود تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه، علت تمایز ژنتیکی متوسط وجود جریان ژنی بین مناطق نمونه‌برداری است. با توجه به اینکه کفال ماهیان می‌توانند به علت نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی به مناطق مختلف در سواحل جنوبی دریای خزر مهاجرت نمایند، لذا وجود تمایز ژنتیکی متوسط می‌تواند به علت همین مهاجرت‌ها باشد. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲) Thorpe and Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جدایی جمعیت‌ها را به طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۰۳ تا ۰/۶۱) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد و نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است. نتایج این بررسی نشان دهنده وجود گروه‌های ژنتیکی متفاوت ماهی کفال طلایی و تنوع ژنتیکی پایین این گونه است که نشان از وجود تنگناهای ژنتیکی در مناطق نمونه برداری می‌باشد. وجود جمعیت موسس کوچک در ابتدای

- compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56: 461-473.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Ha, H.P., Nguyen, T.T., Poompuang, S. and Na-Nakorn, U., 2009.** Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture*, 291: 154-160.
- Lee, C.E., 2002.** Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecology Evolution*, 17: 386-391.
- Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Sgaravizzi, G., Natali, M. and Panara F., 2009.** Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox Lucius*) population. *Fisheries Research*, 96:139-147.
- Miggiano, E., Lyons R.E., Li, Y., Dierens, L.M., Crosetti, D. and Sola, L., 2005.** Isolation and Characterization of microsatellite loci in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *Molecular Ecology*, 5: 323-326.
- Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- قدسی، ز؛ شعبانی، ع؛ شعبانیپور، ب.، ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی (Risso, 1810) *Liza aurata* در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال سوم، شماره ششم، ۴۶-۶۳۵.
- Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E. and Alvarez, M.C., 2004.** Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 230:65-80.
- Balloux, F. and Lugon-Moulin, N., 2002.** The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gressoff, G.M., 1991.** Fastandsensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry*, 84: 680-683.
- Chen, L., Li, Q. and Yang, J., 2008.** Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicas selenka*) from northern China. *Aquaculture Research*, 39:1541-1549.
- Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yang, G.P., Gong, Q.L. and Gu, Q.Q., 2005.** Characterization of microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommmus*. *Aquaculture*, 250: 129-137.
- Dewoody, J.A. and Avise, J.C., 2000.** Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadramous fishes

- Peakall, R. and Smouse P.E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Shaklee, J.B., Tamaru, C.S. and Waples, R.S., 1982.** Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*, 36:141-157.
- Shen, X.Y. and Gong, Q.L., 2004.** Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. *Oceanol Limnology Science*, 35: 332-341.
- Thorpe, J.P. and Sole-Cava, A.M., 1994.** The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23:3-18.
- Xu, G., shao, Ch., Liao, X., Tian, Y. and Chen, S., 2009.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from so-iuy mullet (*Mugil soiuy* Basilewsky 1855). *ConservationGenetics*, 10: 653-655.
- Xu, T.J., Sun, D.Q., Shi, G. and Wang, R.X., 2010.** Devlopment and characterization of polymorphic microsatellite markers in the gray mullet (*Mugil cephalus*), *Gentics and Molecular Research*, 9: 1791-1795
- Waples, R.S., 1987.** A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 41: 385- 400.
- Wright, S., 1965.** The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolutionary*, 19, 395-420.
- Zhao, N., Ai, W., Shao, Z.I., Zhu, B., Brosse, S. and Chang, J., 2005.** Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 7-13.

Microsatellite DNA analyses of the genetic structure of golden mullet (*Liza aurata*)

Norouzi M. ^{*1}, Behrouz M. ¹

* mnoroozi@toniau.ac.ir

1- Department of Marine Biology and Fisheries Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Received: April 2014

Accepted: June 2016

Keywords: Golden mullet, *Liza aurata*, Population genetic, Microsatellite, Caspian Sea

Abstract

Genetic structure of golden mullet, *Liza aurata*, investigated in southern Caspian Sea using microsatellite markers. Totally 120 samples of adult golden mullet were collected from four regions, Anzali and Gomishan wetlands, Ramsar and Fereydunkenar coastlines. All primer sets as polymorphic loci were used to analyze the genetic variation. Analyses revealed that average of alleles per locus was 5.7 (range 3 to 9 alleles). Some sampled regions contained private alleles. The average estimates of inbreeding coefficient values of microsatellites were positive. The average observed and expected heterozygosity was 0.365 and 0.739 respectively. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were in all cases. F-statistics and gene flow estimates in allele frequencies were 0.127 and 2.11 respectively. R_{st} and F_{st} estimates in AMOVA indicated significant genetic differentiation among regions. Genetic distance indicated that the genetic difference among the studied populations is pronounced. The data generated in this study provides the genetic variation and differentiation groups of golden mullet in south Caspian Sea.

* Corresponding author