

مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک در دو منطقه صیادی سواحل استان مازندران با استفاده از نشانگر ریزماهواره

لقمان نادری^{۱*}، علی شعبانی^۱، بهاره شعبانپور^۱، حمید رضا رضایی^۲

۱. گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲. گروه محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۵

چکیده

کفال پوزه باریک گونه غیربومی دریای خزر است که در سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ از دریای سیاه به دریای خزر معرفی گردید و با موفقیت استقرار یافت و در حال حاضر از گونه‌های اقتصادی دریای خزر است. از آنجا که پس از ۸ دهه حضور هیچ اطلاعاتی در سطح مولکولی در مورد این گونه در دریای خزر وجود ندارد. لذا در این مطالعه به منظور بررسی ساختار ژنتیکی کفال پوزه باریک در دو منطقه بابلسر و تنکابن استان مازندران، از ۶ لوکوس ریزماهواره استفاده شد. نتایج غنای آللی پایین ($Na = 5$) و سطح هتروزایگوسیتی را بالا ($Ho = 0.821$) نشان داد؛ بنابراین تنوع ژنتیکی این گونه نسبت به ماهیان دریایی بسیار پایین است. همچنین شاخص تمایز ژنتیکی بین مناطق بسیار پایین بود (0.032) که می‌تواند به دلیل مهاجرت‌های طبیعی این گونه و پدید آمدن جریان ژنی بالا ($10/4$) بین این مناطق باشد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، دریای خزر، ریزماهواره، کفال پوزه باریک، *Liza saliens*

۱. مقدمه

دریای خزر اقامتگاهی بی نظیر برای حدود ۱۱۵ گونه و زیر گونه ماهی است (عبدلی، ۱۳۷۸). اما به دنبال تغییر شرایط دریای خزر و از بین رفتن زیستگاه‌های تولید مثل ماهیان بومی دریای خزر از جمله رودخانه‌ها (ایرانی، ۱۳۸۳)، در سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ محققین روسی دو گونه ماهی کفال پوزه باریک و کفال طلایی از دریای سیاه را به دریای خزر پیوند زدند (Dmitriev, 1964; Berg, 1965). این دو گونه برای تولید مثل نیاز به رودخانه‌ها ندارند و در دریا تخم ریزی می‌کنند. با توجه به شرایط ایده‌آل دریای خزر، این ماهی‌ها توانستند با سرعت چشم گیری در کمتر از ده سال در تمامی سواحل دریای خزر گسترش یابند و جمعیت بسیار چشمگیری را در سواحل خزر جنوبی تشکیل دهند (Beliaeva et al., 1989) و از اواخر دهه ۱۹۶۰ به بعد جز جانوران بومی دریای خزر شناخته شدند (Khoroshko, 1989). صید کفال ماهیان در ایران از سال ۱۹۴۲ آغاز شد. به دنبال آن طی سال‌های ۱۳۴۷ تا ۱۳۵۸ میانگین صید به بیش از ۲۰۰۰ تن رسید. صید بی رویه کفال ماهیان (۶۹۷۵ تن در سال) بهره برداری ۶۲-۱۳۶۱ لطمه شدیدی به ذخایر آن‌ها وارد کرد (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). همچنین در دو دهه اخیر علاوه بر کاهش میزان ذخایر صید، گزارش تلفات و مرگ و میر و عارضه نفخ در ماهی کفال پوزه باریک که بسیار شایع شده است، توسط (سلطانی و رهاننده، ۱۳۸۰) حاکی از وضعیت مبهم این گونه در دریای خزر است.

تنوع ژنتیکی مینا و اساس تکامل، سازگاری و گونه زایی است. سطوح بالای تنوع به عنوان سلامتی جمعیت، وجود توانایی در پاسخ به تهدیدهایی مانند بیماری‌ها، انگل‌ها و شکارچی‌ها و همچنین تغییرات محیطی شناخته می‌شود. بلعکس سطوح پایین تنوع، نشان از توانایی پایین گونه در پاسخ به تهدیدها در زمان‌های طولانی و کوتاه است (Amos and Harwood, 1998) بنابراین وجود تنوع ژنتیکی برای بقای یک گونه ضروری است (Bataillon et

al., 1996); به طوری که بررسی‌های ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان با ارزش اقتصادی به منظور حفاظت از جمعیت آن‌ها و حفظ صید پایدار ضروری است (Wang et al., 2007); به همین منظور از نشانگرهای مختلفی مانند مورفولوژیک، سیتوژنتیک و مولکولی استفاده می‌شود. نشانگرهای مورفولوژیک به رغم کارایی بالا در تشخیص و طبقه بندی گونه، به علت تأثیرپذیری از محیط، کارایی کمتری در تعیین میزان تنوع ژنتیکی دارند (Kalo et al., 2000; Echt et al., 1994; Brummer et al., 1991). نشانگرهای مولکولی می‌توانند در جهت رفع این مشکلات با هدف شناسایی پتانسیل ژنتیکی ذخایر توارثی، کمک شایانی بنمایند (Kashi et al., 1997). ریزماهورها در میان نشانگرهای مولکولی به دلیل فراوانی و گستردگی بالا در ژنوم، همباز بودن توارث مندی و همچنین پلی مورفیسم بالایشان در مطالعات ژنتیک جمعیت بر دیگر نشانگرها برتری داشته و بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen et al., 2008; Dewoody and Avise, 2000). این نشانگرها شامل توالی دوگانه تکراری کوتاه (۲-۶ جفت باز) از DNA هستند. این توالی‌ها در نتیجه جهش در تعداد واحدهای تکراری حتی در میان خویشاوندان خیلی نزدیک بسیار متنوع هستند (Lit and Luty, 1989).

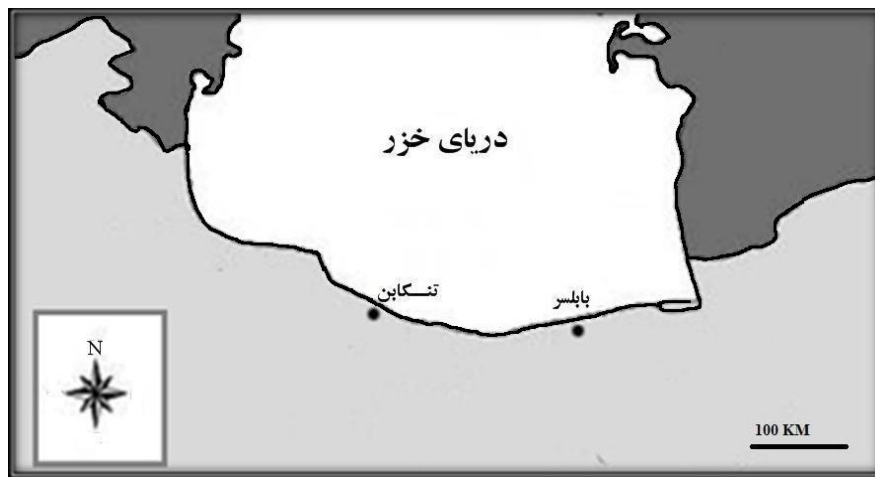
پژوهش حاضر برای اولین بار بر روی این گونه پس از معرفی به دریای خزر در سطح مولکولی انجام شده است. مطالعات فضلی (۱۳۷۸)، یوسفیان (۱۳۸۲)، فضلی و غنی‌نژاد (۱۳۸۳)، پورفرج (۱۳۸۵) و پاتیمار (۲۰۰۸) بیشتر بر روی جنبه‌های زیست‌شناسی و ریخت‌شناسی این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر بوده است. بنابراین سعی شد در این تحقیق با تکیه بر روش‌های مولکولی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این گونه در دو منطقه تنکابن و بابلسر در استان مازندران که از مناطق صید بالای این گونه هستند با استفاده از نشانگر ریزماهوره مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA

نمونه‌برداری از ۵۷ عدد ماهی کفال پوزه باریک از سواحل تنکابن (۳۰ عدد) و بابلسر (۲۷ عدد) در

استان مازندران از شرکت پره‌های صیادی صورت پذیرفت (شکل ۱). حدود ۲-۳ گرم از باله هر ماهی جدا شد و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۶٪ قرار داده شد.

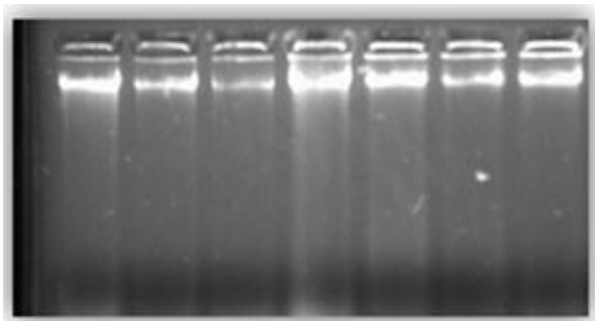


شکل ۱. موقعیت تقریبی مناطق مورد بررسی در سواحل جنوبی دریای خزر

استخراج DNA، با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام شد (Hillis *et al.*, 1996)؛ بدین صورت که مقداری بافت باله در بافر (Tris) ۰/۰۵ مولار، EDTA ۰/۰۱ مولار، NaCl ۰/۱ مولار) له و ۳۰ میکرولیتر SDS ۲٪، ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) به نمونه‌ها اضافه و در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند. سپس فنول و کلروفرم به تناوب زمانی ۲۰ دقیقه به نمونه‌ها اضافه و پس از سانتریفیوژ و جدا کردن فاز رویی، DNA نمونه‌ها با اتانول سرد رسوب داده شد و با اتانول ۷۰٪ شستشو و پس از خشک شدن در دمای محیط، به هر یک از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر -۲۰ انتقال داده شدند. کیفیت و کمیت DNA های استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۲) و اسپکتروفتومتر تعیین گردید (Sambrook *et al.*, 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و الکتروفورز

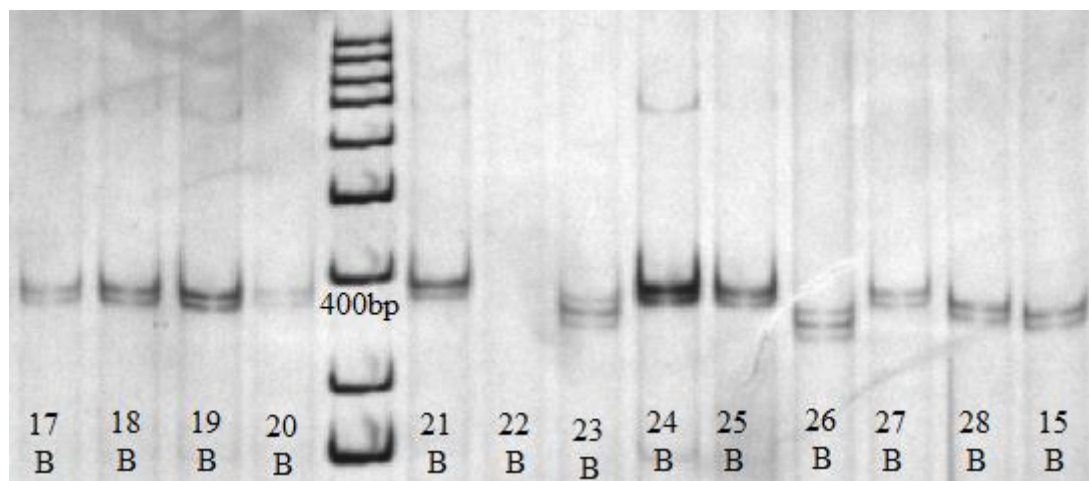
جهت انجام واکنش‌های زنجیری پلی‌مراز (PCR) از ۵ جفت آغازگر ریزماهوره: Mcs 16EM و Mcs 15AM (Miggiano *et al.*, 2005) و Muso09، Muso10، Muso19 و Muso27 (Xu *et al.*, 2009) استفاده شد. حجم واکنش PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر کیت PCR شرکت سیناژن و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. همچنین چرخه‌های حرارتی شامل: واسرشته سازی اولیه: ۱ سیکل ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه، ۳۲ سیکل ۹۴ درجه‌ای به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه (بسط)، و ۱ سیکل ۷۲ درجه‌ای به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی بود. محصول PCR جهت تفکیک باندها بر روی ژل عمودی آکریل امید عمودی ۸٪ الکتروفورز شد و سپس جهت آشکارسازی باندهای DNA، ژل‌ها با استفاده از روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند (Bassam *et al.*, 1991) و تصویر آن‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل تهیه شد (شکل ۳).



شکل ۲. کیفیت باندهای DNA استخراج شده ماهی کفال پوزه باریک بر روی ژل آگارز ۱٪

جدول ۱. توالی و ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ریزماهوره کفال پوزه باریک

جایگاه ژن	دمای اتصال	توالی آغازگرها	کد دسترسی
Muso09	۵۷	F: TCGCTGAAGGCACTAAATCA R: CGAGCTCACGTACAGCAAAT	EU570284
Muso10	۵۶	F: TTGCTCAGGGAACACATTGA R: CAAACAGAGACGTGATGCAAA	EU570285
Muso19	۵۶	F: CACCACTATGGCATCCTTCA R: AACCCCTTTTCTTGCTCAA	EU570294
Muso27	۶۱	F: CTTGGCTGCCTGTATCCTGT R: CCTGAGAGTGAGGGGTCAAC	EU570302
Mcs16EM	۶۱	F: CAGATTGTTGTTTCGGGAGGGCAG R: GTCATGATGCTGCTATCAGGCAAA	AY770930
Mcs15AM	۶۲	F: GAGCCAAACTGGTCACATGAAAGAGA R: ACTTTCAGTGCAGCGCCCAAGTGT	AY770927



شکل ۳. تفکیک باندهای محصول PCR نمونه‌های ماهی کفال پوزه باریک بر روی ژل آکرل آمید ۸٪

افزار محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2006). در نرم‌افزار Cervus v. 3.0.3 ظرفیت اطلاعات چند شکلی^۱ جایگاه‌ها به دست آمد. از تست کروس-کالواریس غیر پارامتریک در نرم‌افزار SPSS 16 جهت تعیین سطح معنی داری تفاوت مناطق در میزان الل-

آنالیز داده‌ها

از نرم‌افزار GenAlex 6.4 جهت برآورد تعداد الل-های واقعی و موثر و هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار هر جایگاه ژنی در سطح جمعیت استفاده شد. همچنین میزان تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها (F_{st}) بر اساس آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از همین نرم

^۱ Polymorphic Information Content

کمی از تنوع مشاهده شده مربوط به بین جمعیت‌ها بود در واقع درصد زیاد تنوع در داخل خود جمعیت‌ها وجود داشت. در جدول ۳ مقادیر آنالیز واریانس ژنتیکی بر اساس F_{st} نشان داده شده است. شاخص F_{is} به توزیع هاردی-واینبرگ ژنوتیپ نمونه‌های درون زیر جمعیت‌ها مربوط می‌شود (Carvalho, 1998). مقدار این شاخص در جایگاه Moso19 بیشتر از صفر (۰/۴۹۴) و در سایر جایگاه‌ها کمتر از صفر بود. در این بررسی میانگین میزان این شاخص ۰/۲۰۳- به دست آمد. در جدول ۴ میزان این شاخص برای تمام جایگاه‌ها آورده شده است.

جریان ژنی بین دو منطقه ۱۰/۴ به دست آمد. جدول ۴ میزان جریان ژنی در سطح جایگاه‌ها را نشان می‌دهد. همچنین بر اساس معیار فاصله ژنتیکی Nei میزان شباهت زیاد (۰/۹) و فاصله ژنتیکی کم (۰/۱) بین دو منطقه وجود داشت. نتایج آزمون تنگنای ژنتیکی بر اساس تست ویلکاکسون و $Sign$ در مدل TPM که بیشتر با داده‌های ریز ماهواره سازگار است نشان داد که در جمعیت تنکابن طبیعی بوده ولی جمعیت بابلسر در معرض تنگنای ژنتیکی قرار دارد. (جدول ۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

ماهی کفال پوزه باریک از جمله گونه‌های اقتصادی سواحل دریای مدیترانه، دریای سیاه، سواحل شرقی اقیانوس اطلس است (Katselis, 2002). در دهه‌های اخیر نیز، پس از معرفی و گسترش در سواحل دریای خزر، ارزش اقتصادی بالایی پیدا کرده است. اما با توجه با اهمیت گونه کفال پوزه باریک به عنوان یک گونه پیوندی و غیر بومی به دریای خزر، تا کنون اطلاعات ساختار ژنتیکی این گونه در دریای خزر بررسی نشده است؛ علاوه بر این متأسفانه جایگاه‌های ژنی اختصاصی ریزماهواره برای این گونه در دنیا مشخص نشده است. در این پژوهش علاوه بر معرفی چند جایگاه ژنی ریزماهواره برای این گونه، ساختار ژنتیکی آن نیز در دو منطقه بابلسر و تنکابن از سواحل استان مازندران بررسی شد.

های مشاهده شده و مورد انتظار و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار استفاده شد (Sokal & Rohlf, 1995). شاخص تثبیت (F_{is}) (Weir and Cockerham, 1984) و انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ، تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی و رسم نمودار فیلوژنتیک بین جمعیت‌ها بر اساس شاخص $UPGMA$ با استفاده از نرم‌افزار $PopGene$ صورت گرفت (Yeh et al., 1999). تست تنگنای ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس مدل دو فازی (TPM) نیز در نرم‌افزار $bottleneck 1.2$ (Cornute and Luikart, 1996) انجام شد.

۳. نتایج

در این بررسی در سطح جایگاه‌ها تعداد آلل‌ها از ۳ تا ۱۱ متغیر بود؛ به طوری که بیشترین تعداد آلل دیده شده مربوط به جایگاه $Mcs16 EM$ و کمترین آن مربوط به جایگاه $Moso19$ بود. اما در سطح جمعیت‌ها کمترین تعداد آلل‌های مشاهده شده ۱ در جایگاه $Muso19$ منطقه تنکابن و بیشترین این مقدار ۱۱ در لوکوس $Mcs16EM$ منطقه تنکابن مشاهده شد. میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر منطقه تنکابن ۶ و ۳/۹ و در منطقه بابلسر ۴ و ۲/۸ به دست آمد. در مجموع میانگین تعداد آلل‌های واقعی ۵ و آلل‌های موثر ۳/۴ به دست آمد. میانگین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در منطقه تنکابن و بابلسر به ترتیب ۰/۸۳۳، ۰/۶۵۳، ۰/۸۰۹ و ۰/۵۵۰ به دست آمد. جدول ۲ تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. جایگاه‌های مورد بررسی بجز جایگاه $Moso 19$ ظرفیت اطلاعات چند شکلی (PIC) بالایی نشان دادند (جدول ۴).

مقدار F_{st} به عنوان معیاری برای جدایی جمعیت‌ها، بر اساس آزمون واریانس مولکولی و احتمال ۹۹ درصد بین جمعیت‌ها محاسبه گردید (جدول ۳). میزان این شاخص بین دو منطقه مورد بررسی ۰/۰۳۲ به دست آمد. همچنین میزان بسیار

جدول ۲. نتایج آنالیز ۶ جایگاه ریزماهواره کفال پوزه باریک

میانگین	Muso27	Muso19	Muso10	Muso09	Mcs15AM	Mcs16EM	آماره	منطقه
۶	۶	۳	۶	۴	۶	۱۱	N	تنکابن
۴	۵/۲	۱	۵/۵	۳/۲	۳/۵	۵/۲	N	
۱/۸۳۳	۱/۰۰	۰/۰۳۳	۱/۰۰	۰/۹۶۷	۱/۰۰	۱/۰۰	H	
۲/۱	-	۲	۲	۲	۳	۴	P.	
۱/۶۵۳	۰/۸۰۸	۰/۰۶۵	۰/۸۲۱	۰/۶۹۳	۰/۷۲۰	۰/۸۱۰	H	
	***	***	***	***	***	***	P	
۴	۶	۱	۴	۲	۴	۷	N	بابلسر
۲/۸	۴/۰	۱	۳/۹	۲/۰	۲/۲	۳/۸	N	
۱/۸۰۹	۰/۸۸۹	۰/۰۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۶۳	H	
۰/۱۶					۱		P.	
۱/۵۵۰	۰/۷۵۲	۰/۰۰۰	۰/۷۵۰	۰/۵۰۰	۰/۵۵۲	۰/۷۴۳	H	
	**	***	***	***	***	***	P	

Na: تعداد الی های واقعی، Ne: تعداد الی های موثر، P. A: تعداد الی اختصاصی، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، P: تعادل هاردی-واینبرگ، ns: عدم معنی داری، * P<0.05، ** P<0.01، *** P<0.001

جدول ۳. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)

Prob	Value	Stat	%	Est.var	MS	SS	df
			۵%	۰/۰۹۶	۷/۲۸	۷/۲۸	۱
۰/۰۱۰	۰/۰۴۹	Fst	۹۵%	۱/۸۴	۱/۸۴	۲۰۶/۵	۱۱۲

df (درجه آزادی)، SS (مجموع مربعات)، Ms (انحرافات میانگین مربع)، Prob (معنی دار بودن انحراف بعد از ۹۹ جایگزینی تصادفی).

جدول ۴. ظرفیت اطلاعات چند شکلی (PIC)، میزان جریان ژنی (Nm) و شاخص تثبیت (Fis) برای هر جایگاه

Muso27	Muso19	Muso10	Muso09	Mc15EM	Mc16AM	
۰/۷۶۱	۰/۰۳۴	۰/۷۸۸	۰/۵۴۹	۰/۶۲۵	۰/۷۷۹	PIC
۱۷/۶	۱۹/۵	۷/۱	۶/۵	۳/۹	۷/۴	Nm
-۰/۲	۰/۴	-۰/۲	-۰/۶	-۰/۵	-۰/۲	Fis

جدول ۵. تست تنگنای ژنتیکی محاسبه شده برای مناطق مورد بررسی

He/Hd	(p) تست Sign	(p) تست ویلکاکسون
۵/۱	۰/۰۵	۰/۰۳
۵/۱	۰/۵۲	۰/۵۶

p: احتمال، He: جایگاه با افزایش هتروزیگوسیتی، Hd: جایگاه با کاهش هتروزیگوسیتی

دهی ایجاد کنند. جایگاه های مورد بررسی بجز جایگاه Muso19، ظرفیت اطلاعات چند شکلی بالای نشان دادند؛ بنابراین در مطالعات آتی ماهی کفال پوزه باریک می توانند به خوبی مورد استفاده قرار بگیرند.

در ابتدا ۱۱ جایگاه ریزماهواره اختصاصی گونه کفال خاکستری و ۱۰ جایگاه ریزماهواره اختصاصی گونه کفال سویی تست شد که تنها ۶ جایگاه چند شکلی نشان دادند و توانستند باندهای قابل امتیاز

لحاظ تعداد آلل و هم میزان هتروزیگوسیتی نسبت به منطقه تنکابن در سطح پایین تری قرار دارد و حتی میانگین تعداد آلل‌های اختصاصی (آلی که در یک جمعیت وجود دارد ولی در سایر جمعیت‌ها فراوانی آن صفر است) این منطقه ($P. A = 0/16$) پایین تر از منطقه تنکابن ($P. A = 2/1$) بود که می‌تواند به علت صید بی رویه و کاهش جمعیت موثر در این منطقه دانست که بر فاکتورهای فوق اثر گذاشته است؛ زیرا در کل سواحل خزر بیشترین صید سالانه متعلق به این منطقه است؛ همچنین در این منطقه تعداد بیشتری شرکت‌های پره نسبت به قسمت‌های دیگر سواحل خزر وجود دارد (پورفرج، ۱۳۸۵). بعلاوه کاهش جمعیت موثر در منطقه بابلسر، جمعیت این گونه را به سمت تنگنای ژنتیکی پیش برده است. تنگنای ژنتیکی هنگامی رخ می‌دهد که تعداد کمی مولد نتاج زیادی تولید کرده و نسل بعد را تشکیل می‌دهند (Allendorf *et al.*, 1987). در نتیجه به نظر می‌رسد صید بی رویه اثر نامطلوب خود را بر جمعیت این گونه در این منطقه گذاشته است. بنابراین در مدیریت صید در این منطقه باید تجدید نظر شود و اصول صحیح بهره برداری مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا وجود جمعیت موثر و تنوع ژنتیکی می‌تواند به بقای صید در سال‌های آتی کمک کند.

در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini *et al.*, 2006). تعادل هاردی-واینبرگ تنها در جوامعی صادق است که شرایطی چون تعداد افراد جمعیت بالا، جمعیت بسته، جفت گیری تصادفی، و احتمال جهش بسیار کم در آن‌ها وجود داشته باشد (Appleyard *et al.*, 2002). در این تحقیق همه لوکوس های مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند که می‌تواند به خاطر افزایش هتروزیگوسیتی و اثر رانش ژنتیکی است که خود ناشی کم بودن جمعیت مؤثر اولیه است، و همچنین صید بی‌رویه و احتمالاً بحران شرایط محیطی باشد (Quan *et al.*, 2006). معمولاً هنگامی که Fis به صفر نزدیک از جمعیت به

از جمله پارامترهای مهم در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها با استفاده نشانگرهای همبازر مانند ریزوماهواره ها، تعداد آلل و میزان هتروزیگوسیتی است (Yamamoto, 2006). هتروزیگوسیتی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیاری دارد زیرا هر هتروزیگوت ناقل آلل‌های متفاوت بوده که نشان دهنده تنوع است (Diz and Presa., 2009). اما با توجه به اینکه معمولاً آلل‌های نادر، فراوانی پایینی دارند و حذف چنین ال‌هایی اثر چندانی بر روی هتروزیگوسیتی نمی‌گذارد (Kitada *et al.*, 2009)، بنابراین برای ارزیابی تنوع جمعیت‌ها غنای آلی نسبت به هتروزیگوسیتی مناسب‌تر است (Petit *et al.*, 1998).

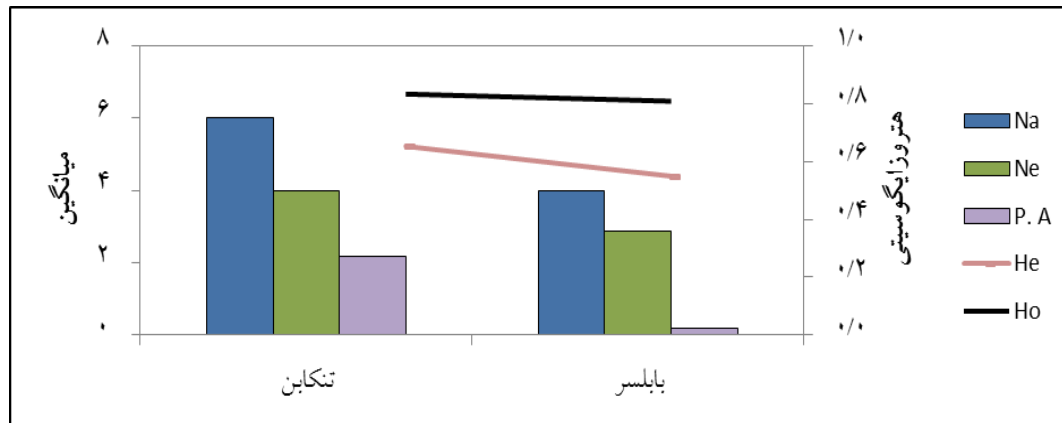
در این بررسی متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده ۶/۶ به دست آمد که بسیار کمتر از مقدار گزارش شده برای ماهیان دریایی (۱۹/۹) است (Dewoddy and Avise, 2000). در واقع، بالا بودن غنای آلی نشان دهنده بالا بودن اندازه موثر جمعیت بوده و استفاده از غنای آلی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های بهگزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند مناسب‌تر است (Diz and Presa, 2009). همچنین میزان بالای مقدار متوسط هتروزیگوسیتی (۰/۸۲۱) به دست آمد که حتی بالاتر از مقدار گزارش شده توسط Dewoddy و Avise (2000) برای ماهیان دریایی (۷/۷) است.

جایگاه Moso19 در منطقه بابلسر منومورف بود. این پدیده در جمعیت‌های که معرفی یا ایزوله می‌شوند، رخ می‌دهد. مشابه این نتایج توسط Triantafyllidis و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه گربه ماهی *Silurus aristotelis* معرفی شده به دریاچه ولوی در یونان و Yamamoto و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ماهی *Salvelinus leucomaenis* ایزوله شده در دریاچه‌های پشت سدهای ایجاد شده بر روی دو رودخانه در ژاپن گزارش شده است.

در بین دو منطقه تنکابن و بابلسر همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، منطقه بابلسر هم از

تعداد نزدیک می‌شود. اگر میزان Fis بزرگتر از صفر باشد جمعیت با کاهش هتروزیگوسیتی مواجه می‌شود؛ بلعکس اگر مقدار Fis کمتر از صفر باشد، جمعیت دارای افزایش هتروزیگوسیتی است (Quan

et al., 2006). میزان شاخص Fis در تمام لکوس‌های مورد بررسی بجز جایگاه Moso19 منفی به دست آمد که نشان دهنده افزایش هتروزیگوسیتی است.



شکل ۴. کاهش ویژگی‌های ژنتیکی در جمعیت بابلسر نسبت به جمعیت تنکابن

مهاجرت‌های تولید مثلی به دریا و تغذیه‌ای در طول ساحل باشد و احتمالاً مناطق تولیدمثلی این گونه در این دو منطقه نزدیک به هم و همپوشانی بالایی دارند. از دلایل دیگر پایین بودن تمایز این دو منطقه می‌تواند به وجود آمدن از جمعیتی اولیه‌ای باشد که از دریای سیاه به دریای خزر پیوند داده شده است و جمعیت این گونه را پس از ۸ دهه در دو منطقه به وجود آورده است. در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز فاصله ژنتیکی نسبتاً پایین بین مناطق مورد بررسی مشاهده شد.

در سال‌های اخیر علاوه بر صید بی‌رویه، به علت تخریب زیستگاه‌های تغذیه‌ای ساحلی، این گونه به شدت دچار عارضه نفخ ناشی از سوء تغذیه شده است؛ لذا می‌توان جهت رونق صید و صیادی ساحل نشینان برنامه‌های مدیریتی در پیشبرد حفظ ذخایر ژنتیکی و جمعیت موثر این گونه و بهبود مناطق تغذیه‌ای ساحلی و مدیریت صحیح در بهره برداری را در نظر گرفت تا در سال‌های آیند صید پایدار این گونه انجام گیرد. در کل نتایج این تحقیق حاکی از فشار صید و برداشت بی‌رویه سالیانه مولدین این گونه به خصوص در منطقه بابلسر است که منجر به کاهش تنوع ژنتیکی این گونه شده است و حتی جمعیت این

آنالیز واریانس مولکولی به عنوان یک آنالیز آماری ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی (Fst) بین جمعیت‌ها است (Grassi et al., 2004). مقدار Fst بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ یعنی تمایز و تفکیک جمعیتی در حد متوسط، مقدار Fst ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ اختلاف ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌ها وجود دارد و مقادیر بالاتر از ۰/۲۵ نشان از جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر است (Wright, 1984). در این مطالعه میزان Fst بر اساس آنالیز واریانس مولکولی به عنوان شاخص تمایز ۰/۰۳ به دست آمد که نشان از وجود تمایز پایین بین مناطق مورد بررسی است.

پایین بودن شاخص‌های تمایز و تنوع بین جمعیت‌ها نشان دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها است (Pinera et al., 2007) نتایج این بررسی نیز حاکی از وجود جریان ژنی بالا (میانگین: ۱۰/۴) بین مناطق مورد بررسی است. به طوری که این جریان ژنی بالا باعث شده که تنها ۵٪ تنوع در بین جمعیت‌ها وجود داشته باشد و قسمت اعظم تنوع (۹۵٪) در درون جمعیت‌ها تجمع یافته باشد. با توجه به اینکه ماهی کفال مهاجر است، لذا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی بین این مناطق هم در زمان

بهره برداری مناسب از ذخایر آبزیان دریای مازندران. بابلسر ۲۶۵-۳۰۰.

سلطانی، م.، و رهاننده، م. ۱۳۸۰. گزارش عارضه نفخ در کفال ماهیان دریای خزر، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱، دوره ۵۶، ص. ۱۰۵-۱۰۶.

عبدلی، ا. ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. انتشارات موزه حیات وحش شهرداری تهران، صفحه: ۱۶۰-۱۶۸.

فضلی، ح. ۱۳۷۸. مطالعه برخی خصوصیات زیستی کفال پوزه باریک در سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، سال نهم، شماره ۴، ص. ۲۹-۴۲.

فضلی، ح. و غنی‌نژاد، د. ۱۳۸۳. بررسی صید و برخی جنبه‌های زیستی کفال ماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، سال سیزدهم، شماره ۱، ص. ۹۷-۱۱۴.

یوسفیان، م.، عریان، ش.، فرخی، ف.، و عصائیان، ح. ۱۳۸۲. مطالعه رشد تخمک در ماهی کفال پوزه باریک. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم شماره ۱، ص. ۱۳۱-۱۵۲.

Allendorf, F., Ryman, N. and Utter, F. 1987. Genetics and fishery management: past, present and future. In: Population genetics and fishery management. University of Washington press, Seattle, p: 235

Amos, W., and Harwood, J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. Phil. trans. R. Soc. Lond. B. 353:177.

Appleyard, S., Ward, R., and Grewe, P. 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. J. Fish Biol. 60(3): 767-770.

منطقه را در معرض تنگنای ژنتیکی قرار داده است. از آنجا که ماهی کفال پوزه باریک یک گونه پیوندی به دریای خزر است، متأسفانه هیچ اطلاعی از تنوع این گونه در منطقه اصلی آن یعنی دریای سیاه وجود ندارد. اما احتمالاً جمعیت اولیه‌ای که به دریای خزر معرفی شده، تنوع ژنتیکی پایینی داشته است به علاوه حضور در محیط بسته دریای خزر باعث افزایش انحراف ژنتیکی (genetic drift) تصادفی شده است که می‌تواند از دلایل تنوع ژنتیکی پایین این گونه باشد.

منابع

ایرانی، ع. ۱۳۸۰. بررسی سن، رشد و رسیدگی جنسی کفال‌های تالاب گمیشان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۶۱ صفحه.

پورفرج، و. ۱۳۸۵. بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و برخی از ویژگی‌های زیست‌شناختی کفال ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران. ۱۲۱ صفحه.

رضوی صیاد، ب. ۱۳۶۹. مدیریت ذخایر ماهیان استخوانی اقتصادی دریای مازندران. کنفرانس ملی Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, G. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 84: 680-683

Bataillon, T. M., David, J. L. and Schoen, D. J. 1996. Neutral genetic markers and conservation: simulated Germplasm collections. Genetics 144:409-417.

Beliaeva, V.N., Vlasenko, A.D. and Ivanov, V.P. 1989. Caspian Sea: Ichthyofauna and fisheries resources. Nauk Press, Russian Academy of Science, Moscow, p: 235.

Berg, L.S. 1965. Freshwater fishes of the U.S.S.R. and adjacent countries, Israel

Program for Scientific Translations Ltd., Jerusalem, p: 510.

Brummer, E.C., Kochert, G. and Bouton, J. H., 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 83(1): 89-86.

Carvalho, G. R. 1998. Advances in molecular ecology, Ios Pr Inc. p: 420

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. *Aquac. Res.* 39:1541-1549.

Cornuet, J. M. and Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

Dewoody, J., and Avise, J. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56:461-473.

Diz, A. P., and Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* 287(3-4): 278-285.

Dmitriev, A.N. 1964. Mullet in the Iranian waters of Caspian. *Priroda*, 12:74-75.

Echt, C.S., Kidwell, K.K., Knapp, S.J., Osborn, T.C. and McCoy, M.J., 1994. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37(1): 61-71.

Grassi, F., Imazio, S., Gomasasca, S., Citterio, S., Aina, R., Sgorbati, S., 2004. Population structure and genetic variation within *Valeria nawallrothii* Kreyer in relation

to different ecological locations. *Plant sci.* 166(6): 1437-1441.

Hillis, D. M. & Moritz, C. 1996. Molecular systematics, 2nd edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, p: 254

Kalo, P., Endre, G., Zimanyi, L., Sandi, G.C. and Kiss, G.B., 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100(5): 641-657.

Kashi, Y., King, D. and Soller, M., 1997. Simple sequence repeats as a source of a quantitative genetic variation. *Trends Genet.* 13(1): 74-78

Katselis, G., Koutsikopoulos, C. and Kaspiris, P. 2002. Age determination and growth of leaping mullet, (*Liza saliens* R.1810) from the Messolonghi Etoliko lagoon (western Greece). *Medit. Mar. Sci.* 3(2): 147-158

Khoroshko, A.I. 1989. Mullet in: the Caspian Sea Ichthyofona and commercial stocks. Nauka press, muscow, Russia p: 340.

Kitada, S., Shishidou, H., Sugaya, T., Kitakado, T., Hamasaki, K. and Kishino, H. 2009. Genetic effects of long-term stock enhancement program. *Aquaculture* 290: 69-79.

Lit, M. and Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actine gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44(3): 397-401.

Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, A., Gigliarelli, L., Natali, M., Panara, F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius*). *Fish. Res.* 80: 251-262.

- 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*. Mol. Ecol. Notes, 5(2): 323-326.
- Patimar, R. 2008. Some Biological Aspects of the Sharpnose Mullet *Liza saliens*(Risso, 1810) in Gorgan Bay-Miankaleh Wildlife Refuge(the Southeast Caspian Sea). Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 8:225-232.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 6: 288-295.
- Petit, R. J., Mousadik, A. E. and Pons, A. O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv. Bio. 12: 844-855.
- Pinera, J.A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sánchez, J.A. 2007. Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations of Spanish Coasts: a preliminary study. Mar. Biol. 151:2153–2158.
- Quan, Y. C., Sun, X. W., and Liang, L. Q. 2006. Genetic polymorphism of Microsatellite DNA in Two Populations of Northern Sheatfish (*Silurus soldatovi*). Acta Genetica Sinica, 33(10), 908-916.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, p: 750
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd Ed. W. H. Freeman, New York, USA, p: 436
- Triantafyllidis, A., Abatzopoulos, T. J., Leonardos, J., and Guyomard, R. 2002. Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*). Aquat. Living Resour. 15: 351-359.
- Wang, C., Yu, X. and Tong, J. 2007. Microsatellite diversity and population genetic structure of redbfin culture (*Culterery thropterus*) in fragmented lakes of the Yangtze River. Hydrobiologia 586:321-329.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370
- Wright, S. 1984. Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, USA, p: 360
- Xu, G., Shao, C., Liao, X., Tian, Y., and Chen, S. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from so-iuy mullet (*Mugil soiuy*, Basilewsky 1855). Conserv. Genet. 10: 653-655.
- Yamamoto, S., Maekawa, K., Tamate, T., Koizumi, I., Hasegawa, K., and Kubota, H. 2006. Genetic evaluation of translocation in artificially isolated populations of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). Fish. Res. 78: 352-358.
- Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-bases Freeware for population Genetic Analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research

Study of genetic diversity of Sharpnose mullet *Liza saliens* (Risso, 1810) in the coastal regions of Mazandaran Province by microsatellite marker

Loqman Naderi^{*1}, Ali Shabani¹, Bahareh Shabanpour¹, Hamid Reza Rezaei²

1. Department of fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2. Department of Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Abstract

Sharpnose mullet is an exotic species of Caspian Sea which was translocated from Black sea to Caspian Sea during 1930 to 1934. This species colonized successfully and now it is commercial species of Caspian Sea. There is no information at molecular level about this species after 8 decades of presence in Caspian Sea, therefore genetic structure of Sharpnose mullet (*L. saliens*) in two regions, Babolsar and Tonekabonof Mazandaran Province was investigated using 6 microsatellite loci. Results showed low allelic richness ($N_a=5$) and high level of Heterozygosity ($H_o=0.821$). So genetic diversity of species this was very low relative to marine species. Also, genetic differentiation index between population was very low (0.032) due to natural migration and high gene flow (10.4) between these regions.

Keywords: Genetic diversity, Caspian Sea, microsatellite, Sharpnose mullet, *Liza saliens*

*Corresponding author, E-mail: Naderi.loqman@gmail.com