

بررسی ساختار ژنتیک ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) در تالاب گمیشان و تالاب انزلی با روش مولکولی میکروستلایت

محمد بهروز، مهرنوش نوروزی*، آمنه امیر جنتی، محمد هادی سمیعی

گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷

چکیده

ساختار ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) در تالاب‌های گمیشان و انزلی با استفاده از ۶ جایگاه میکروستلایت (Muso22، Muso19، Muco16، Muso10، Muce37، Muce55) بررسی شد؛ در مجموع ۶۰ نمونه بالغ ماهی کفال از دو منطقه تالاب‌های گمیشان و انزلی جمع آوری شد. تمامی پرایمرهای مورد استفاده در طی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز با موفقیت تکثیر شدند و چند شکل (پلی مورف) نشان دادند که از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی ماهی کفال طلایی استفاده شد. میانگین آللی (Na) در جایگاه‌ها ۵/۳ (با دامنه ۳ تا ۹ آلل) و در مناطق نمونه برداری در نمونه‌های تالاب گمیشان و انزلی به ترتیب ۵/۱ و ۵/۵ بود. در نمونه‌های هر دو منطقه آلل‌های اختصاصی دیده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب در نمونه‌های تالاب گمیشان ۰/۷۲۱ و ۰/۱۵۳ و انزلی ۰/۷۴۷ و ۰/۳۲۸ محاسبه شد. تمامی جایگاه‌ها در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) خارج از تعادل بودند ($P < 0/001$). میانگین ضریب خویشاوندی (Fit و Fis) در ۶ جایگاه میکروستلایت در هر دو جمعیت مثبت بود. میزان شاخص تمایز (Fst) و جریان ژنی (Nm) بر اساس فراوانی آللی به ترتیب ۰/۱۱۳ و ۱/۹۷ محاسبه شد. بر اساس تست AMOVA، شاخص‌های تمایز Fst و Rst تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌ها نشان دادند ($P \leq 0/01$). میزان فاصله ژنتیکی نیز نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه بود. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که جمعیت‌های متمایز ژنتیکی از ماهی کفال طلایی در جنوب دریای خزر، در مناطق مورد بررسی (تالاب‌های گمیشان و انزلی) موجود است.

واژگان کلیدی: کفال طلایی (*Liza aurata*)، ژنتیک جمعیت، میکروستلایت، دریای خزر.

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: mnoroozi@toniau.ac.ir

۱. مقدمه

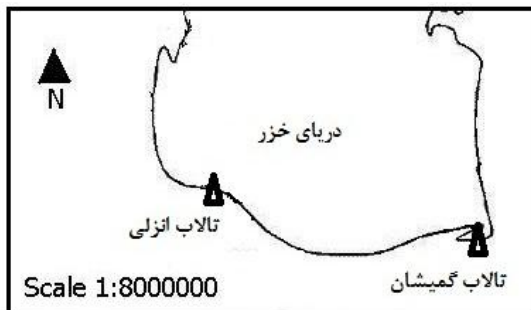
تالاب‌ها از جمله مهمترین سیستم‌های حیات وحش بر روی کره زمین هستند که به عنوان جایگاه ژنی جانوران و گیاهان و محل تولید مثل انواع ماهیان و بسیاری از پرندگان محسوب می‌شوند. تالاب‌های انزلی و تالاب گمیشان از جمله تالاب‌های مهم ایران هستند. تالاب انزلی یکی از ۱۰ تالاب ارزشمند جهان است که در شمال استان گیلان و سواحل جنوبی دریای خزر قرار دارد. تالاب گمیشان، در شمال استان گلستان، از جمله محیط‌های آبی است که تا قبل از سال ۱۳۵۶ در حال خشک شدن بود و حتی نامی از این تالاب وسیع و با اهمیت در لیست تالاب‌های کشور وجود نداشت؛ ولی بعد از سال ۱۳۵۶ و تحت تأثیر فعالیت‌هایی که در دریای خزر صورت گرفت، به تدریج حیات خود را بازیافت و امروزه از آن به عنوان یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین تالاب‌های کشور یاد می‌شود (Majnouniyan, 1998).

در این تالاب‌ها گونه‌های زیادی از ماهی‌هایی که دارای ارزش اقتصادی هستند، شناسایی شده‌است. بسیاری از گونه‌های ماهیان برای تولید مثل به این مناطق مهاجرت می‌کنند. از جمله این ماهیان می‌توان به ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) اشاره کرد. این ماهی در تمام فصول سال از غذاهای مختلف تغذیه می‌کند و وابستگی خاصی به نوع غذا نداشته، از مواد غذایی بستر و همچنین مواد معلق در آب استفاده می‌کند. ماهی کفال طلایی یوری‌ترم (۳ تا ۳۵ درجه سانتیگراد) و یوری‌هالین (صفر تا ۳۵ در هزار) است. خانواده کفال ماهیان مشتمل بر ۱۵ جنس و حدود به ۱۰۰ گونه هستند. در سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ بعضی از انواع کفال ماهیان شامل کفال طلایی و کفال خاکستری، توسط روس‌ها از دریای سیاه به دریای خزر آورده شد و با شرایط غذایی و فیزیوشیمیایی دریای خزر سازش یافت و تکثیر و در تمامی دریای خزر

پراکنده شده‌اند (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). این ماهی در فصول سرد زمستان درحوزه جنوبی دریای خزر، در نواحی ساحلی ایران به‌ویژه در سواحل مازندران تجمع می‌نماید. طی سال‌های پس از انقلاب، به علت صید بی‌رویه و انبوه کفال ماهیان لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد شد (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). بررسی ژنتیک جمعیت ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است. تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند؛ بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al., 1996). یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده از نشانگرهای میکروستلایت است که به خاطر مزایای زیاد از جمله فراوانی و گستردگی بالا در ژنوم، همباز بودن، پلی مورفیسم بالا و رتبه دهی آسان و دقیق کاربرد گسترده‌ای دارند (Chen et al., 2008).

تاکنون مطالعات زیادی در دنیا با استفاده از روش‌های مولکولی و نشانگرهای میکروستلایت بر روی کفال ماهیان انجام شده‌است. از جمله Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای کفال سویی (*Mugil soiuu*) تعداد ۱۰ جایگاه میکروستلایت طراحی کردند. Miggiano و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای کفال مخطط (*M. cephalus*) تعداد ۴۳ جایگاه میکروستلایت طراحی کردند. Xu و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای روی کفال خاکستری (*M. cephalus*) تعداد ۱۲ جایگاه میکروستلایت طراحی کردند. قدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت بررسی کردند.

تالاب‌های انزلی و گمیشان از زیستگاه‌های ماهی کفال طلایی محسوب می‌شوند. با توجه به آلودگی زیست محیطی این دو تالاب، طی چند دهه گذشته و



شکل ۱. نمایی از مناطق نمونه برداری از ماهی کفال طلایی شامل تالاب‌های گمیشان و انزلی.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل؛ dNTPs، ۰/۲ میلی مولار؛ پرایمر یک میکرولیتر ۰/۵ میلی مولار، DNA، ۱۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی مرز هات استارت ۰/۳ واحد، PCR بافر ۱ x؛ کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به ترتیب مرحله جداسازی ۹۵ – ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۴۷ تا ۵۶ درجه سانتیگراد (Muso10، ۵۴ °C، Muco16، ۵۶ °C، Muso19، ۵۶ °C، Muso22، ۵۱ °C، Muce37، ۵۱ °C، Muce55، ۵۶ °C) به مدت ۲۵ تا ۴۰ ثانیه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه و ۳۵ چرخه بهینه سازی گردید (جدول ۱). محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل 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 (http://www.labtech-) شد (equipment.com/UV/UV.html).

پس از رتبه‌دهی به آل‌ها محاسبات آماری شامل فراوانی آلی، تعداد آلی (Na) و تعداد آل‌های موثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، ضریب خویشاوندی درون جمعیت (Fis) و

کاهش ذخایر این ماهیان، بررسی تنوع و تمایز ژنتیکی این ماهی در این دو تالاب ضروری به نظر می‌رسد. بررسی حاضر در ماهی کفال طلایی با استفاده از جایگاه‌های میکروستلایت برای مطالعه ساختار جمعیت‌های این ماهی در حوضه جنوبی دریای خزر در تالاب‌های انزلی و گمیشان انجام شد تا وضعیت تنوع ژنتیکی و همچنین وجود جمعیت احتمالی و تمایز ژنتیکی بین آنها در این مناطق مشخص شود.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه گیری از ۶۰ نمونه ماهی بالغ کفال طلایی از دو منطقه تالاب انزلی (37°28'16"N, 49°27'44"E) و تالاب گمیشان (37°20'2"N, 54°58'53"E) از قسمت باله‌ی سینه‌ای صورت گرفت (شکل ۱). قسمت‌های جدا شده هر یک از نمونه‌ها جداگانه درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و در الکل ۹۶ درصد نگهداری شد؛ سپس برای انجام آزمایشات ملکولی به آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انتقال یافت. برای نگهداری بهتر، نمونه‌ها تا شروع مرحله‌ی استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج High pure PCR template preparation kit (شرکت روچ آلمان، کد ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱) انجام شد. به منظور بررسی کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی از ۶ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای کفال خاکستری شامل پرایمرهای (Muce37 و Muce55)؛ (Xu et al., 2010) و کفال سویی (Muso10، Muco16، Muso19، Muso22؛ Xu et al., 2009) استفاده شد (جدول ۱).

۹۹ درصد و نمودار سنجش ژنتیکی جمعیت‌ها با نرم افزار GeneAlex محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2009).

ضریب خویشاوندی کل (Fit)، تعادل هاردی وینبرگ براساس χ^2 ، تست تمایز بر اساس فراوانی آللی، فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، مقادیر شاخص تمایز Rst و Fst بر اساس تست AMOVA در سطح اطمینان

جدول ۱. نام جایگاه، دمای الصاق (درجه سانتیگراد)، تعداد چرخه (ثانیه)، تکرار توالی، شماره بانک ژن هر یک از پرایمرها

جایگاه	توالی	چرخه/دما	تکرار توالی	شماره بانک ژن	منبع
Muso10	F:TTGCTCAGGGAACACATTGA R:CAAACAGAGACGTGATGCAAA	۵۴/۳۰	(GT) ₂₃	EU570285	Xu et al. 2009
Muso16	F:TGAAC TGTGACCCTCGTTGA R:GGAGAGGTTGGCTCGTCATA	۵۶/۳۰	(AC) ₁₈	EU570291	
Muso19	F:CACCACTATGGCATCCTTCA R:AACCCCTTTTCTTGCTCAAA	۵۶/۳۰	(AC) ₉	EU570294	
Muso22	F:TGATGAGAATGGTGGTGACG R:TTTTGGGCTGCTTGCTCTC	۵۱/۴۰	(GT) ₁₇	EU570297	
Muce-37	F:TACTCAGCCAGCAGGTGT R:AAATACAGGTTGTTGTGCG	۵۱/۲۵	(AC) ₇	HM060973	Xu et al. 2010
Muce-55	F:AGAAGAAGACAGGGACTC R:AGAAATACTCTGCTAACCT	۴۷/۴۰	(TC) ₈ (GCTC) ₅	HM060977	

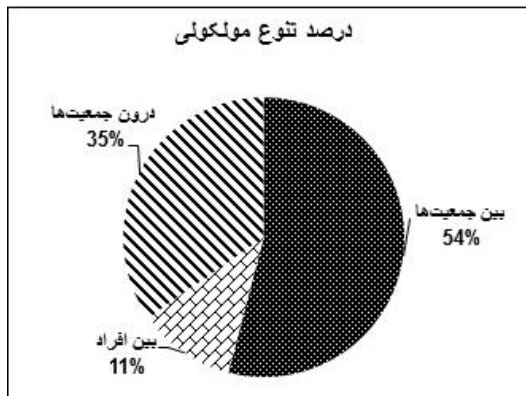
گمیشان در جایگاه Muso-19 در آلل شماره ۴ و در اندازه آللی ۲۰۴ جفت باز به دست آمد. مجموعاً ۹ آلل اختصاصی در دو منطقه یافت شد که ۴ آلل در نمونه‌های تالاب انزلی در جایگاه‌های Muso-10 (یک آلل) و Muso-19 (۲ آلل) و Muso-22 (یک آلل) و ۵ آلل در نمونه‌های تالاب گمیشان در جایگاه Muso-10 (دو آلل)، Muso-55 (یک آلل)، Muso-19 (یک آلل) و Muso-22 (۲ آلل) دیده شد.

میانگین تعداد کل آلل واقعی و مؤثر ۵/۳۳ و ۴/۱۴ بود. میانگین آلل واقعی و مؤثر در منطقه تالاب انزلی به ترتیب ۵/۵ و ۴/۲ و در منطقه تالاب گمیشان به ترتیب ۵/۱۶ و ۳/۹ به دست آمد (جدول ۲). میانگین کل هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار، به ترتیب ۰/۳۳۶ و ۰/۷۳۴ بود. در مقایسه مناطق مورد مطالعه، میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار در منطقه تالاب انزلی به ترتیب ۰/۳۲۸ و ۰/۷۴۷ و در منطقه تالاب گمیشان به ترتیب ۰/۳۴۴ و ۰/۷۲۱ بود (جدول ۲). اختلاف چندانی در وضعیت آللی و هتروزیگوستی

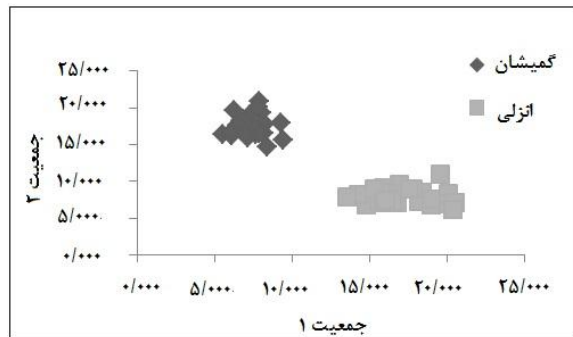
تمایز ژنتیکی بر اساس تست AMOVA و غنی سازی آللی (A_R) با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2005) با استفاده از ۱۰۰۰۰ بار شبیه سازی در هر مورد محاسبه شد.

۳. نتایج

در این مطالعه، تمام ۶ جایگاه مورد بررسی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شدند و چند شکلی نشان دادند. در هنگام شمارش الگوی بانندی در تمامی جایگاه‌ها یکی و در برخی موارد دو باند دیده شد. اندازه آللی به دست آمده از ۱۲۶ تا ۴۰۰ جفت باز بود (جدول ۱). در این بررسی دامنه آللی بین لوکوس‌ها از ۳ تا ۹ آلل به دست آمد. تعداد کل آلل‌های شناسایی شده ۴۷ آلل بود؛ که از میان آن ۲۱ آلل در هر دو منطقه با فراوانی بیش از ۰/۰۵ دیده شد. حداکثر فراوانی آللی (۰/۴۰۰) در نمونه‌های تالاب انزلی در جایگاه Muso-16 در آلل شماره ۲ و در اندازه آللی ۲۷۴ جفت باز و حداکثر فراوانی آللی (۰/۵۰۰) در نمونه‌های تالاب



شکل ۲. چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای شاخص Rst



شکل ۳. نمودار تعیین سنجش دو جمعیت تالابهای گمیشان و انزلی در شش جایگاه میکروستلایت در ماهی کفال طلایی (بر حسب درجه تمایز)

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نشانه‌های ژنتیکی مختلفی برای بررسی ساختار جمعیت وجود دارد؛ اما در بین تمامی آنها، میکروستلایت‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند، در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد (Cui et al., 2005). از آنجایی که ماهی کفال طلایی فاقد پرایمر اختصاصی است، از ۶ جفت پرایمر ریزماهواره طراحی شده برای کفال خاکستری و کفال سویی استفاده شد، که همگی آنها با موفقیت تکثیر شدند و الگوی بانندی چند شکلی پس از PCR را بر روی ژل نشان دادند.

بین دو منطقه مشاهده نشد. در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاه‌ها خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). میانگین ضریب خویشاوندی درون جمعیت (Fis)، 0.17 ± 0.576 و ضریب خویشاوندی کل (Fit)، 0.167 ± 0.601 به دست آمد. در تمامی جایگاه‌های میکروستلایتی مثبت بود و دامنه آن از 0.052 در جایگاه Muso-37 تا یک در جایگاه Muso-10 محاسبه شد (جدول ۳). مقادیر مثبت Fis نشان دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Muso-37 با کمترین میزان Fis بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاه‌ها نشان داد. میزان Fst بر اساس فراوانی آللی، $0.113 (\pm 0.03)$ به دست آمد (جدول ۳) که نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط است (Balloux and Lugan, 2002). جریان ژنی $1/97$ محاسبه شد؛ اما میزان Rst و Fst بر اساس تست AMOVA؛ معنی‌دار بود ($P < 0.01$) و نشان دهنده جدا شدن جمعیت‌ها است. فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بر اساس Nei (1972) به ترتیب، $1/2$ و 0.29 به دست آمد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس Rst نیز نشان داد که ۵۴ درصد تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها، ۱۱ درصد به بین جمعیت‌ها، ۳۵ درصد بین افراد مربوط می‌شود (شکل ۲). در جدول ۴ مقادیر تست AMOVA برای شاخص Rst نشان داده شده است. نمودار سنجش ژنتیکی جمعیت‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است و نمایشی از درجه تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها را میسر می‌سازد و روش مناسبی برای سنجش اختلاف جمعیت‌ها به کمک نمودار و بر اساس تستهای سنجش است و اعداد نمایش داده شده روی محور، بر اساس درجه تمایز است (Paetkau et al. 2004). بر اساس این نمودار، جمعیت‌ها هیچ هم‌پوشانی ندارند و از هم جدا هستند.

جدول ۲. تعداد آللی (Na)، آلل‌های مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، غنای آللی (AR) و اندازه باند (جفت باز) برای مناطق نمونه برداری شده در ۶ جایگاه میکروستلایت در ماهی کفال طلایی

نام جایگاه	شاخص	محل نمونه برداری	
		تالاب گمیشان	تالاب انزلی
Muso-10	اندازه باند (جفت باز)	۳۴۰-۴۰۰	۳۴۰-۴۰۰
	Na(Ne)	۳(۲/۳)	۴(۳/۹)
	Ho(He)	(۰/۸۲۸)	(۰/۸۶۰)
Muso-16	AR	۳	۴
	اندازه باند (جفت باز)	۲۷۲-۳۰۰	۲۷۲-۳۰۰
	Na(Ne)	۴(۳/۶)	۳(۲/۹)
Muso-19	Ho(He)	(۰/۷۲۹)	(۰/۶۵۸)
	AR	۴	۳
	اندازه باند (جفت باز)	۱۸۸-۲۸۰	۱۸۸-۲۸۰
Muso-22	Na(Ne)	۴(۲/۷)	۴(۳/۲)
	Ho(He)	(۰/۷۸۶)	(۰/۷۸۶)
	AR	۸	۸
Muce-37	اندازه باند (جفت باز)	۱۸۸-۲۱۰	۱۸۸-۲۱۰
	Na(Ne)	۴(۳/۷)	۵(۵/۸)
	Ho(He)	(۰/۶۳۸)	(۰/۶۹۴)
Muce-55	AR	۴	۴
	اندازه باند (جفت باز)	۱۹۸-۲۴۸	۱۹۸-۲۴۸
	Na(Ne)	۸(۵/۸)	۹(۷/۱)
میانگین	Ho(He)	(۰/۷۳۱)	(۰/۷۳۱)
	AR	۹	۸
	اندازه باند (جفت باز)	۱۲۶-۱۵۰	۱۲۶-۱۵۰
کل	Na(Ne)	۸(۵/۶)	۸(۴/۶)
	Ho(He)	(۰/۵۸۰)	(۰/۷۴۷)
	AR	۸	۸
	Na(Ne)	۵/۱ (۳/۹)	۵/۵ (۴/۲)
	Ho(He)	(۰/۷۲۱)	(۰/۷۴۷)
	AR	۰/۳۴۴	۰/۳۲۸
	Na(Ne)	۵/۳ (۴/۱)	۵/۳ (۴/۱)
	Ho(He)	(۰/۷۳۴)	(۰/۷۳۴)
	AR	۰/۳۳۶	۰/۳۳۶

در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاه‌ها دو و در برخی موارد یک باند ضخیم دیده می‌شد که از دو باند دیگر تیره‌تر بود. این باندها، شاید در نتیجه وجود جایگاه‌های همولوگ در شرایط PCR باشد. تمامی جایگاه‌ها یک یا دو باند را نشان دادند که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است.

تعداد آللی و هتروزیگوسیتی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از لحاظ مواجه شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankham, 2008) و ویژگی‌هایی همچون رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌کند (Hakansson and Jensen, 2005). نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین تعداد آللی به دست آمده در این بررسی (۵/۳±۰/۶) کمتر از دامنه اعلام شده (۱۹/۹±۶/۶) برای ماهیان آب شور است (Dewoody and Avis, 2000). در بررسی حاضر دامنه آللی ماهی کفال طلایی ۳ تا ۹ آلل در هر جایگاه بدست آمد. این در حالی است که قدسی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۶ عدد کفال طلایی در سواحل استان گلستان با استفاده از پنج لوکوس میکروستلایت میانگین دامنه آللی را بین ۸ تا ۲۰ آلل به دست آوردند. در مقایسه دامنه آللی با همین پرایمرها با سایر کفال ماهیان، Xu و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کفال خاکستری، میانگین دامنه آللی ۲ تا ۱۱ به دست آوردند. Xu و همکاران (۲۰۰۹) در کفال سویی میانگین دامنه آللی ۳ تا ۹ به دست آوردند. Miggiano و همکاران (۲۰۰۵) در کفال مخطط میانگین دامنه آللی را برای نمونه‌های جزیره ساردینیا ۱۴ تا ۲۸ آلل و برای نمونه‌های استرالیا ۱۱ تا ۲۵ آلل به دست آوردند. همانطور که مشاهده می‌شود، تعداد آللی به دست آمده در این بررسی کمتر از میزان اعلام شده بر روی ماهیان آب شور و خانواده کفال ماهیان است.

جدول ۳. میزان شاخص تمایز (Fst)، ضریب خویشاوندی (Fis و Fit) بر اساس فراوانی آلی در هر جایگاه

نام جایگاه							شاخص
Muso-16	Muso-10	Muso-55	Muso-19	Muso-22	Muso-37	(SE) میانگین	
۰/۰۶۳	۰/۲۰۲	۰/۰۴۹	۰/۲۰۰	۰/۱۴۲	۰/۰۱۹	۰/۱۱۳ (۰/۰۳)	Fst
۰/۸۰۸	۱	۰/۰۴۶	۰/۸۰۰	۰/۷۵۰	۰/۰۵۲	۰/۵۷۶ (۰/۱۷)	Fis
۰/۸۲۰	۱	۰/۰۹۳	۰/۸۴۰	۰/۷۸۶	۰/۰۷۰	۰/۶۰۱ (۰/۱۶)	Fit

جدول ۴. توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای شاخص Rst بر اساس تست AMOVA در ۶ جایگاه میکروستلایت در کفال طلایی، درجه آزادی (df)، مجموع مربعات (SS)، انحراف میانگین مربع (MS)، مقدار (Valu) و احتمال (Prob)

فاکتور	df	SS	%	Est.var.	MS	Stat	Valu	Prob
بین جمعیت‌ها	۱	۱۰۹۴/۵۹	٪۵۴	۱۷/۹۲۷	۱۰۹۴/۵۹۲			
بین افراد	۵۸	۱۱۰۰/۰۵	٪۱۱	۳/۷۳۷	۱۸/۹۶۶	Rst	۰/۵۴۱	۰/۰۱
درون جمعیت‌ها	۶۰	۶۸۹/۵۰۰	٪۳۵	۱۱/۴۹۲	۱۱/۴۹۲			

مناطق نمونه برداری اختلاف معنی‌داری بین دو منطقه دیده نشد. قدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی دامنه هتروزیگوسیتی را بین ۰/۹۰ تا ۰/۸۶ اعلام کردند. در مقایسه با مطالعات مشابه بر روی سایر کفال ماهیان، Xu و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی کفال خاکستری، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۲۵۹ تا ۰/۸۹۶ و دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار را بین ۰/۳۰۴ تا ۰/۸۴۵ بدست‌آوردند. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ماهی کفال سویی، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۲۰۸ تا ۰/۹۱۶ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۸۱۲ تا ۰/۲۶۵۱ بدست‌آوردند. Miggiano و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ماهی کفال مخطط، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین یک تا ۰/۳۸۹ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۲۶ تا ۰/۹۵۲ به-دست‌آوردند. نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (0.336 ± 0.1) کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان آب شور (0.77 ± 0.22) است (Dewoody and Avis, 2000). از آنجایی که در این بررسی میانگین ضریب خویشاوندی مثبت بود، این احتمال وجود دارد

به‌طور کلی، تعداد کم آلل نشانه‌ای از تنگنای ژنتیکی است که در شرایط جمعیت وحشی، ممکن است به علت جدا شدن جمعیت و یا کاهش شدید اندازه مؤثر باشد (Ha et al., 2006). با توجه به اینکه ماهی کفال طلایی بومی دریای خزر نیست، این احتمال وجود دارد که جمعیت موسس کوچک در ابتدای ورود از دریای سیاه به دریای خزر عامل کاهش تنوع آلی باشد. نتایج این بررسی، تایید کننده این نکته است؛ زیرا وجود آلل‌های زیاد با فراوانی پایین، نشان دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon et al., 2004). میانگین ضریب خویشاوندی Fis و Fit مثبت نیز در دو منطقه تایید کننده آن است.

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد؛ زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است (Beardmore et al., 1997). در این بررسی دامنه کل هتروزیگوسیتی مشاهده شده صفر تا ۰/۹ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۵۸۰ تا ۰/۸۶۰ بود و در

این آلودگی‌ها به تالاب که مأمن این گونه است، می‌تواند بیماری‌های مختلف و نو ظهوری را در ابعاد بسیار وسیع منتشر کند. ادامه چنین روندی در این دو تالاب موجب مرگ و میر ماهیان، کم‌شدن جمعیت و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود و در صورت تداوم وضع موجود، در آینده نزدیک شاهد کاهش شدید ذخایر این گونه، در این تالاب‌ها خواهیم بود.

در بررسی تعادل هاردی-وینبرگ، همه مناطق در تمامی جایگاه‌ها خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت ماهیان زیاد است (Lucentini et al., 2006). چنین نتیجه‌ای در مورد کفال ماهیان توسط سایر محققین گزارش شده‌است و علت آن‌را در ماهی کفال طلایی ناشی از وجود آلل‌های نول دانستند (Xu et al., 2010; Xu et al., 2009). قدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ علت آن‌را اشتباه در هنگام خواندن آلل و انحراف تصادفی بیان نمودند. در بررسی حاضر به نظر می‌رسد علت انحراف از تعادل، مخلوط شدن نمونه‌ها و ترکیب جمعیت‌ها، خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها باشد.

میزان F_{st} بر اساس فراوانی آللی ۰/۱۱۳ بدست‌آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط است و میزان جریان ژنی ۱/۹ محاسبه شد. در بررسی شاخص تمایز F_{st} پیشنهاد شده‌است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵، تمایز متوسط و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی بالاست (Wright, 1978). تست تمایز F_{st} و R_{st} بر اساس تست AMOVA بین نمونه‌ها محاسبه شد و معنی‌دار بود ($P < 0.001$)؛ بنابراین جمعیت‌ها از یکدیگر جدا هستند. با وجود تمایز ژنتیکی بین دو جمعیت مورد مطالعه، علت تمایز ژنتیکی متوسط وجود جریان ژنی بین دو منطقه است. وجود استعداد پراکنش بالا که

که از افراد خویشاوند در یک محل، نمونه‌برداری شده باشد و یا ناشی از تنوع ژنتیکی پایین در بچه کفال ماهیان اولیه‌ای باشد که از دریای سیاه به دریای خزر وارد شده‌اند. ممکن است مولدین اولیه از یک یا دو منطقه نزدیک به هم در دریای سیاه انتخاب شده‌اند و یا تنوع ژنتیکی این گونه در دریای سیاه پایین باشد، که متأسفانه اطلاع کافی از محل برداشت کفال در دریای سیاه در دست نیست (قدسی، ۱۳۹۰). کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش تنوع آللی و همچنین وجود آلل‌هایی با فراوانی پایین را می‌توان تحت تاثیر عواملی همچون صید بی‌رویه (با متوسط وزن ماهیان صید شده فقط ۲۱۰ گرم)، عوامل زیست محیطی همچون آلاینده‌های زیستی، از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی دانست که منجر به کاهش تکثیر طبیعی این ماهی می‌شود. در تالاب انزلی، رودخانه‌های ورودی به تالاب، پساب‌های صنعتی و بیمارستانی را با خود به تالاب وارد می‌کنند؛ این پساب‌ها شامل همه انواع آلاینده‌ها مانند فلزات سنگین، مواد مغذی و غیره هستند. زه آب‌های ناشی از مزارع برنج نیز حاوی مواد مغذی و سموم کشاورزی اند که باعث افزایش پدیده یوتروفیکاسیون، یا پیر شدن تدریجی تالاب است و ورود رسوبات جامد به تالاب نیز باعث کاهش عمق تالاب و مرگ زودرس آن خواهد شد (جمالزاد، ۱۳۷۷). مطالعات نشان می‌دهد که تالاب انزلی طی دوره دهساله گذشته، دچار کاهش مساحت و افزایش تغذیه گرایبی شده‌است (زبردست و جعفری، ۱۳۹۰). همچنین ورود پساب‌های پالایشگاه و سایر تاسیسات نفتی، تخلیه زباله و فاضلاب شهری، پساب و ضایعات مزارع پرورش میگو، تالاب بین‌المللی گمیشان و سواحل این بخش از خزر را تهدید می‌کند؛ به‌علاوه کلیه رودهای استان گلستان نیز از این سواحل، فاضلاب‌های استان را وارد دریای خزر می‌کنند که شامل انواع فاضلاب‌های آلوده از جمله کودهای شیمیایی اراضی کشاورزی بالادست است. از تبعات ورود

ماهی کفال طلایی در تالاب کاهش می یابد؛ ضروری است برنامه ریزی‌های جامع برای کنترل صید و برنامه ریزی جدی‌تر برای احیاء ذخایر این گونه انجام شود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

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*). *Aquacult.* 230: 65-80.

Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol.* 11: 155-165.

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

Beardmore, J.A., Mair, G.C. and Lewis, R.I. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquacult Res.* 28: 829– 839.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gressoff, G.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annul. Bioche.* 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. *Aquat. Res.* 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. pseudommus*. *Aquacult.* 250: 129– 137.

احتمالا ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر، ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت در زیر جمعیت‌ها ایجاد می‌شود که علت وجود ساختار جمعیتی متوسط این گونه است. میزان فاصله ژنتیکی در این بررسی نیز نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

نتایج این بررسی نشان دهنده وجود جمعیت‌های متمایز ماهی کفال طلایی و تنوع ژنتیکی پایین این گونه است. وجود آلل‌های اختصاصی و تفاوت در فراوانی آلل غالب در هر یک از مناطق نمونه برداری و شاخص تمایز معنی‌دار نشان دهنده وجود جمعیت‌های متفاوت در جنوب دریای خزر و در دو تالاب انزلی و گمیشان است. طبق واقعیت‌های موجود، هر سال میزان صید Dewoody, J. A. and Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Fish Biol.* 56: 461-473.

Excoffier, L., Laval G. and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioin. Online.* 1: 47-50.

Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Mol. Ecol.* 17: 325-333.

Ghodsi., Shabani, A. and Shabanpour, B. 2011. Genetic diversity of *Liza aurata* (Risso, 1810) in the coastal regions of Golstan province, using microsatellite marker. *Taxonomy and Biosystematics.* 6: 35-46.

Hakansson, J. and Jensen, P. 2005. Behavioral and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. *Biol. Cons.* 122: 431–439.

Jamalzad, F. 2000. Determination of the sensitivity of Anzali wetland areas using Geographic Information System (GIS), MSc thesis, Faculty of Environment, Tehran University. 52P.

Khatibi, N. 2005. Gomishan International Wetland threatened oil schemes. Report the Center of the Earth Watchers. <http://www.earthwatchers.org/gomishan.html>.

- 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. Fish. Res. 96:139-147.
- Majnouniyan, H. 1998. Division and Conservation of Wetlands (Function and Value). Environment Organization Press, P: 176.
- 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. 5: 323-326.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Mol. Ecol. 4: 347-354.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2009. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. Available at: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- Razavi Sayad, B. 2000. Management reserves of the Caspian marine economy bony fishes, the first National Conference on proper exploitation of fish stocks, fisheries organization of Mazandaran, Babolsar
- 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). Cons. Genet. 10: 653-655.
- Xu, T. j., Sun, D. Q., Shi, G. and Wang, R.X. 2010. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in the gray mullet (*Mugil cephalus*). GMR. 9: 1791-1795
- Wright, S., 1978. Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Zebardast, L. and Jafari, H. 2011. Use of Remote Sensing in Monitoring the Trend of Changes of Anzali Wetland in Iran and Proposing Environmental Management Solution. Journal of environmental studies. 37(57): 1-8.

Genetic structure of golden mullet (*Liza aurata*) in Gomishan and Anzali wetlands using microsatellite molecular technique

Mohammad Behruz , Mehrnoush Norouzi*, Ameneh AmirJanati, Mohammad Hadi Samie

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

Abstract

Genetic structure of golden mullet, *Liza aurata*, from the Gomishan and Anzali wetlands was investigated using six microsatellite primer sets (Muce55, Muce37, Muso10, Muco16, Muso19, and Muso22). In total 60 samples of adult golden mullet were collected from these regions. All primer sets were used as polymorphic loci to analyze the genetic variation. Analyses revealed that average of alleles (N_a) per locus was 5.3 (range 3 to 9 alleles) samples of Gomishan wetland 5.1 and Anzali wetland 5.5 respectively. All sampled regions contained private alleles. The average estimates of inbreeding coefficients (Fis and Fit) values of 6 microsatellites were positive. The average observed and expected heterozygosity was 0.153 and 0.721 in Gomishan wetland and 0.328 and 0.747 in Anzali wetland respectively. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were in all cases ($P < 0.001$). F-statistics (Fst) and gene flow (Nm) estimates in allele frequencies were 0.113 and 1.97 respectively. Rst and Fst estimates in AMOVA indicated significant genetic differentiation among regions ($P < 0.01$). Genetic distance indicated that the genetic difference among the studied populations is pronounced.

Keywords: golden mullet, *Liza aurata*, population genetics, microsatellite, Caspian Sea.

Table 1. The name of Microsatellite loci, pasting temperature ($^{\circ}$ C), the number of cycles (seconds), repeat motif, Number gene bank of each primer

Table 2. The number of alleles (N_a), effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), allelic richness (AR) and band size (bp) for sample locations in six microsatellite loci in the golden gray mullet.

Table 3. differentiation index (Fst), Relationship coefficient (Fis and Fit) based on allele frequencies at each position.

Table 4. Distribution of genetic diversity observed for Rst index based on AMOVA test in 6 microsatellites Loci in golden mullet, Degrees of freedom (df), the sum of squares (SS), mean square (MS), value (Valu) and probability (Prob)

Figure 1: Map of sampling stations of golden mullet in the Gomishan and Anzali wetlands.

Figure 2. Distribution of genetic diversity for Rst indicator

Figure 3. assessment populations test in golden gray mullet in the Gomishan and Anzali wetlands in six microsatellite loci (according to grade)

*Corresponding author, E-mail: mnoroozi@toniau.ac.ir