

تنوع و تمایز ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) در سواحل استان مازندران با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره

محمد بهروز*^۱ و مهرنوش نوروژی^۱

^۱ گروه شیلات و بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶

چکیده

ساختار ژنتیکی ماهی کفال طلایی *Liza aurata* در سواحل رامسر و فریدونکنار با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره طراحی شده برای کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) و کفال سویی (*M. soiyu*) بررسی گردید. در مجموع ۶۰ نمونه بالغ ماهی کفال جمع‌آوری شد. همگی پرایمرها چند شکل (پلی مورف) نشان دادند و از آنها برای تعیین تمایز ژنتیکی استفاده شد. میانگین الی مشاهده شده (Na) در جایگاه‌ها ۶/۲ (با دامنه ۳ تا ۹ ال) بود. هر دو منطقه نمونه‌برداری دارای ال‌های اختصاصی بودند. میانگین ضریب خویشاوندی (F_{is}) در ۶ جایگاه ریزماهواره مثبت بود. میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار و مشاهده شده به ترتیب، ۰/۳۹۴ و ۰/۷۴۳ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی-وینبرگ (H-W) تمامی جایگاه‌ها خارج از تعادل بودند ($P \leq 0/001$). میزان شاخص تمایز (F_{st}) و جریان ژنی (Nm) بر اساس فراوانی الی به ترتیب، ۰/۰۷۸ و ۲/۹ محاسبه شد. بر اساس تست AMOVA، شاخص‌های تمایز Rst، Fst و جریان ژنی تفاوت معنی‌داری را بین جمعیت‌ها نشان داد ($P \leq 0/001$). میزان فاصله ژنتیکی ۰/۶۷۹ به دست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه است. نتایج مطالعه حاضر، دلایل اولیه بر وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی ماهی کفال طلایی در جنوب دریای خزر (استان مازندران) را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: کفال طلایی، ژنتیک جمعیت، ریزماهواره، دریای خزر

مقدمه

سواحل مازندران تجمع می‌نماید. در تمام فصول سال از غذاهای مختلف تغذیه می‌کند و وابستگی خاصی به نوع غذا نداشته 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 است و دامنه شوری صفر (آب شیرین) تا ۳۵ در هزار زندگی می‌کند. صید کفال ماهیان در ایران از سال ۱۹۴۲ آغاز شد طی سال‌های پس از انقلاب، به علت صید بی‌رویه، به خصوص صید انبوه کفال ماهیان در سال‌های بهره‌برداری ۱۳۶۱-۱۳۶۲ (۶۹۷۵ تن) که متوسط وزن ماهیان صید شده فقط ۲۱۰ گرم بود،

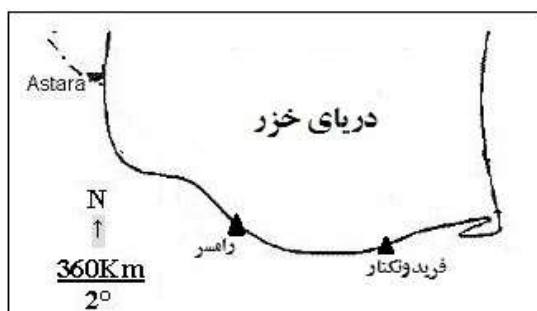
ماهی کفال طلایی، *Liza aurata* متعلق به خانواده کفال ماهیان (Mugilidae) است. کفال طلایی بین سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ در رهاسازی حدود ۲ میلیون بچه ماهی ۱ تا ۲ ساله این خانواده از دریای سیاه به دریای خزر معرفی شد و در کمتر از ۱۰ سال در تمام نواحی دریای خزر گسترش یافت (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). هم‌اکنون این ماهی در تمامی دریای خزر پراکنده است، اما در فصول سرد زمستان درحوزه جنوبی دریای خزر، در نواحی ساحلی ایران بویژه در

*نویسنده مسئول: mohammad_behrooz@ymail.com

کفال مخطط *M.cephalus* Xu و همکاران (۲۰۱۰) بر روی کفال خاکستری *M.cephalus* 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 استان مازندران در سواحل رامسر و فریدونکنار می‌باشد و فراوانی ژنوتیپی و اللی هر یک از جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت است. بنابراین نمونه‌برداری از این دو منطقه انجام شد تا وضعیت تنوع ژنتیکی و همچنین وجود جمعیت‌های احتمالی و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از ۶۰ نمونه ماهی بالغ کفال طلایی از دو منطقه رامسر $36^{\circ}52' 1/08''$ شرقی و $50^{\circ} 40' 57''$ شمالی و فریدونکنار $36^{\circ}41' 20/04''$ شمالی از قسمت باله‌ی سینه‌ای صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- نمایی از مناطق نمونه‌برداری از ماهی کفال طلایی در رامسر و فریدونکنار

استخراج در فریزر -80° درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت روچ آلمان، کد ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱) انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز

لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد نمود (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی 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 و همکاران، ۱۹۹۶).

یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگرهای ریزماهواره است که به علت مزایای زیاد از جمله فراوانی و گستردگی بالا در ژنوم، همباز بودن، پلی‌مورفیسم بالا و رتبه‌دهی آسان و دقیق کاربرد گسترده‌ای دارند (Chen و همکاران، ۲۰۰۸). در سال‌های اخیر محققین مختلفی بر روی ساختار ژنتیکی خانواده کفال ماهیان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مطالعه کرده‌اند که از جمله به Xu و همکاران (۲۰۰۹) بر روی کفال سویی و Miggiano *M. soiu* و همکاران (۲۰۰۵) بر روی

قسمت‌های جدا شده هر یک از نمونه‌ها جداگانه درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و با الکل ۹۶٪ ذخیره گردید. سپس جهت انجام آزمایشات ملکولی به آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک انتقال یافت. برای نگهداری بهتر، نمونه‌ها تا شروع مرحله‌ی

شاخص تمایز R_{st} و F_{st} براساس تست AMOVA^۳ در سطح اطمینان ۱ درصد و با نرم‌افزار GeneAlex محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2006). همچنین نمودار سنجش ژنتیکی^۴ جمعیت‌ها نیز بوسیله نرم‌افزار فوق رسم گردید.

نتایج

در این مطالعه، تمام ۶ جایگاه مورد بررسی در واکنش زنجیره‌های پلیمرز تکثیر شدند و چند شکلی نشان دادند. در هنگام شمارش الگوی بانندی در تمامی جایگاه‌ها یکی و در برخی موارد دوباند دیده شد. اندازه الی بدست آمده از ۱۱۶ تا ۳۵۰ جفت باز بود (جدول ۱). در این بررسی دامنه الی بین جایگاه‌ها از ۵ تا ۱۳ ال به دست آمد. تعداد کل ال‌های شناسایی شده ۵۳ ال بود که از میان آن در منطقه فریدون‌کنار ۳۲ ال و در منطقه رامسر ۲۸ ال با فراوانی بیش از ۰/۰۵ دیده شد. حداکثر فراوانی الی (۰/۵۳۳) در نمونه‌های فریدون‌کنار در جایگاه Muso-10 در ال شماره ۵ و در اندازه الی ۳۴۸ جفت باز و حداکثر فراوانی الی (۰/۵۶۷) در نمونه‌های رامسر در جایگاه Muso-22 در ال شماره ۶ و در اندازه الی ۲۵۶ جفت باز بدست آمد. مجموعاً ۵ ال اختصاصی در دو منطقه یافت شد که ۲ ال در نمونه‌های فریدون‌کنار در جایگاه‌های Muso-16 (در اندازه الی ۳۰۰ جفت باز) و Muso-19 (در اندازه الی ۱۸۰ جفت باز) و ۳ ال در نمونه‌های رامسر در جایگاه Muso-16 (در اندازه‌های الی ۲۶۲، ۲۷۶ و ۲۸۸ جفت باز) دیده شد. میانگین تعداد کل ال واقعی و مؤثر ۶/۲۵۰ و ۴/۳۳۹ بود. میانگین ال واقعی و مؤثر در منطقه فریدون‌کنار به ترتیب، ۶/۳۳۳ و ۴/۵۰۱ و در منطقه رامسر به ترتیب ۶/۱۶۷ و ۴/۱۷۷ بدست آمد (جدول ۲).

۱٪ استفاده شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی از ۶ جفت پرایمر میکرو ستالایت طراحی شده برای کفال خاکستری شامل پرایمرهای Muce55 و Muce37 (Xu و همکاران، ۲۰۱۰) و کفال سویی شامل پرایمرهای Muso10، Muco16، Muso19، Muso22 (Xu و همکاران، ۲۰۰۹) استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs، ۰/۲ میلی‌مولار؛ پرایمر یک میکرولیتر؛ DNA، ۱۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی مرز هات استارت ۰/۳ واحد، PCR بافر ۱ x؛ کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم موردنظر در pH: ۸/۷ انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به ترتیب مرحله جداسازی ۹۴-۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۴۷ تا ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ تا ۴۰ ثانیه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه و ۳۵ چرخه بهینه‌سازی 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 و همکاران، ۱۹۹۱). سپس تصویر ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Uvitec مورد بررسی قرار گرفت. پس از رتبه‌دهی به ال‌ها محاسبات آماری شامل فراوانی الی^۱، تعداد الی (Na) و تعداد ال‌های مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، ضریب خویشاوندی درون جمعیت (F_{is}) و ضریب خویشاوندی کل (F_{it})، تعادل هاردی-وینبرگ براساس χ^2 ، تست تمایز بر اساس فراوانی الی، فاصله ژنتیکی^۲ براساس Nei (۱۹۷۲)، مقادیر

۳- Analysis of MOlecular Variance

۴- Assignment test

۱- Allel frequency

۲- Genetic distance

جدول ۱- نام جایگاه، دمای الصاق (درجه سانتی گراد)، تعداد چرخه (ثانیه)، تکرار توالی، اندازه اللی (جفت باز)، شماره بانک ژن پرایمرها

منبع	شماره بانک ژن	اندازه اللی	تکرار توالی	چرخه/دما	جایگاه
	EU570285	۳۱۲-۳۵۰	(GT) ₂₃	۵۴/۳۰	Muso10
Xu و همکاران،	EU570291	۲۵۸-۳۵۰	(AC) ₁₈	۵۶/۳۰	Muso16
۲۰۰۹	EU570294	۲۰۲-۱۶۶	(AC) ₉	۵۶/۳۰	Muso19
	EU570297	۱۹۲-۱۸۲	(GT) ₁₇	۵۱/۴۰	Muso22
Xu و همکاران،	HM060973	۲۳۲-۱۹۲	(AC) ₇	۵۱/۲۵	Muce-37
۲۰۱۰	HM060977	۱۵۲-۱۱۶	(TC) ₈ (GCTC) ₅	۴۷/۴۰	Muce-55

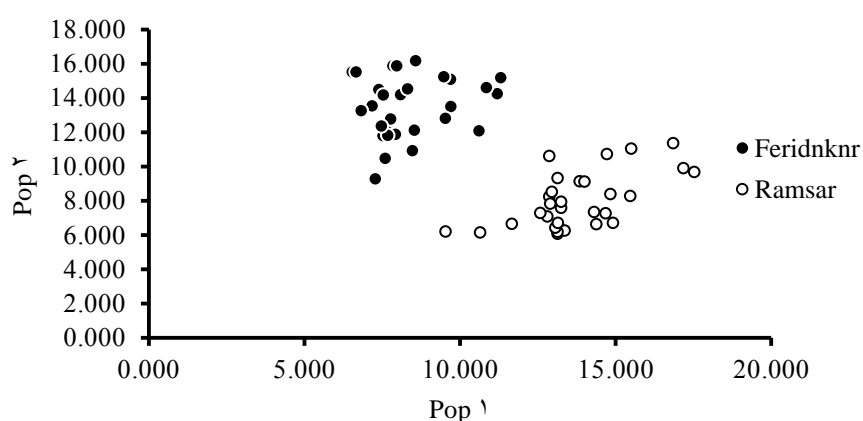
میزان F_{st} بر اساس فراوانی اللی، $0/078$ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط می باشد (Lugan و Balloux، ۲۰۰۲). جریان ژنی $2/9$ محاسبه شد. اما میزان R_{st} و F_{st} بر اساس تست AMOVA؛ معنی دار بود ($P \leq 0/01$) و نشان دهنده جدا شدن جمعیت ها می باشد. فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بر اساس Nei (۱۹۷۲) به ترتیب، $0/679$ و $0/507$ بدست آمد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس R_{st} نیز نشان داد که 50 درصد تنوع مربوط به درون جمعیت ها، 22 درصد به بین جمعیت ها، 28 درصد بین افراد مربوط می شود. نمودار سنجش ژنتیکی جمعیت ها در شکل ۲ نشان داده شده است و نمایشی از درجه تفکیک ژنتیکی بین جمعیت ها را میسازد و روش مناسبی برای سنجش اختلاف جمعیت ها به کمک نمودار و بر اساس تست های سنجش می باشد و اعداد نمایش داده شده روی محور بر اساس درجه تمایز است (Paetkau و همکاران، ۲۰۰۴).

میانگین کل هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب، $0/349$ و $0/743$ بود. در مقایسه مناطق مورد مطالعه، میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار در منطقه فریدونکنار به ترتیب، $0/406$ و $0/754$ و در منطقه رامسر به ترتیب، $0/383$ و $0/733$ بود. هیچ اختلاف معنی داری در وضعیت اللی و هتروزیگوستی بین دو منطقه مشاهده نشد. در بررسی تعادل هاردی-وینبرگ (H-W) همه جایگاه ها خارج از تعادل بودند ($P \leq 0/01$). میانگین ضریب خویشاوندی درون جمعیت (F_{is})، $0/195 \pm 0/483$ و ضریب خویشاوندی کل (F_{it})، $0/187 \pm 0/518$ به دست آمد. F_{is} در بیشتر جایگاه های ریزماهورهی مثبت بود و دامنه آن از $0/194$ - در جایگاه Muso-37 تا $0/879$ در جایگاه Muso-10 محاسبه گردید (جدول ۲).

مقادیر مثبت F_{is} نشان دهنده کاهش هتروزیگوستی است. جایگاه Muso-37 با کمترین میزان F_{is} بالاترین میزان هتروزیگوستی را در تمامی جایگاه ها نشان داد.

جدول ۲- تعداد الی (Na)، الی های مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Ho)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (He) و ضریب خویشاوندی (Fit و Fis) در شش جایگاه ریزماهواره در ماهی کفال طلایی

نام جایگاه	Fit	Fis	رامسر	فریدون کنار
Muso-10	۰/۸۹۱	۰/۸۷۹	۶(۴/۴۸۹)	۴(۲/۴۷۳)
Na(Ne)				
Ho(He)			۰/۱۶۷(۰/۷۷۷)	۰(۰/۵۹۶)
Muso-16	۰/۶۳۴	۰/۵۶۵	۳(۲/۹۳۶)	۷(۴/۹۴۵)
Na(Ne)				
Ho(He)			۰/۱۶۷(۰/۶۵۹)	۰/۴۶۷ (۰/۷۹۸)
Muso-19	۰/۶۶۱	۰/۶۴۰	۹(۵/۱۶۷)	۹(۷/۲۵۸)
Na(Ne)				
Ho(He)			۰/۲۶۷(۰/۸۰۷)	۰/۳۳۳(۰/۸۶۲)
Muso-22	۱	۱	۵(۲/۶۷۹)	۵(۴/۲۰۶)
Na(Ne)				
Ho(He)			۰(۰/۶۲۷)	۰(۰/۷۶۲)
Muce-37	-۰/۱۴۵	-۰/۱۹۴	۹(۶/۶۹۱)	۵(۴/۳۲۷)
Na(Ne)				
Ho(He)			۱(۰/۸۵۱)	۰/۹۳۳(۰/۷۶۹)
Muce-55	۰/۰۶۷	۰/۰۰۹	۵(۳/۰۹۳)	۸(۳/۷۹۷)
Na(Ne)				
Ho(He)			۰/۷۰۰(۰/۶۷۷)	۰/۷۰۰(۰/۷۳۷)
تعداد کل الی < 0.05 (الی اختصاصی)			۲۸ (۳)	۳۲ (۲)
میانگین Na(Ne)	۰/۵۱۸	۰/۴۸۳	۶/۱۶۷ (۴/۱۷۷)	۶/۳۳۳ (۴/۵۰۱)
میانگین Ho(He)			۰/۳۸۳(۰/۷۳۳)	۰/۴۰۶(۰/۷۵۴)



شکل ۲- نمودار تعیین سنجش دو جمعیت رامسر و فریدونکنار در شش جایگاه ریزماهواره در ماهی کفال طلایی (بر حسب درجه تمایز)

بر اساس این نمودار جمعیت‌ها هیچ همپوشانی بر یکدیگر ندارند و از هم جدا هستند.

بحث

ماهی کفال طلایی از جمله ماهیان با ارزشی هستند که توسط دانشمندان روسی به دریای خزر معرفی شدند. این ماهی توانست با شرایط دریای خزر سازگار شود. فهم اینکه گونه‌های غیربومی که به زیستگاه دیگری معرفی شده اند آیا با موفقیت در زیستگاه جدید تشکیل جمعیت داده‌اند یک چالش بزرگ برای پیش‌بینی وضعیت آن گونه در اکوسیستم محسوب می‌شود. ارزیابی ژنتیکی جمعیت بنا شده (تازه تاسیس) چشم‌انداز مناسبی برای درک این مسأله است و هنگامی که تنوع ژنتیکی ظاهر می‌شود به عنوان یک فاکتور کلیدی برای درک وضعیت موجود آن گونه در زیستگاه جدید است (Roman و Darling، ۲۰۰۷؛ Lee، ۲۰۰۷). بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند راهکاری برای برای مدیریت ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ارائه دهد. نشانگرهای ژنتیکی مختلفی برای بررسی ساختار جمعیت وجود دارد اما در بین تمامی آنها ریزماهوره‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در اکثر موارد با موفقیت استفاده کرد (Cui و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین در این بررسی به منظور جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر ماهی کفال طلایی از ۶ جفت پرایمر ریزماهوره طراحی شده برای کفال خاکستری (Xu و همکاران، ۲۰۱۰) و کفال سویی (Xu و همکاران، ۲۰۰۹) استفاده شد و از آنجایی که ریزماهوره‌ها می‌توانند مناطق مشابهی را در سایر گونه‌ها تکثیر نمایند، از این پرایمرها استفاده گردید.

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از شاخص‌های مهم وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی است که به عنوان ابزار منحصر به فرد و توانمندی برای ارزیابی

و مدیریت جوامع زیستی مطرح است. بررسی وضعیت الی و هتروزیگوسیتی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند. در بررسی حاضر دامنه الی ماهی کفال طلایی ۵ تا ۱۳ ال در هر جایگاه 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 میکروستلایت میانگین دامنه الی را بین ۲۰ تا 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 به دست آوردند. Miggiano و همکاران (۲۰۰۵) در کفال منخط میانگین دامنه الی را برای نمونه‌های جزیره ساردینیا ۱۴ تا ۳۸ ال و برای نمونه‌های استرالیا ۱۱ تا ۲۵ ال به دست آوردند. نتایج بررسی حاصل بر روی ماهیان کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین الی به دست آمده در این بررسی (۹/۵) کمتر از دامنه اعلام شده (۶/۶ ± ۱۹/۹) برای ماهیان آب شور است (Dewoddy و Avis، ۲۰۰۰). همچنین در این مطالعه تعدادی ال با فراوانی پایین دیده شد. ممکن است علت این امر به صید بی‌رویه این گونه در سالیان گذشته بازگردد. طی سال‌های پس از انقلاب، به علت صید بی‌رویه، کفال ماهیان که متوسط وزن ماهیان صید شده فقط ۲۱۰ گرم بود، لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد نمود (رضوی صیاد، ۱۳۶۹). به‌طور کلی، تعداد کم ال نشان‌دهی از تنگنای ژنتیکی است که در شرایط جمعیت وحشی، ممکن است به علت جدا شدن جمعیت و یا کاهش شدید اندازه مؤثر باشد (Ha و همکاران، ۲۰۰۶). با توجه به اینکه ماهی کفال طلایی بومی دریای خزر نمی‌باشد این احتمال وجود دارد که جمعیت موسس کوچک در ابتدای ورود از

جایگاه‌ها هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. با این حال، کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار، کاهش تنوع اللی و همچنین وجود ال‌هایی با فراوانی پایین، را می‌توان تحت تاثیر عواملی همچون صید بی‌رویه، عوامل زیست‌محیطی همچون آلاینده‌های زیستی دانست که منجر به کاهش تکثیر طبیعی این ماهی می‌شود. کفال ماهیان گرمادوست هستند و نسبت به کاهش درجه حرارت آب حساسیت فوق‌العاده‌ای دارند و از محل کاهش درجه حرارت آب به سوی آب‌های گرم‌تر دریا حرکت می‌کند. بنابراین، به دلیل سرد شدن هوا از سواحل شمالی دریای خزر به سمت سواحل ایران مهاجرت می‌کنند و در اواخر پاییز به دلیل افت درجه حرارت به زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین در اثر کمبود مواد غذایی، دچار استرس شده و به سواحل نزدیک می‌شوند که به دلیل بالا بودن مواد آلاینده زیستی در سواحل دچار تلفات می‌گردند. بنابراین کوچک شدن جمعیت در این ماهی می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی شود. کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش داده و در نتیجه موجب کاهش در اندازه جمعیت می‌شود (Shen و Gong, ۲۰۰۴). از آنجایی که در این بررسی میانگین ضریب خویشاوندی مثبت بود، این احتمال وجود دارد 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 موجود نیست (قدسی، ۱۳۹۰).

دریای سیاه به دریای خزر عامل کاهش تنوع اللی باشد. نتایج این بررسی تایید کننده این امر است زیرا وجود ال‌های زیاد با فراوانی پایین نشان‌دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon و همکاران، ۲۰۰۴). میانگین ضریب خویشاوندی Fis و Fit مثبت نیز در دو منطقه تایید کننده این امر است. میکروستلایت‌ها شاخص حساسی در اندازه‌گیری هموزیگوسیتی در جفت‌گیری‌های هم‌خون هستند. بنابراین برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب هستند (Alarcon و همکاران، ۲۰۰۴). در این بررسی، دامنه کل هتروزیگوسیتی مشاهده شده صفر تا یک و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۵۹۶ تا ۰/۸۶۲ بود و در مناطق نمونه‌برداری 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 قابل انتظار ۰/۳۰۴ تا ۰/۸۴۵ بدست آوردند. Xu و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی کفال سویی، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۲۰۸ تا ۰/۹۱۶ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۱۲ تا ۰/۲۶۵۱ بدست آوردند. Miggiano و همکاران (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 بدست آوردند. نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده $(0/1 \pm 0/394)$ کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان آب شور $(0/22 \pm 0/77)$ است (Avis و Dewoody, ۲۰۰۰). در این بررسی، در هر دو منطقه نمونه‌برداری، در برخی

ساختار جمعیتی متوسط این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲) Thorpe و Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei, ۱۹۷۲) 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 نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

این بررسی دلایل و نتایج اولیه‌ای را برای وجود جمعیت‌های متمایز ماهی کفال طلائی در دو منطقه فریدون‌کنار و رامسر را نشان می‌دهد. وجود تنوع ژنتیکی پایین در مناطق نمونه‌برداری نشان از تنگنای ژنتیکی این گونه در دریای خزر دارد. وجود جمعیت موسس کوچک در ابتدای ورود این گونه به دریای خزر، صید بی‌رویه و آلودگی زیست‌محیطی در این دریا موجب کاهش اندازه جمعیت و در نتیجه کاهش تنوع اللی در این ماهی گردیده است. وجود آمیزش‌های خویشاوندی نیز موجب کاهش تنوع ژنتیکی در هر یک از مناطق نمونه‌برداری گردیده است. وجود ال‌های اختصاصی و تفاوت در فراوانی ال غالب در هر یک از مناطق نمونه‌برداری و شاخص تمایز معنی‌دار نشان‌دهنده وجود جمعیت‌های متفاوت در جنوب دریای خزر در آب‌های سواحل مازندران 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 بویژه سرکار خانم مهندس امیرجنتی تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 و همکاران، ۲۰۰۶). چنین نتیجه‌ای در مورد کفال ماهیان توسط سایر محققین گزارش شده است و علت آن را در ماهی کفال طلائی ناشی از وجود ال‌های نول دانستند (Xu و همکاران، ۲۰۰۹؛ Xu و همکاران، ۲۰۱۰). قدسی و همکاران (۱۳۹۰) علت آن را اشتباه در هنگام خواندن ال و انحراف تصادفی بیان نمودند. در بررسی حاضر به نظر می‌رسد علت انحراف از تعادل، مخلوط شدن نمونه‌ها و ترکیب جمعیت‌ها، خطای نمونه‌برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها باشد. در بررسی شاخص تمایز F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Wright, ۱۹۷۸). میزان F_{st} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۷۸ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی متوسط می‌باشد و میزان جریان ژنی ۲/۹ محاسبه گردید. تست تمایز R_{st} و F_{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 احتمالاً 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

منابع

۱. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۶۹. مدیریت ذخایر ماهیان استخوانی اقتصادی دریایی مازندران. اولین کنفرانس ملی بهره‌برداری مناسب از ذخایر آبزیان، سازمان شیلات استان مازندران، بابلسر.
۲. قدسی، ز.، شعبانی، ع. و شعبانپور، ب.، ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلائی (*Liza aurata* (Risso, 1810) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال سوم، شماره ششم، ۶، ۳۵-۴۶.
3. Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230, 65-80.
4. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gressoff, G.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry* 84, 680-683.
5. Bataillon, T.M., David, J.L., Schoen, D.J., 1996. Neutral genetic markers and conservation: simulated germplasm collections. *Genetics* 144, 409-417.
6. Chen, L., Li, Q., 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.
7. Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yang, G.P., Gong, Q.L., 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*. *Aquaculture* 250, 129-137.
8. Dewoody, J.A., Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadormouse fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56, 461-473.
9. Ha, H.P., Nguyen, T.T., Poompuang, S., 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.
10. Lee, C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecology and Evolution* 17, 386-391.
11. Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Sgaravizzi, G., Natali, M., 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.
12. Miggiano, E., Lyons, R.E., Li, Y., Dierens, L.M., Crosetti, D., Sola, L., 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *Molecular Ecology* 5, 323-326.
13. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
14. Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
15. Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354.
16. Roman, J., Darling, J.A., 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 454-464.
17. Shaklee, J.B., Tamaru, C.S., Waples, R.S., 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science* 36, 141-157.
18. Shen, X.Y., Gong, Q.L., 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. *Oceanic Limnology Science* 35, 332-341.
19. Thorpe, J.P., Sole-Cava A.M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* 23, 3-18.
20. Xu, T.J., Sun, D.Q., Shi, G., Wang, R.X., 2010. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in the gray mullet (*Mugil cephalus*), *Genetics and Molecular Research* 9, 1791-1795.
21. Xu, G., Shao, Ch., Liao, X., Tian, Y., Chen, S., 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from So-Iuy mullet (*Mugil soiuy* Basilewsky, 1855). *Conservation Genetics* 10, 653-655.

**Genetic variability and differentiation of golden mullet (*Liza aurata*) in
seashore of Mazandaran province using microsatellite molecular**

***M. Behrouz¹ and M. Norouzi¹**

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

Abstract

Genetic structure of golden mullet, *Liza aurata*, was investigated in the Ramsar and Fereidunkenar shores using 6 microsatellite markers designed for gray mullet (*Mugil cephalus*) and hand mullet (*Mugil soiuy*). Totally, 60 samples of adult golden mullet were collected from these regions. All primer sets as polymorphic loci were used to analyze the genetic variation. Analyses revealed that average of alleles (Na) per locus was 6.2 (range 3 to 9 alleles). All sampled regions contained private alleles. The average estimates of inbreeding coefficient (F_{is}) values of 6 microsatellites were positive. The average observed and expected heterozygosity was 0.394 and 0.743 respectively. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were in all cases ($P < 0.001$). F-statistics (F_{st}) and gene flow (Nm) estimates in allele frequencies were 0.078 and 2.9, respectively. R_{st} and F_{st} estimates in AMOVA indicated significant genetic differentiation among regions ($P \leq 0.01$). Genetic distance was 0.679, indicating that the genetic difference among the studied populations is pronounced. The data generated in this study provides the genetic variation and differentiation in populations of golden mullet in the southern Caspian Sea (Mazandaran province).

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

*Corresponding author; mohammad_behrooz@ymail.com