فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال اول/ شماره اول/ زمستان ۹۲/ صفحات۱۶-۱۱

بررسی ساختار ژنتیک ماهی کفال طلایی (*liza aurata*) در حوضه جنوبی دریای خزر (استان مازندران) با روش مولکولی میکروستلایت

محمد بهروز*[۱]، مهرنوش نوروزی[۱]، علی ناظمی[۱]

چکیده

ماهی کفال طلایی(*Liza aurata*) از گونه‌های تجاری ارزشمندی است که در نواحی جنوبی دریای خزر به علت طعم خوب گوشت، متقاضای بسیاری دارد. در تحقیق حاضر ۶ جایگاه میکروستلایت طراحی شده برای کفال خاکستری (*Mugilc ephalus*) و کفال سویی (*Mugil soiuy*) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت کفال طلایی از دو منطقه رامسر و فریدونکنار مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۶۰ نمونه بالغ ماهی کفال جمع آوری شد. متوسط تعداد الل در هر لوکوس ۶/۲۵ بدست آمد (با دامنه ۱۳-۵ الل در جایگاه‌های دو منطقه). هر دو منطقه نمونه‌برداری دارای الل‌های اختصاصی بودند، متوسط هتروزایگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار به ترتیب ۰/۳۹۴ و ۰/۷۴۳ بود. در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) همه لوکوس‌ها به طور معنی‌داری خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند. بر اساس تست AMOVA، شاخص‌های تمایز Fst ، Rst وجریان ژنی تفاوت معنی‌داری را بین جمعیت‌ها نشان داد ($P\leq$۰/۰۰۱)، میزان Fst بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۷۸ بدست آمد و همچنین میزان جریان ژنی(Nm = ۲/۹) محاسبه شد. این بررسی، مطالعات اولیه مبنی بر وجود جمعیت‌های متمایز ژنتیکی ماهی کفال طلایی در جنوب دریای خزر(استان مازندران) را نشان می‌دهد.

کلید واژه: کفال طلایی (*Liza aurata*) ، ژنتیک جمعیت، میکروستلایت، دریای خزر.

*۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و نویسنده مسؤول mohammad_behrooz@ymail.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

ماهی کفال طلایی با نام علمی (*Liza aurata* Risso, 1810) متعلق به خانواده کفال (Mugilidae) است. اعضای این خانواده عمدتاً ماهیان کرانه‌ای و کمتر متعلق به آب شیرین هستند که به طور گسترده در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده‌اند. کفال ماهیان در آب‌هایی با شوری متغیر، از آب شیرین تا آ ب‌هایی با شوری ۳۳ در هزار زندگی می‌کنند. این گونه عمدتاً در آب‌های دریایی، جایی که تخم‌های شناور رشد می‌کنند، تخم ریزی می‌نماید(Halfman *et al.*, 1997). کفال ماهیان از جمله ماهیان با ارزشی هستند که توسط دانشمندان روسی طی سال های ۱۳۰۹ تا ۱۳۱۳ به دریای خزر معرفی شدند، صید کفال ماهیان در ایران از سال ۱۹۴۲ آغاز شد طی سال‌های پس از انقلاب، به علت صید بی رویه، به خصوص صید انبوه کفال ماهیان درسال‌های بهره برداری ۱۳۶۱- ۱۳۶۲ (۶۹۷۵ تن) که متوسط وزن ماهیان صید شده فقط ۲۱۰ گرم بود، لطمه شدیدی به ذخایر آنها وارد نمود. از آنجایی‌که نگهداری تمامیت ژنتیکی جمعیت‌های این ماهی اهمیت اساسی دارد بنابراین شناسایی ساختار جمعیت به طراحی مناسب برنامه های بازسازی ذخایر کمک می‌کند. روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد از جمله این تکنیک‌ها استفاده از ریز ماهواره‌ها یا همان میکروستلایت است که به علت مزایای زیاد از جمله فراوانی و گستردگی بالا در ژنوم، همبارز بودن، پلی‌مورفیسم بالا و رتبه دهی آسان و دقیق کاربرد گسترده‌ای دارند (Chen *et al.*, 2008). از جمله مطالعاتی که توسط سایر محققین روی این گونه و سایر گونه‌های آن انجام گرفته است که می‌توان به مطالعات Xu و همکاران (۲۰۰۹)، Miggiano وهمکاران (۲۰۰۵)، Xu و همکاران (۲۰۱۰)، شعبانی و همکاران در سال (۱۳۹۰) اشاره نمود. لذا در این بررسی از نشانگرهای میکروستلایت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این گونه در مناطق رامسر و فریدونکنار که از مناطق مهم پراکنش این ماهی هستند با این فرض که ماهی کفال طلایی دارای جمعیت های مجزا در دو منطقه می‌باشد و اینکه روش میکروستلایت توانایی جداسازی جمعیت‌های مختلف این ماهی را دارد انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

تعداد ۶۰ ماهی بالغ در مناطق رامسر و فریدونکنار صید شد و حدود ۳-۲ گرم از بافت باله پشتی آنها جدا شده و تا زمان استخراج در اتانول ۹۶٪ فیکس شد. استخراج DNA به روش کیت انجام گرفت و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوط در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت و کمیت DNA های استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و

Archive of SID

www.SID.ir

اسپکتروفتومتر تعیین شد.

برای بررسی ساختار ژنتیکی گونه کفال طلایی از ۶ جفت پرایمر Muso10، Muco16، Muso19، Muso22، Muce37، Muce55 (Xu *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2009) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای الحاق برای هر یک از آنها بدست آمد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و دامنه مواد مصرفی در پرایمرها شامل : dNTPs ۰/۲میلی مولار ؛ پرایمر ۱ میکرولیتر؛ DNA، ۱۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی‌مراز ۰/۳ یونیت، PCR بافر، 1 x؛ $Mgcl_2$، ۱/۵ میلی‌مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در pH : ۸/۷ انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ جداسازی و ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند (Bassam *et al.*, 1991) و تصویر ژل‌ها ثبت شد.

فراوانی اللی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار ومشاهده شده، تعداد الل‌ها و تعداد الل‌های مؤثر در هر جایگاه، شاخص تمایز Fst و Rst بر اساس تست AMOVA، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei"1978 و تعادل هاردی – وا ینبرگ بر اساس X^2، تنوع ژنتیکی بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال ۱٪ در نرم افزار Gene Alex (Peakall and Smouse, 2009) محاسبه گردید.

۳- نتایج

در مجموع ۶ جایگاه ژنی در این تحقیق استفاده شد که همگی پلی مورف بودند. در مجموع ۵۳ الل در دو منطقه شناسایی شد. تعداد ۲۰ الل اختصاصی بدست آمد که ۱۱ الل در منطقه فریدون کنار و ۹ الل در منطقه رامسر دیده شد.

میانگین اللی بدست آمده در نمونه های منطقه فریدون کنار۶/۳۳۳ و در منطقه رامسر ۶/۱۶۷ بوده است و میانگین اللی برای دو منطقه ۶/۲۵ محاسبه شد. در این بررسی دامنه هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) در تمامی جایگاه ها در دامنه ۱–۰ و میانگین ۰/۳۹۴ بدست آمد و دامنه هتروزایگوسیتی قابل انتظار (He) نیز بین۰/۸۶۲–۰/۵۹۶ و میانگین ۰/۷۴۳ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی– وینبرگ تمامی جایگاه ها در دو منطقه خارج از تعادل بودند($P\leq$۰/۰۰۱). شاخص تمایز Fst بر اساس فراوانی اللی بین دو منطقه ۰/۰۷۸، جریان ژنی بر اساس تست AMOVA ۲/۹ در سطح جایگاه ها مشاهده شد. میزان Fst و Rst بر اساس تست AMOVA ($P\leq$۰/۰۰۱) که نشان دهنده تنوع ژنتیکی متوسط بین جمعیت‌هاست. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از معیار

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله ژنتیکی Nei در دو منطقه به ترتیب ۰/۶۷۹ و ۰/۵۰۷ محاسبه شد که بیانگر جدا بودن جمعیت‌ها در دو منطقه است.

۴- بحث

ریز ماهواره‌ها یا میکروستلایت نشانگرهای ژنتیکی هستند که به صورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liue *et al*., 2009). میکروستلایت‌ها به علت بالا بودن تعداد الل‌هایشان در میان تمام نشانگرها بالاترین میزان هتروزایگوسیتی را نشان می‌دهند (Liue, 2007). این پلی‌مورفیسم بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای میکروستلایت برای آنالیز جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید می‌باشند (Dunham, 2004). در این بررسی برای تعیین ساختار ژنتیکی ماهی کفال معمولی در مناطق رامسر و فریدونکنار از ۶ جایگاه ژنی میکروستلایت استفاده شد که همگی پلی‌مورف بودند.

نتایج بررسی حاصل بر روی کفال طلایی نشان می‌دهد که میانگین تعداد اللی بدست آمده در مقایسه با مقدار اعلام شده توسط شعبانی و همکاران در سال (۱۳۹۰)، Xu و همکاران (۲۰۱۰)، Xu و همکاران (۲۰۰۹)، Miggiano و همکاران (۲۰۰۵)، تفاوت چندانی ندارد، Dewoody و همکاران (۲۰۰۰) برای ماهیان آب شیرین این میزان را (۶/۱ ± ۹/۱) اعلام کردند که با میزان بدست آمده (۹/۵) در این بررسی در یک راستا است، اما در این مطالعه تعدادی الل با فراوانی پایین دیده شد که ممکن است علت این امر به تاریخچه دریای خزر برگردد که ذخایر بزرگی از این ماهی در سالیان گذشته در آن زندگی می‌کردند، اما امروزه به دلایل مختلفی از جمله صید بی رویه و آلودگی شدید ذخایر آن به شدت کاهش یافته است (Ivanov,2000). نتایج این بررسی تأکید کننده این امر است، زیرا وجود الل‌هایی با فراوانی پایین نشان دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است. در این بررسی میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده ۰/۳۹۴ بدست آمد که با میزان اعلام شده توسط سایر محققین در یک راستا بود همچنین این میزان نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار (۰/۷۴۳) بسیار پایین‌تر بوده است. که دلیل این کاهش را می‌توان به وجود تعداد زیادی الل با فراوانی پایین، افزایش فشار صید، از بین رفتن مکان‌های مناسب جهت تخم ریزی، نمونه برداری از افراد خویشاوند در یک محل یا اثر تکثیر مصنوعی ذکر کرد. بنابراین کاهش هتروزایگوسیتی در نتیجه ی تنگناهای ژنتیکی بر روی این گونه است (Noris *et al*., 1999;Koljanen *et al*., 2002). در بررسی حاضر در تمامی لوکوس‌ها انحراف از تعادل دیده شد چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی از وجود آلل‌های نول باشد. در

Archive of SID

www.SID.ir

واقع وجود آلل‌های نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است و بسیاری از محققین وجود آلل‌های نول را در توارث میکروستلایت ماهیان تأیید کرده‌اند. (Xu *et al.*, 2009 & 2010) رانش ژنتیکی، مخلوط شدن و غیرکافی بودن نمونه‌ها، ترکیب جمعیت‌ها، وجود جهش در پرایمرها که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزیگوسیت‌ها همانند هموزیگوت‌ها می‌شود. خطای نمونه‌برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها در بعضی مناطق را از دلایل عدم تعادل می‌توان ذکر کرد. در این بررسی میزان Fst بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۷۸ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی متوسط می‌باشد (Balloux *et al.*, 2002). بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از یکدیگر جداست. بر اساس تست AMOVA میزان RST بین دو فصل نمونه برداری معنی‌دار بود ($p>۰/۰۱$). علت پایین بودن Fst را به نرخ بالای جهش در میکروستلایت و مهاجرت ماهیان نسبت می‌دهند. 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 (۰/۵۰۷) و نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی است. نتایج این بررسی به عنوان دلایل و نتایج اولیه بیانگر این امر است که در جنوب دریای خزر هر چند جمعیت‌های گونه کفال طلایی از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک هستند اما با تفاوت معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۰۱$) از هم جدا هستند. با توجه به نتایج حاصل ضروری است برنامه‌ریزی‌های جامع برای کنترل صید و برنامه‌ریزی جدی‌تر برای احیاء ذخایر این گونه صورت پذیرد.

منابع

۱. **شعبانی، ع.، قدسی، ز.، شعبانپور، ب.، ۱۳۹۰.** بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*liza aurata* Risoo,1810), تاکسونومی و بیوسیستماتیک،۶،۳۵-۴۶.

2.**Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gressoff, G.M., 1991.** Fastandsensitive silver staning of DNAin polyacrylamide gels. Annual Biochemistery 84:680-683.

3**. Chen, L., Li Q. and Yang, J., 2008.** Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus Japonicus selenka)* from northen China. Aquaculture Research 39:1541-1549.

4.**Dewoody, J.A. and Avise, J.C., 2000.** Microsatellite variation in Marine,

Archive of SID

www.SID.ir

freshwater and anadramous fishes compared with other animals. Journal of fish biology 56: 461-473.

5. **Dunham, R. A., 2004.** Aquaculture and fisheries biotechnology Genetic Approaches.CABI Publishing, University of Auburn, Auburn.

6. **Halfman, G. S., Collette, B. B. and Facey, D. E., 1997.** The diversity of fishes. Blackwell Science Publishing, Oxford.

7. **Liu, Z., 2007.** Aquaculture genome technologies. Blackwell Science Publishing, Oxford.

8. **Liue, F, Xia J.H, Bai Z.H, Fu, J.J, Li, J.L. and Yue, G.H., 2009.** High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella)* revealed by microsatellite analysis. Aquaculture 297:51-56.

9. **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 Ecology5:323-326.

10. **Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozigosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89:583-590.

11. **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.

12. **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.

13. **Thorpe, J.P., Sole-Cava, A.M., 1994.** The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zoologica Scripta. 23: 3-18.

14. **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). Conservation Genetetics 10: 653-655.

15. **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.

Archive of SID

www.SID.ir