

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) در سواحل استان گیلان و گلستان با استفاده از روش توالی یابی DNA میتوکندری

چکیده

ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) یکی از گونه‌های با ارزش و اقتصادی دریای خزر است که تاکنون مطالعه‌ای در مورد ژنتیک جمعیت آن انجام نشده است. در این بررسی به منظور تعیین ساختار ژنتیک جمعیت ماهی کفال پوزه باریک در دو منطقه غربی (انزلی)، شرقی (تالاب گمیشان) حوضه جنوبی دریای خزر از روش توالی یابی ژن ۱۶ S rRNA میتوکندریایی استفاده شد. توالی بدست آمده از ژن مورد نظر ۵۵۲ bp بود. در مجموع بین ۷ هاپلوتایپ متفاوت و ۳۳ جایگاه متغیر بدست آمد. تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در نمونه‌های کل مناطق به ترتیب برابر ۰/۴۴ و ۰/۰۰۷ بود. نتایج بدست آمده از فاصله ژنی میزان پایداری از فاصله ژنی را در نمونه‌های دو منطقه نشان داد. برآورد جریان ژنی حاکی از وجود جریان ژنی در بین نمونه‌های دو منطقه بود و بین دو منطقه جدایی تولیدمثلی وجود نداشت. همچنین تفاوت ژنتیکی معنی‌داری بین دو منطقه مشاهده نشد ($P \geq 0.05$) و می‌توان عنوان نمود که جمعیت یکسانی از ماهی کفال پوزه باریک در مناطق مورد بررسی وجود دارد.

واژگان کلیدی: *Liza saliens*، 16S rRNA، توالی یابی DNA

میتوکندری، تنوع ژنتیکی، دریای خزر.

سهراب رضوانی گیل کلائی^۱

رحمان قانع^{۲*}

حسن فضلی^۳

ابوالقاسم کمالی^۴

فرامرز لالونی^۵

محمد جواد تقوی^۶

۱. موسسه تحقیقات شیلات ایران، استادیار پژوهشی

بخش ژنتیک، تهران، ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،

دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، تهران، ایران

۳. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، استادیار پژوهشی

بخش ارزیابی ذخایر، ساری، ایران

۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، استاد

گروه شیلات، تهران، ایران

۵. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، کارشناس بخش

بیوتکنولوژی، ساری، ایران

* مسئول مکاتبات:

Rahman_203@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۲۰

مقدمه

خانواده کفال ماهیان دارای دامنه تحمل حرارتی و شوری بالایی هستند که در تمامی آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنده‌اند (El-Zaeem, 2011). گونه‌های این خانواده براساس خواص ظاهری طبقه‌بندی می‌شوند (Tereshenko, 1950 ; Oren, 1981).

کفال ماهیان بومی دریای خزر نبوده و از دریای سیاه به این دریا منتقل و معرفی شده‌اند. طی سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ میلادی

(۱۳۰۹ تا ۱۳۱۳ هجری شمسی) حدود سه میلیون عدد بچه‌ماهی کفال یک‌ساله و کوچک‌تر، از سه گونه کفال طلایی (*aurata*)، کفال پوزه‌باریک (*Liza saliens*) و کفال مخطط (*Mugil cephalus*) از دریای سیاه به دریای خزر پیوند زده شدند که پیوند دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه‌باریک موفقیت آمیز بوده و در مدت کوتاهی بخوبی با شرایط اکولوژیکی دریای خزر سازگار شده و از پراکنش بسیار خوبی برخوردار گردیدند

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) ...
(Oren, 1981; Avanesove, 1972; Zablotski, 1966;)

(Kosarev and Yablonskaya, 1994).

ماهی کفال پوزه باریک با نام علمی *Liza saliens* (Risso, 1810) که در سابق جزء جنس *Mugil* طبقه بندی شده بود، متعلق به تیره کفال ماهیان (Mugilidae) می باشد (Belyaeva et al., 1989) که یکی از گونه های با ارزش ماهیان استخوانی دریای خزر است (Ghaninejad et al., 2009).

امروزه آنالیز DNA میتوکندری به علت ویژگی های خاص خود وسیله ای سودمند برای مطالعات ژنتیک مولکولی است (Meyer, 1993; Billington and Hebert, 1991).

در بیش تر گونه ها DNA میتوکندری (mtDNA) بسیار متغیر بوده و از این رو مارکر خوبی برای مشخص کردن اختلافات ژنتیکی می باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه ای، سیستماتیک و طبقه بندی آن ها می باشد (Rezvani Gilkole, 1997).

یکی از اهداف مهم مدیریت شیلاتی برداشت بهینه و پایدار از ذخایر ماهیان از اهداف مدیریت شیلاتی است که دستیابی به آن نیازمند آگاهی و شناخت ذخایر هر یک از گونه ها می باشد (رضوانی گیل کلائی و همکاران، ۱۳۸۸). در مورد مطالعات تنوع ژنتیکی

کفال ماهیان در دریای خزر تاکنون مطالعات جامعی انجام نشده است. طی سال های اخیر صید ماهی کفال پوزه باریک از دریای خزر به شدت کاهش یافته است و بیش ترین لطمه به ذخایر آن وارد شده است (فضلی و غنی نژاد، ۱۳۸۳).

به طور کلی هدف از انجام این تحقیق، مطالعه ذخایر این گونه جهت شناسایی تنوع ژنتیکی و وجود جمعیت های متفاوت احتمالی در دو منطقه غرب و شرق از حوضه جنوبی دریای خزر و همچنین مطالعه انواع هاپلوتیپ های بدست آمده و فاصله ژنتیکی بین آن ها در دو منطقه انزلی و تالاب گمیشان براساس توالی یابی ناحیه 16S rRNA مولکول mtDNA بوده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری در دو منطقه صید انزلی و تالاب گمیشان در دو فصل صید زمستان ۱۳۸۹ و پاییز ۱۳۹۰ انجام شد. در هر منطقه تعداد ۱۵ نمونه کفال پوزه باریک به طور کاملاً تصادفی انتخاب شد. از هر نمونه ۵-۳ گرم از بافت باله دمی تهیه و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد. نمونه ها جهت آزمایشات بعدی به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (شهرستان ساری) منتقل شدند. جدول ۱ تعداد و پراکنش و موقعیت جغرافیایی نمونه های جمع آوری شده از ماهی کفال پوزه باریک را در ایستگاه های مختلف نشان می دهد.

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده در سواحل گیلان و گلستان (۱۳۸۹-۱۳۹۰)

موقعیت	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ایستگاه نمونه برداری	تعداد نمونه
گیلان	۳۱° ۴۹'	۵۰° ۳۷'	تعاونی پره شهیدنوبخت انزلی	۱۵
گلستان	۱۷° ۵۳'	۳۳° ۳۷'	تالاب گمیشان	۱۵

جهت استخراج DNA ژنومی از بافت باله به روش استات آمونیوم استفاده شد (Pourkazemi, 1996). برای این منظور حدود ۵۰ میلی گرم از نمونه باله ماهی کاملاً خشک و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و له شد. سپس برای هضم بافت مورد نظر به ویژه پروتئین ها بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر STE، ۵۰ میکرولیتر SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۱۰

درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید. جهت فعال نمودن کامل آنزیم تیوپ حاوی نمونه به مدت ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت در شیکر قرار داده و پس از آن به مدت یک شب در بن ماری ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. طی این مدت نمونه به طور کامل هضم شده و بصورت امولسیون غلیظ در آمد. نمونه ها به مدت یک شب در بن ماری قرار داده شده سپس

آن‌ها را خارج نموده و به هر تیوپ ۱۶۰ میکرولیتر استات آمونیوم اضافه شد و برای مدت حداقل یک ساعت با استفاده از شیکر به هم زده و بلافاصله در ۱۳۰۰۰ دور (Cold room centrifuge) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به آرامی ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی را توسط یک نمونه‌بردار جدا کرده، در داخل تیوپ جدیدی ریخته و برای حذف بقایای استات آمونیوم بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. لوله‌ها با دست به آرامی چندین مرتبه سر و ته شده، در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و فاز بالایی محلول دور ریخته شد. جهت خارج نمودن کامل ایزوپروپانول، ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به لوله‌ها اضافه و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از عمل سانتریفیوژ فاز الکل جدا شده و تیوپ‌ها در دمای اتاق قرار داده شد تا تمام الکل آن خشک و تبخیر شود. پس از خشک شدن بر روی رسوب DNA ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و در بن ماری در دمای ۴۰ درج سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا DNA به‌طور کامل در آب حل و قطعات ناخواسته هضم گردد. در پایان در فریزر و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تعیین کیفیت DNAهای استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز (پلیمر پلی ساکارید) ۱ درصد استفاده شد. واکنش PCR برای ماهی کفال از نظر غلظت DNA، آنزیم Taq، MgCl₂، آغازگر، dNTP، چرخه‌های دمایی با تکرارها و دماهای ذوب متفاوت بهینه‌سازی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از یک جفت پرایمر برگرفته شده از Tamura و همکاران (۲۰۱۱) که جهت تکثیر توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA، ژنوم میتوکندری کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به کار برده بود، استفاده شد.

ترادف ژنی پرایمر مورد نظر عبارتست از:

پرایمر جلوبر:

5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'

پرایمر معکوس:

5' - CCGGTCTGAACTCAGATCAG - 3'

برای انجام واکنش PCR و تکثیر قطعه ژن هدف از ۲۰ نانوگرم DNA، ۵ میکرولیتر بافر PCR (1x)، MgCl₂ با غلظت ۱/۶ میلی مول، ۱/۵ میلی مول dNTP، ۱/۲ پیکومول از هر آغازگر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و در نهایت آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰ میکرولیتر برسد، انجام شد.

مرحله تکثیر DNA در دستگاه ترمال سایکلر (Auto Q) انجام گرفت که از دستگاه با برنامه زیر استفاده گردید:

چرخه مقدماتی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، در ادامه ۳۲ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت واسرشته سازی، دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه به منظور اتصال برای اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

محصول PCR بدست آمده در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید تا از تکثیر تخصصی ژن مورد نظر اطمینان حاصل شود. توالی‌یابی یک‌طرفه از ژن بدست آمده توسط شرکت بیونر کره جنوبی انجام شد در نهایت پس از تعیین توالی قطعه bp 552 از ژن 16S rRNA میتوکندریایی بدست آمد.

تمامی توالی‌ها به وسیله برنامه Clustal X در نرم‌افزار BioEdit 7.1.3.0 ردیف شدند (Thompson et al., 1997).

تنوع DNA میتوکندری با سنجش تنوع نوکلئوتیدی (π) و تنوع هاپلوتایپی (h) (Nei, 1987) برای هر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار DnaSP 5.10.01 (Rozas et al., 2003) محاسبه شد. فاصله ژنتیکی (Kumar et al., 2004) بین جمعیت‌ها بر اساس مدل Maximum Composite Likelihood میانگین اختلاف جفت نوکلئوتیدی (Tamura et al., 2007) داخل جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega Verison 5.05 بدست آمد.

شاخص ثابت Fst (Hudson et al., 1992) برای بدست آوردن تنوع ژنتیکی در تمام مناطق و بین دو منطقه و جریان

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) ...
ژنی (نانومتر) با استفاده از نرم افزار DnaSP 5.10.01 محاسبه شد.

نتایج

نمونه‌ها جهت تعیین توالی‌یابی به شرکت بیونر کره جنوبی فرستاده شدند، اما تعداد ۲ نمونه با توجه به غلظت کم DNA آن‌ها جواب قابل قبولی نداشتند، از این‌رو مورد بررسی قرار نگرفتند. تمامی توالی‌ها با شماره ثبت (FJ874767, EF437095, AY169702, GQ258709-10) که از گونه مورد نظر در GenBank موجود بودند، مطابقت داده شد که دارای تطابق ۹۸ درصد بودند. توالی‌ها پس از تصحیح و ردیف شدن شامل ۵۵۲ جفت باز (bp) بود.
از میان توالی‌های بدست آمده در مجموع ۷ هاپلوتایپ مشاهده شد و تعداد ۳۳ جایگاه متغیر بدست آمد، ۷ هاپلوتایپ در

نمونه‌های منطقه گیلان (Ha3, Ha4, Ha5, Ha6, Ha7, Ha1, Ha2) و ۲ هاپلوتایپ در نمونه‌های منطقه گلستان (Ha1, Ha2) مشاهده شد. از بین هاپلوتیپ‌های بدست آمده، هاپلوتایپ Ha1, Ha3 در بین دو منطقه مشترک بود و پنج هاپلوتیپ Ha2, Ha4, Ha5, Ha6, Ha7 در جمعیت گیلان منحصربه‌فرد بود. تنوع هاپلوتایی (h) ژن 16S rRNA در نمونه‌های کفال پوزه باریک مناطق گیلان و گلستان به ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۱۵ بود، در حالی که تنوع نوکلئوتیدی (π) به ترتیب ۰/۰۱۳۵ و ۰/۰۰۰۳ بود (جدول ۲). نتایج بدست آمده از داده‌ها میزان پایداری از تنوع نوکلئوتیدی را بین نمونه‌ها نشان داد و اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌ها معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$) (جدول ۳).

جدول ۲: توزیع هاپلوتایپ میتوکندریایی در نمونه‌های کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) آنالیز شده سواحل استان گیلان و گلستان (۱۳۸۹-۱۳۹۰)

Σ	گلستان	گیلان	مکان / هاپلوتایپ
۲۱	۱۲	۹	Ha1
۲		۲	Ha2
۱	۱	۱	Ha3
۱		۱	Ha4
۱		۱	Ha5
۱		۱	Ha6
۱		۱	Ha7
۲۸	۱۳	۱۵	Σ

جدول ۳: سطوح تنوع ژنتیکی نمونه کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) در سواحل استان گیلان و گلستان

(۱۳۸۹-۱۳۹۰) (n: تعداد نمونه، h: تنوع هاپلوتایی، π : تنوع نوکلئوتیدی)

منطقه	n	تعداد هاپلوتایپ	شاخص تنوع مولکولی
			h
			π
گیلان	۱۵	۵	۰/۰۱۳۵
گلستان	۱۳	۲	۰/۰۰۰۳
تمام نمونه‌ها	۲۸	۷	۰/۰۰۰۷

مقدار جریان ژنی بدست آمده در بین نمونه های دو منطقه ۲/۱۵ بود که حاکی از وجود جریان ژنی (Nm) در بین دو منطقه بود و بین این دو منطقه جدایی تولیدمثلی وجود ندارد. برای اندازه گیری تمایز ژنتیکی از فاکتور Fst استفاده می شود که به طور مستقیم و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز می باشد که پس از آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار DnaSP ارزش Fst را در تمام نمونه های دو منطقه ۰/۰۹ نشان داد. مقدار فاصله ژنتیکی (d) بین نمونه های مناطق بدست آمده ۰/۰۱ بود که حاکی از وجود شباهت ژنتیکی بین نمونه های مناطق بود.

بحث و نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از سه عامل ضروری حفاظت از گونه ها بیان شده است (Miller, 1997). طی سالیان گذشته با پیشرفت علم ژنتیک تکنیک های سریع و قابل اعتمادی برای تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت ها، میزان خویشاوندی بین گونه ای و درون گونه ای به وجود آمده است.

مدیریت بهینه ذخایر آبزیان به اطلاعاتی در مورد ساختار جمعیتی گونه ها نیاز دارد که این علم آن را در اختیار محققین گذاشته است (Adams and Hutchings, 2003). چندین نواحی DNA هسته و میتوکندری برای شناسایی گونه های ماهیان و بررسی ساختار ژنتیکی آن ها به کار گرفته شده است (Ballard and Whitlock, 2004).

ناحیه ۱۶ S rRNA از DNA میتوکندری یک مارکر مناسب برای مطالعات ژنتیکی ماهیان می باشد (Dudud et al., 2011; Hillis and Dixon, 1991).

در این تحقیق ژن 16S rRNA ماهی کفال پوزه باریک که روی ژنوم میتوکندری قرار دارد، با تکنیک PCR تکثیر و سپس توالی یابی شد. تمام نمونه های کفال پوزه باریک سطوح نسبتاً پایینی از تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی را برای این مارکر مولکولی نشان دادند که تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی کل بدست آمده به ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۰۷ بود. این مقدار با مقادیر پایین تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در گزارش Nguyen و همکاران در سال ۲۰۰۸ که به مطالعه تنوع ژنتیکی در گونه

(Cyprinidae) *T. douronensis* و *Tor tambroides* با استفاده از ژن 16S rRNA در آب های مالزی پرداخت، مطابقت داشت. همچنین این مقدار با گزارشات Erguden و همکاران (۲۰۱۰) در جنس های کفال ماهیان دریای مدیترانه، Caldara و همکاران (۲۰۰۲)، Rossi و همکاران (۲۰۰۴) و Papasotirpoulos و همکاران (۲۰۰۷) در جنس های مشابه مطابقت داشت.

براساس گزارش Li و همکاران (۲۰۰۷) هرگاه $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $Nm < 1$ باشد، رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می شود.

یکی از دلایل یکسان بودن جمعیت در این دو منطقه احتمالاً وجود تبادل جریان ژنی می باشد که بین این نمونه ها وجود دارد. از آنجایی که جریان ژنی یکی از مهم ترین عوامل شکل گیری در ساختار ژنتیکی جمعیت ها و گونه ها می باشد، تفاوت های ژنتیکی مابین جمعیت ها زمانی رخ می دهد که جریان ژنی موجب جلوگیری از تفاوت های ناشی از انتخاب طبیعی نگردد (Tremblay and Ackerman, 2001). میزان جریان ژنی بدست آمده در بین مناطق بیانگر انجام مهاجرت های زیاد می باشد. با توجه به این که در دریا موانع فیزیکی و زیستی نبوده و تفاوت های نسبی محیطی نظیر دما، شوری بین مناطق مختلف دریای خزر وجود ندارد، عملاً مهاجرت به راحتی از منطقه ای به منطقه دیگر امکان پذیر می باشد.

نتایج این بررسی با گزارش Khoshkholgh و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت که به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش توالی یابی منطقه کنترل DNA (D-loop) میتوکندریایی پرداختند. در طی این بررسی نمونه تاس ماهی ایرانی از ۴ منطقه آستارا، رودخانه سفید رود، نوشهر و بندر ترکمن جمع آوری گردید. نتایج آنالیز Fst بر اساس روش دو پارامتری و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد بیشترین تنوع در درون نمونه ها می باشد و اختلاف بین نمونه های مناطق آستارا، نوشهر و بندر ترکمن معنی دار نبود. برآورد جریان ژنی نشان داد که بین نمونه های رودخانه سفیدرود

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) ...

و دیگر مناطق جدایی تولیدمثلی وجود دارد که ممکن است در نتیجه جدایی جغرافیایی باشد.

در بررسی پورغلام و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گاوماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای پرداختند که در آن با توجه به وجود اختلاف معنی‌دار میزان *Fst* عنوان نمود که ۳ گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه در حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد که این تفاوت بین ۳ گروه می‌تواند به خاطر اختلاف در نوع بستر، شیب بستر، وسعت عمق کم در نواحی مختلف و همچنین نوع تغذیه (تنوع ماکروبتوزها در غرب و شرق حوضه جنوبی باهم متفاوت می‌باشد) و تقابل گونه‌ای در این وجود تنوع در گونه موثر می‌باشد و شرایط زیست محیطی می‌تواند باعث تغییرات در ساختار گاوماهیان شود.

هرچند شناختن فاکتورهای قابل قبول برای یافتن علت سطوح پایین اختلافات ژنتیکی آسان نمی‌باشد، ولی فعالیت‌های بیش از حد انسانی می‌تواند یکی از این دلایل باشد. از اهم این فعالیت‌های انسانی، صید بی‌رویه می‌باشد. بهره‌برداری بیش از حد یکی از عوامل اصلی انقراض گونه‌های دریایی است که می‌تواند بر اندازه جمعیت ماهیان تاثیر منفی داشته باشد (Cheng et al., 2008). از این‌رو در منطقه جنوبی دریای خزر برخی مقیاس‌ها برای صید و آلودگی‌ها به منظور کاهش تاثیر فعالیت‌های انسانی استفاده و بکار گرفته شود.

در این مطالعه مقدار فاصله ژنتیکی کل بدست آمده از نرم افزار Mega4 بین سه منطقه ۰/۰۵ بود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که میزان متوسط فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های هم گونه (*Conspecific populations*) ۰/۰۷ - ۰/۰۲ و بین گونه‌های هم‌جنس (*Conspecific population*) ۰/۶۱ - ۰/۰۳ می‌باشد (Shaklee et al., 1982; Thorp and Sol-Cave, 1994).

مقدار فاصله ژنتیکی بین منطقه انزلی و گمیشان ۰/۰۱ بود که مقدار فاصله ژنتیکی بدست آمده در محدوده جمعیت‌های هم گونه بوده و حاکی از تشابه زیاد نمونه‌های بین دو منطقه می‌باشد.

فاکتور *Fst* نشان دهنده وجود تمایز بین جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می‌باشد.

با توجه به گزارش Wright در سال (۱۹۷۸) هرگاه میزان *Fst* بدست آمده کم‌تر از ۰/۰۵ باشد، نشان دهنده وجود تمایز کمی در بین جمعیت‌ها می‌باشد، اگر چه حتی مقدار کم *Fst* نیز می‌تواند بازگوکننده اختلاف ژنتیکی مهمی در بین جمعیت‌ها باشد (Menezes et al., 1992). هرگاه مقدار آن بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ باشد، نشان دهنده تمایز متوسط و مقدار بالای ۰/۱۵ نشان دهنده تمایز بالاست.

در این بررسی مقدار *Fst* بدست آمده بین دو منطقه گیلان و گلستان ۰/۰۹ بود. میزان تمایز ژنتیکی در دو منطقه گیلان با گلستان در محدوده تمایز ژنتیکی متوسط قرار دارد.

یکی از عوامل کاهش ذخایر کفال پوزه باریک مساله ورود شانه‌دار به دریای خزر است که طی سال‌های گذشته وارد این دریا شده و به دلیل مناسب بودن شرایط محیطی، به‌خوبی گسترش یافته است (Ivanov et al., 2000).

شانه‌دار مهاجم به‌شدت از ژئوپلانکتون‌ها تغذیه می‌کند که می‌تواند نوعی رقابت غذایی را بین شانه‌دار و لارو ماهی کفال پوزه‌باریک به‌وجود آورده و فقر غذایی موجب کاهش ضریب بقا کفال‌پوزه باریک شود. از طرف دیگر با توجه به این‌که زمان تکثیر و تخم‌ریزی کفال پوزه‌باریک ماه‌های گرم سال بوده، تراکم زیاد شانه‌دار مهاجم و تغذیه از تخم و لارو این ماهی می‌تواند بر بازسازی ذخایر این گونه تاثیر نامطلوبی داشته باشد و به‌شدت از ذخایر این گونه کاسته شود (فضلی و غنی نژاد، ۱۳۸۳) که این مساله می‌تواند بر تنوع ژنتیکی این گونه تاثیر نامطلوبی گذاشته و تنوع این ذخایر را در حوضه جنوبی دریای خزر بکاهد.

در این بررسی با توجه به نتایج حاصله و معنی‌دار نبودن اختلافات ژنتیکی بدست آمده بین مناطق مختلف نمونه‌برداری و سایر داده‌های بدست آمده از مطالعه حاضر می‌توان عنوان نمود که در بخش جنوبی دریای خزر، مدرک کمی وجود دارد که بیان کند نمونه‌های کفال پوزه‌باریک به دو جمعیت مجزا تقسیم شود و در تمام مناطق مورد بررسی یک جمعیت واحد زندگی می‌کنند. وجود این ساختار ژنتیکی همسان می‌تواند به دلیل عادت‌های اکولوژیکی، مهاجرت آزادانه ماهیان به سایر مناطق،

Ichthyofauna and commercial resources. Nauka, Moscow, 236pp. (In Russian).

Billington, N. and Hebert D. N., 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Can. J. Fish, Aquat, Sci, 48 (Supplement 1): 80-94.

Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colomb, L. and Patarnello, T., 2002. Molecular phylogeny of Grey Mulletts based on mitochondrial DNA sequence analysis, Evidence of a differential rate of evolution at the intra family level. Molecular Phylogenetics and Evolution, 6: 416-424.

Cheng, Q., Ma, C., Cheng, H. and Zhang, Q., 2008. Mitochondrial DNA diversity of *Coilia mysus* (Clupeiformes: Engraulidae) in three Chinese estuaries. Environ Biol fish, 83:277-282.

Dudud, A., Georgescu, S. E., Popa, O., Dinischiotu, A. and Costache, M., 2011. Mitochondrial 16S and 12S rRNA sequence analysis in four Salmonid species from Romania. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 57(3): 233-246.

El-zaem, S. Y., 2011. Phenotype and genotype differentiation between flathead grey mullet [*Mugil cephalus*] and thinlip grey mullet [*Liza ramada* (Pisces: Mugilidae)]. African Journal of Biotechnology, Vol. 10, (46): 9485-9492.

Erguden, D., Gurlek, M., Yaglioglu, D. and Turan, C., 2010. Genetic Identification and Taxonomic Relationship of Mediterranean Mugilid Species Based on Mitochondrial 16S rDNA Sequence Data. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(2): 336-341.

Ghaninejad, D., Abdolmalaki, S. and Kuliye, Z. M., 2009. Reproductive biology of the leaping grey mullet, *Liza salience* in the Iranian coastal waters of the Caspian Sea. Iranian journal of fisheries sciences, 9(3): 402-411.

Hillis, D. M. and Dixon, M. T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology, 66: 411-453.

Hudson, R. R., Slatkin, M. and Maddison, W. P., 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics, 132: 583-589.

Ivanov, P. I., Kamakim, A. M., Ushivtzev, V. B., Shiganova, T., Zhukova, O., Aladin, N., Wilson, S. L., Harbison, G. R. and Dumount, H. J., 2000. Invasion of Caspian Sea by the Jelly fish

نبود تقابل بین گونه‌های کفال پوزه‌باریک، فعالیت‌های شدید

انسانی همچون صید و صیادی و آلودگی محیط دریایی باشد.

بدیهی است اظهارات قطعی در این زمینه مستلزم انجام مطالعات بیش‌تر است. از این‌رو پیشنهاد می‌گردد از ناحیه دیگری از ژنوم میتوکندریایی مثل ناحیه D-LOOP مورد مطالعه قرار گیرد و این تحقیق به‌صورت گسترده‌ای با جمع‌آوری نمونه‌هایی از نواحی شمالی و میانی دریای خزر انجام گیرد تا بتوان براساس نتایج بدست آمده و شناسایی جمعیت احتمالی، مدیریت اصولی را برای ذخایر این ماهیان اعمال نمود.

سپاسگزاری

این طرح مطالعاتی با پشتیبانی مرکز تحقیقات شیلات ایران انجام شد، لذا از جناب آقای طالشیان کارشناس بخش ارزیابی ذخایر پژوهشکده اکولوژی دریای خزر سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

پورغلام، ح.، زمینی، ع.، لالویی، ف.، خارا، ح.، نادری، م. و تقوی، م. ج.، ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گاوماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای در حوضه جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، سال هجدهم، شماره ۴.

فضلی، ح. و غنی‌نژاد، د.، ۱۳۸۳. بررسی صید و برخی جنبه‌های زیست‌شناختی کفال‌ماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، صفحات ۹۷-۱۱۲.

رضوانی گیل کلانی، س.، سالاری علی‌آبادی، م. ع.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح. و نبوی، س. م. ب.، ۱۳۸۸. بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علمی شیلات ایران، سال هجدهم، شماره ۳.

Adams, B. K. and Hutchings, A., 2003. Micro geographic population structure of brook char: A comparison of microsatellite and mark-recapture data. Journal of fish Biology, 62:517-533.

Avanesov, A. M., 1972. The present status of mullets reproduction (the genus mugil) in the Caspian Sea. Voprosy Ikhtiologii (Problems of Ichthyology), Vol.12, 3: 467-470.

Ballard, J. W. O. and Whitlock, M. C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology, 13: 729-744.

Belyaeva, V. N., Kazanchev, E. N. and Raspopov, V. M., 1989. The Caspian Sea.

from the south Caspian Sea. Ph.D Thesis, University of Wales, Swansea.

Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph.D. thesis, University of Wales, Swansea.

Rossi, A. R., Ungaro, A., De Innocentiis, S., Crosetti, D. and Sola, L., 2004. Phylogenetic analysis of Mediterranean Mugilids by allozymes and 16S rRNA genes investigation: Are the Mediterranean species of *Liza* monophyletic? *Biochem Genet*, 42: 301-313.

Rozas, J., Sanchez, J. C., Delbarrio, X. and Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.

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.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. Mega 4: Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.*, 24: 1596-1599. PMID: 17488738.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, (In Press).

Tereshenko, K. K., 1950. Materials for the Caspian Sea mullets fisheries (KASPINIRO) in tarybn. *Khva I okeanogr*, 11: 49-86. (In Russian).

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins D. G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid, Res*, 24: 4876-4882.

Thorp, J. P. and Sol-Cave, A. M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoological Scripta*, 23: 3-18.

Wright, S., 1978. Evolution the Genetics of population variability within and Natural population. University of Chicago press, vol 4.

Zablotski, V. I., 1966. Changes in the parasite fauna mullet in connection with its acclimatization in the Caspian Sea. In: *Acclimatization of animals in the USSR*. A. I. Yanushevich (Ed.). Israeli Program for Scientific Translation, Jerusalem, IPST.Cat. No. 1218, PP. 238-239.

menemiopsis leidyi (Ctenophora). *Biological Invasion*, Vol.2, PP. 255-259.

Khoshkholgh, M., Pourkazemi, M., Nazari, S. and Azizzadeh Pormehr, L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. *Caspian J, Env, Sci*, Vol. 9 No.1, PP. 17-25.

Kosarev, A. N. and Yablonskaya, E. A., 1994. The Caspian Sea. SPB Academic Publishing, The Hague, NL, 255 p.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5: 150-163.

Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun. Z. and Liang, L., 2007. Microsatellite DNA marker analysis of Genetic Diversity wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) population. *Genetic and Genomic*, 34: 984-993.

Menezes, M. R., Martins, M. and Naik, S., 1992. Interspecific genetic divergence in grey mullets from the Goa region. *Aquaculture*, 105: 117-129.

Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, Amsterdam, PP. 1.

Miller, M. P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computersoftware distributed by author.

Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.

Nguyen, .T. T. T., Ingram, B., Sungan, S., Gooley, G., Sim, S. Y., Tinggi, D. and De Silva, S. S., 2008. Mitochondrial DNA diversity of broodstock of two indigenous mahseer species, *Tor tambroides* and *T. douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak, Malaysia. Thailand, Kasetsart University press.

Oren, O. H., 1981. Aquaculture of Grey Mullet. Cambridge University Press, Cambridge, 507p.

Papasotirpoulos, V., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G., Alahiotis, S. and Kiliass, G., 2007. Molecular phylogeny of grey mullets (Teleostei:Mugilidae) in Greece:evidence from sequence analysis of mtDNA segments. *Biochem Genet*, 45: 623-636.

Pourkazemi, M., 1996. Molecular and Biochemical Genetic Analysis of sturgeon stocks

