magiran.com

بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سهراب رضوانی گیل‌کلائی[۱]*؛ محمد علی سالاری علی‌آبادی[۲]؛ احمد سواری[۳]؛ حسین ذوالقرنین[٤] و سید محمد باقر نبوی[٥]

۱- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥

۲، ۳، ٤ و ٥ - دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر صندوق پستی: ٦٦٩

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۸

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش ریزماهواره بررسی گردید. در زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸۶ حدود ۵-۳ گرم از بافت نرم انتهای باله سینه‌ای و باله پشتی ۱۸۴ نمونه ماهی جدا و در الکل اتیلیک خالص (۹۶ درصد) تثبیت شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره صورت گرفت. دندروگرام فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار ژنتیکی MEGA 4.0.2 ترسیم گردید. حداکثر مقدار F_{st} (۰/۰۶۳) براساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است، مشاهده گردید. میزان R_{st} براساس آزمون AMOVA بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه‌برداری غیرمعنی‌دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی‌دار بود ($P<0.01$). براساس درخت فیلوژنی رسم شده، مناطق مختلف به دو خوشه تقسیم شدند، خوشه اول شامل مناطق بوشهر و دیر بوده و خوشه دوم از آن منشعب شده و به دو گروه تقسیم شده است گروه اول شامل نمونه‌های مناطق پزم و بریس و گروه دوم شامل نمونه‌های مناطق بندر لنگه و بندرعباس می‌باشد. ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزا است که شامل جمعیت‌های بوشهر، هرمزگان و چابهار می‌باشد.

لغات کلیدی: ماهی سوکلا، ریزماهواره، خلیج فارس، دریای عمان

* نویسندهٔ مسئول: Rezvani@ifro.ir

magiran.com

مقدمه

خانواده Rachycentridae یکی از قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین ماهیان استخوانی می‌باشد که تنها دارای یک گونه منحصر بفرد بنام سوکلا (*Rachycentron canadum*) می‌باشد، سوکلا ماهی سطحزی و سریع‌الرشد و یکی از معدود ماهیانی است که در دنیا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و آبهای گرم معتدله بغیر از شرق اقیانوس آرام و دریای مدیترانه یافت می‌شود و بیشترین فراوانی را در طول سواحل اطلس جنوبی ایالات متحده و شمال خلیج مکزیک دارد (Ditty & Shaw, 1992; Turner & Rooker, 2005; Shaffer & Nakamura, 1989). بیشینه برداشت پایدار ذخایر ماهیان از اهداف مدیریت شیلاتی است که دستیابی به آن نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می‌باشد. یکی از روش‌های مورد استفاده جهت ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها بکارگیری صفات مورفومتریک و مریستیک است اما با توجه به حساسیت زیاد صفات مورفومتریک و مریستیک به تغییرات محیطی و نیز اثر منفی دستکاری هنگام نشانه‌گذاری بر سلامت و بقای ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه‌گذاری به زمان جمع‌آوری آنها (Adams & Hutchings, 2003)، همگام با پیشرفت علم استفاده از نشانگرهای مولکولی مثل ریزماهواره، آلوزایم، RAPD، AFLP و RFLP که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشد جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش رایج شده است (Ryman, 1991). امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها می‌باشد (Lu, 1998 ; Rezvani Gilkolaei, 1997).

Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا (*R. canadum*) ۲۰ آغازگر ریزماهواره را در ماهی سوکلای خلیج مکزیک واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند، نتایج حاکی از تغییر تنوع ژنتیکی بین صفر تا ۰/۹۱۰و تعداد ۱۵-۱ آلل در جایگاه‌های مختلف ریزماهواره‌ای می‌باشد. Valinassab و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی تعیین زیتوده و بیشینه برداشت پایدار ذخایر ماهیان جنوب ایران، ماهی سوکلا را بعنوان گونه مهم تجاری پلاژیک معرفی و درصد زیتوده کل آن را ۱/۸۲ و ۰/۱۰ بترتیب در خلیج فارس و دریای عمان برآورد نمود. داد.

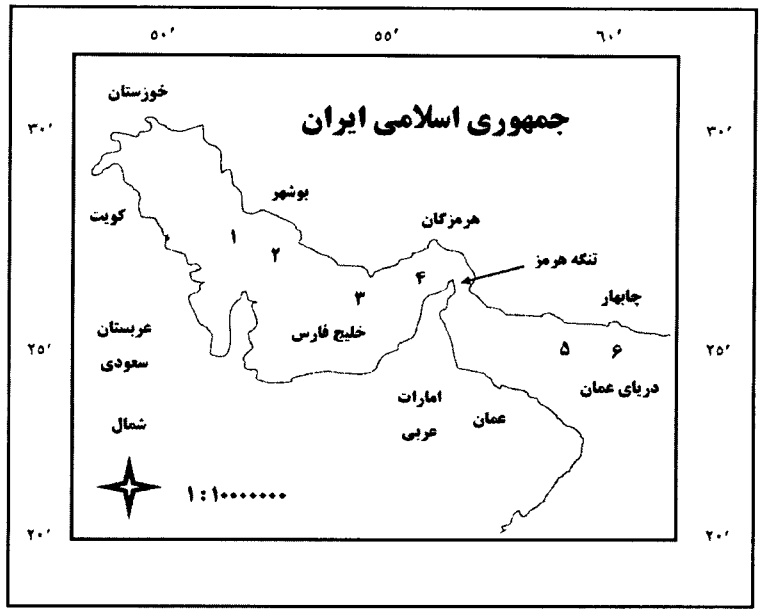
امروزه جمعیت ماهی سوکلا در اکثر اکوسیستمهای جهان و از جمله خلیج فارس و دریای عمان بعلت صید غیرمجاز و غیرقانونی به شدت کاهش یافته و اندک ذخایر باقیمانده ماهیان هم به جهت تخریب بسترهای تخم‌ریزی، فشار صید بی‌رویه، صید غیرقانونی و آلودگی با مشکلاتی مواجه هستند. لذا انجام تحقیق حاضر براساس تکنیک مولکولی آنالیز ریزماهواره با استفاده از ژنهای مستقر بر روی ژنوم ماهی سوکلا در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان و با هدف شناسایی ساختار جمعیتی ماهی سوکلا در هر یک از مناطق مختلف نمونه‌برداری امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر بود.

مواد و روش کار

در این بررسی پس از مطالعه اولیه و تعیین ایستگاهها ۳ تا ۵ گرم از بافت نرم انتهای باله سینه‌ای و باله پشتی ۱۸۴ عدد از ماهی‌های سوکلا صید شده در عملیات صیادی کشتی‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات شیلات ایران و صیدگاههای شیلات استان بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان در زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸۶ جدا و در اتانول خالص تثبیت گردید و برای انجام آزمایش و مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری منتقل گردید. شکل ۱ موقعیت ایستگاههای نمونه‌برداری در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان و جدول ۱ تعداد و پراکنش نمونه‌های جمع‌آوری شده ماهی سوکلا را نشان می‌دهد.

DNA هسته به روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج شد (Hillis & Moritz, 1990). به این ترتیب که در ابتدا بافت مورد نظر در یک بافر لیزکننده همراه با پروتئیناز K (آنزیمی برای شکستن پروتئین‌ها) همگن شده و سپس یک حجم فنل به آن افزوده شده و به شدت مخلوط گردید. از آنجایی که فنل و آب مخلوط شدنی نیستند براساس بار الکتریکی مربوط، پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه به سمت فاز فنلی مهاجرت می‌کنند و در مقابل اسیدهای نوکلئیک در فاز آبی باقی می‌مانند. این فرآیند ادامه پیدا می‌کند و باقیمانده فنل بوسیله افزودن کلروفرم و سپس استخراج فاز آبی از مخلوط جدا می‌گردد. در نهایت DNA بوسیله اتانول از فاز آبی جدا شده و ته‌نشین می‌شود (Hoelzel & Dover, 1991). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید. در این مطالعه با توجه به منابع طراحی آغازگرهای ریزماهواره‌ای براساس ترادف DNA ژنومی ماهی سوکلا صورت گرفت (Renshaw *et al.*, 2005 ;Pruett *et al.*, 2005).

magiran.com



شکل ۱: موقعیت ایستگاههای نمونه‌برداری ماهی سوکلا *R. canadum* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان

(۱- بوشهر ۲- بندردیر ۳- بندرلنگه ۴- بندرعباس ۵- پزم ۶- بریس)

جدول ۱: تعداد و پراکنش نمونه‌های جمع‌آوری شده از ماهی سوکلا *R. canadum* در زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸۶

استان (ناحیه)	نام صیدگاه (ایستگاه)	تعداد نمونه
بوشهر	۱- بوشهر	۳۹
	۲- بندر دیر	۲۲
هرمزگان	۳- بندرلنگه	۳۲
	٤- بندرعباس	٤۱
سیستان و بلوچستان	۵- پزم	۳۰
	٦- بریس	۲۰

برای انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از آغازگرها (۳۰ پیکومول) بعلاوه ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (۵u/µ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۸ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده، چند ثانیه سانتریفوژ و تیوب‌ها در ترموسایکلر قرار گرفتند. در اولین سیکل واسرشت سازی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و به

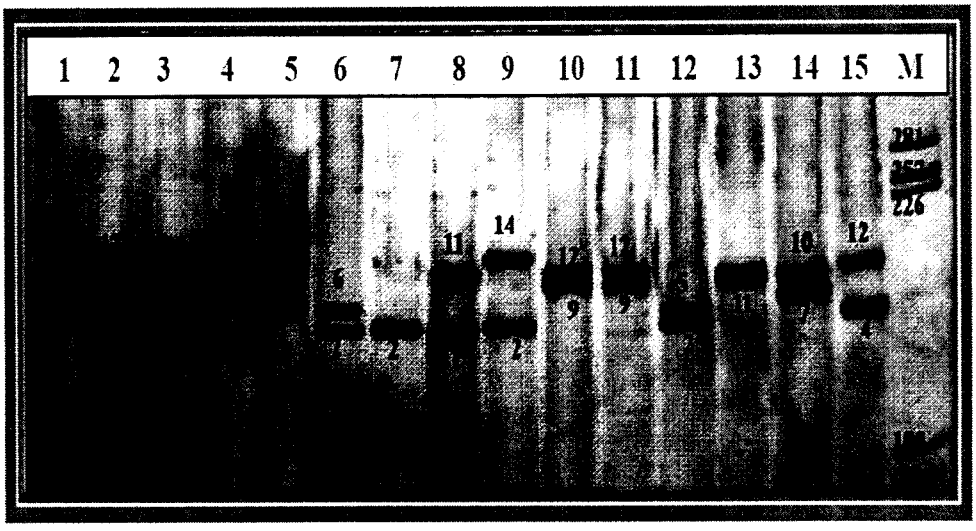
magiran.com

مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در سیکل دوم که شامل ۳ مرحله و ۳۰ بار تکرار است واسرشت سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در محدوده حرارتی ۵۵ تا ۶۶ و سپس مرحله سوم بسط پلی مراز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت. بسط نهایی رشته DNA در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با نشانگر DNApBR322 DNA/AluI Marker, 20, (MBI Fermentas بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد و با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره بدست آمد (Bassam *et al.*, 1991). جهت سنجش وزن مولکولی محصول PCR و امتیازدهی باندهای تصاویر ژل پلی‌اکریل‌آمید از نرم‌افزار LabImage version 3.3.3 و به منظور آنالیزهای آماری براساس آزمون AMOVA از نرم افزار Gene Alex version 6 استفاده شد (Peakall & Smouse, 2005). آنالیز خوشه‌ای فاصله ژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) با استفاده از نرم‌افزار MEGA version 4.0.2 ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2007).

نتایج

از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای بررسی شده در ماهی سوکلا، ۷ جفت آنها پلی‌مورف و ۳ جفت آنها مونومورف بوده است که جزئیات محاسباتی آن در جدول ۲ آورده شده است. براساس داده‌های فراوانی آللی جایگاههای مختلف ریزماهواره‌ای پلی‌مورفیک مشاهده می‌شود که حداکثر تعداد آللی در تمام مناطق نمونه‌برداری در جایگاه ژنی *Rca* 1B-H09 با ۱۸ آلل و حداقل آن در جایگاه ژنی پلی‌مورفیک *Rca* 1B-A10 و *Rca* 1B-E08A با ۱۴ آلل دیده می‌شود. در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۱۴/۲۸۶ آلل و کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بریس با ۱۰/۵۷۱ آلل می‌باشد. پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر *Rca* 1B-H09 ۶۰ درجه سانتیگراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعدادآلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۸ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۲۲۶-۱۵۰ جفت باز بود. در شکل ۲ اندازه آللی ۲۰۶-۱۵۰ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بریس نشان داده شده است.



شکل ۲: محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر *Rca* 1B- H09 متعلق به ۱۵ نمونه از منطقه بریس بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ و با وزن مولکولی ۲۰۶-۱۵۰ جفت باز که با نرم افزار Lab Image محاسبه گردیده است، اعداد مربوط به شماره آللی است که وزن مولکولی باندها را نشان می‌دهد. M: نشانگر مولکولی pBR322 DNA/AluI Marker, 20,

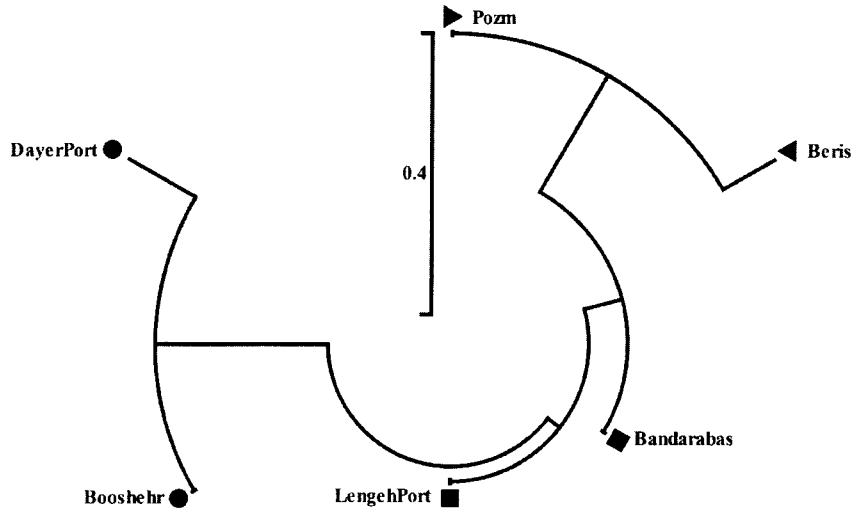
magiran.com

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) بین مناطق نمونه‌برداری در جایگاههای هفتگانه بین ۰/۱۵ تا ۱/۰۰ با میانگین ۰/۶۵۵±۰/۰۸۲ بود، بیشترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی *Rca* 1B-F07 و کمترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی *Rca* 1B-E08A در نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه بریس می‌باشد. دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) بین مناطق نمونه‌برداری در جایگاههای هفتگانه بین ۰/۷۶۷ تا ۰/۹۲۳ با میانگین ۰/۸۷۴±۰/۰۳۶ بود، بیشترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی *Rca* 1B-F07 در نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه بندرعباس و کمترین مقدار در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 مربوط به منطقه بندر لنگه می‌باشد.

در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در سطح لوکوس‌های مختلف، لوکوس‌های *Rca* 1B-A10، *Rca* 1B-E02، *Rca* 1B-E08A، *Rca* 1B-F07 و *Rca* 1B-H09 در تمامی مناطق مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی– واینبرگ را نشان داده و خارج از تعادل بودند ($P<0.05$) (جدول ۳).

جدول ۴ میزان F_{st} و R_{st} محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی (N_m) یا تعداد مهاجرت موثر میان جمعیت‌ها را بر اساس آزمون AMOVA نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده از F_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۶۳) بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است و حداقل F_{st} (۰/۰۰) بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندر لنگه که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴۶) می باشد مشاهده می‌شود. محاسبه F_{st} برحسب فراوانی نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۴۴) بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۵/۴۵) است و حداقل F_{st} (۰/۰۱) بر حسب فراوانی بین نمونه‌های بریس با نمونه‌های پزم که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۲۲/۳) می‌باشد، مشاهده می‌شود. نتایج بدست آمده از R_{st} حاکی از آن بوده که حداکثر آن (۰/۲۴۶) براساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۰/۷۷) و حداقل Rst (۰/۰۰) بین نمونه‌های بریس با نمونه‌های پزم که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴۶/۹۷) است مشاهده می‌شود.

براساس معیار Nei در سال ۱۹۷۸ بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۷۳۹) و کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۷۸) میان نمونه‌های مناطق دیر و بریس وجود دارد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲۸) و بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۷۲) میان نمونه‌های مناطق بندرعباس و بندرلنگه وجوددارد. شکل ۳ درخت فیلوژنی بدون ریشه حاصل از معیار Nei در سال ۱۹۷۸ را که براساس فاصله ژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) ترسیم گردیده را نشان می‌دهد.



شکل ۳: نمایش خوشه‌ای فاصله ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده ماهی سوکلا از مناطق مختلف به روش پیوند همجواری (NJ) و براساس معیار Nei (1978)

جدول ۲: توالی آغازگر، توالی تکراری، دمای اتصال برحسب درجه سانتیگراد (T_A)، تعداد چرخه، محدوده آللی (جفت باز)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_O)، تعداد آلل‌های موثر (N_E)، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) جایگاههای ریزماهواره‌ای بررسی شده در ماهی سوکلا

ردیف	لوکوس	توالی آغازگر (´۳-´۵)	توالی تکراری	T_A	چرخه	محدوده آللی	N_O	N_E	H_O	H_E
۱	*Rca* 1B-D09	CAGCCTGCTTAGCCTATCA GAAGGATGGACCACTTGTGAC	$(GT)_9(CTGT)_2(CT)_2(GT)_2$	۶۰	۳۵	۱۶۹	۱	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۲	*Rca* 1B-E08B	GCAGTTGATTCTGATTGCTACAC CTAATGCCAGCTCATTATGTCC	$(CA)_8GA(CA)_3$	۵۵	۳۰	۱۱۶	۱	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۳	*Rca* 1B-G10	GGAAACTCTATAACAGCATGTC GTAGACAGAGCAACACATGAG	$(CT)_5TT(CT)_4$	۶۲/۸	۳۰	۱۵۷	۱	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۴	*Rca* 1B-A10	GCAGCCCAATGCTAACAAGCC CATGTAGTCAAGCGAGCCACG	$(GTT)_6$	۶۱	۳۰	۱۵۹-۲۰۱	۱۱/۸۳۳	۷/۰۰۶	۰/۵۲۵	۰/۸۵۲
۵	*Rca* 1B-E02	GTGTTGCAGCCAAATGCTA CTCCCTAGTGCCACTACAGCTC	$(CT)_{18}$	۶۳	۳۰	۳۲۴-۲۸۸	۱۲	۹/۴۵۸	۰/۶۲۵	۰/۸۹۲
۶	*Rca* 1B-E08A	CATATCAAGTCAATATCACAGACC CCACGGAATAGCAGACTTTCTC	$(CA)_{13}GA(CA)_5A(CA)_{16}$	۶۳	۳۰	۲۳۱-۱۹۱	۱۱/۵۰۰	۸/۱۸۹	۰/۳۰۷	۰/۸۷۴
۷	*Rca* 1B-F06	CAAGCAAATGCGTGGCCGA CGTTAGCAACCACACGAGCTTG	$(CTAT)_{15}$	۵۸	۳۵	۳۱۶-۲۳۴	۱۰/۵۰۰	۶/۷۱۱	۰/۶۵۱	۰/۸۴۰
۸	*Rca* 1B-F07	GGAATCTGGTGGTGAGTCAT CTGTGGCTGAAGCGTGTGTT	$(GACA)_6(CA)_{12}$	۵۵	۳۰	۱۵۴-۱۱۴	۱۲/۶۶۷	۹/۴۶۴	۱/۰۰۰	۰/۸۸۸
۹	*Rca* 1B-H09	CATGTTATTCTCCAACTCATGG GTGTATCCGCATACTTTCAG	$(GATA)_{11}$	۶۰	۳۰	۲۲۶-۱۵۰	۱۴/۶۶۷	۱۰/۰۵۳	۰/۶۷۳	۰/۸۹۸
۱۰	*Rca* 1-A04	CACGCACATGCACTACTTTAACC GCTGTTGATGTGGCGAAGCAAC	$(CA)_9(CACT)_4$	۶۰	۳۰	۲۲۲-۱۸۴	۱۳/۳۳۳	۷/۳۵۶	۰/۸۰۸	۰/۸۵۶

magiran.com

magiran.com

جدول ۳: تعادل هاردی- واینبرگ در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره‌ای پلی‌مورفیک در ماهی سوکلا (*R. canadum*) برحسب مناطق مختلف نمونه‌برداری

منطقه	عوامل تعادل χ^2	A10	E02	E08A	F06	F07	H09	A04
۱- بوشهر	درجه آزادی	۷۸	۷۸	۷۸	۳۶	۷۸	۱۵۳	۹۱
	آزمون مربع کای	۲۰۸	۱۵۳	۲۷۲	۱۵۸	۱۸۱	۲۲۶	۱۸۲
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	***	***	***	***	***
۲- بندردیر	درجه آزادی	۲۸	۵۵	۳۶	۹۱	۶۶	۷۸	۶۶
	آزمون مربع کای	۱۰۵	۱۲۰	۱۰۳	۱۵۲	۱۳۲	۱۷۲	۱۱۶
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی دار بودن	***	***	***	***	***	***	***
۳- بندرلنگه	درجه آزادی	۹۱	۶۶	۷۸	۲۸	۱۲۰	۱۲۰	۱۰۵
	آزمون مربع کای	۲۱۰	۱۲۰	۲۴۸	۹۹	۱۸۴	۱۵۷	۲۵۶
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	***	***	***	*	***
۴- بندرعباس	درجه آزادی	۹۱	۶۶	۷۸	۱۰۵	۱۲۰	۱۰۵	۱۰۵
	آزمون مربع کای	۲۷۵	۱۵۴	۲۸۷	۲۴۸	۲۴۲	۱۳۶	۳۴۹
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	***	***	***	*	***
۵- پزم	درجه آزادی	۵۵	۷۸	۵۵	۲۸	۵۵	۷۸	۶۶
	آزمون مربع کای	۱۰۰	۱۰۹	۱۶۸	۳۶	۱۰۲	۸۲	۹۱
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰	۰/۱۳۷	۰/۰۰۰	۰/۳۴۸	۰/۰۲۲
	معنی دار بودن	***	*	***	ns	***	ns	*
۶- بریس	درجه آزادی	۵۵	۵۵	۴۵	۳۶	۲۸	۷۸	۶۶
	آزمون مربع کای	۱۰۹	۹۴	۱۴۹	۶۷	۵۱	۱۱۶	۷۷
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴	۰/۱۷۵
	معنی دار بودن	***	***	***	**	**	**	ns

*، ** و *** : بترتیب معنی‌داری با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد، ۱ درصد و ۰/۱ درصد را نشان می‌دهند.

ns: اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد غیر معنی‌دار است ($P<0.05$).

magiran.com

جدول ٤: آنالیز تنوع ژنتیکی میان جفت جمعیت‌ها برای مناطق مختلف نمونه‌برداری و براساس تمام جایگاهها (اعداد بالای ماتریکس میزان R_{st}، اعداد زیر ماتریکس میزان F_{st} و اعداد داخل پرانتز میزان جریان ژنی را براساس آزمون AMOVA نشان می‌دهند).

منطقه	بوشهر	بندر دیر	بندر لنگه	بندرعباس	پزم	بریس
بوشهر	۰/۰۰۰	۰/۰٤۰	۰/۷۲۰*	۰/۱۱٤*	۰/۱۳۹*	۰/۱٥٦*
بندر دیر	۰/۰۰۲ (۱۰۸)	۰/۰۰۰	۰/۱۰۰*	۰/۱۲۲*	۰/۲٤٥*	۰/۲٤٦*
بندر لنگه	۰/۰۱۷ (۱٤/۲)	۰/۰۳۲ (۷/٥)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰٦٥*	۰/۰۸٤*
بندرعباس	۰/۰۲۱ (۱۱/۹)	۰/۰۲۹ (۸/٥)	۰/۰۰۰ (۳٤٦)	۰/۰۰۰	۰/۰۷۳*	۰/۰٦۱
پزم	۰/۰٤٤ (٥/٥)	۰/۰٦۳ (۳/۷)	۰/۰۱٤ (۱۷)	۰/۰۱٥ (۱٦/۱)	۰/۰۰۰	۰/۰۰٥
بریس	۰/۰٤۷ (٥)	۰/۰٦۲ (۳/۸)	۰/۰۲٦ (۹/۳)	۰/۰۱٥ (۱٦/٤)	۰/۰۰۱ (۲۰٤)	۰/۰۰۰

F_{st} درجه تمایز ژنتیکی میان دو جمعیت؛ R_{st} درجه تمایز ژنتیکی میان دو جمعیت براساس جایگاههای ریزماهواره؛ * : معنی‌داری با احتمال خطای کمتر از ۱ درصد را نشان می‌دهند ($P < 0.01$).

بحث

Herwerden و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus*) تعداد ۱۷۳ نمونه، Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا با استفاده از روش ریزماهواره در خلیج مکزیک تعداد ۴۲ نمونه، Renshaw و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی ماهی سوکلا با استفاده از روش ریزماهواره تعداد ۲۴ نمونه و Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی ریزماهواره‌ای تنوع ژنتیکی تاسماهی چینی در رودخانه یانگ تسه ۶۰ نمونه ماهی را جمع‌آوری کردند. در بررسی حاضر با توجه به میزان کم صید ماهی، بزرگی جثه و دشواری دسترسی به نمونه‌های بیشتر در کل تعداد ۱۸۴ نمونه ماهی سوکلا از سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج آماری و معنی‌دار بودن آن و مقایسه با کارهای دیگران که ذکر گردید قابل قبول بوده و بنظر می‌رسد که نمونه جمع‌آوری شده متناسب با تعداد پیشنهادی برای بررسی‌های ژنتیکی می‌باشد.

در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۱۴/۲۸۶ آلل و کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بریس با ۱۰/۵۷۱ آلل می‌باشد. همچنین بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۹/۷۴۰ آلل و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه دیر با ۷/۰۵۹ آلل می‌باشد که علت این پدیده احتمالا به خاطر زیادتر بودن نمونه‌ها (۴۱)، جریان ژنی بالا و برون زادآوری، عدم تخریب زیستگاههای طبیعی منطقه بندرعباس نسبت به بریس چابهار و منطقه دیر می‌باشد که با گذشت زمان موجب افزایش آلل و افزایش تنوع ژنتیکی در ذخایر منطقه بندرعباس گردیده است. میزان جریان ژنی (Nm) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر طی یک نسل اطلاق می‌شود؛ هرچه میزان جریان ژنی (Nm) بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که

magiran.com

مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و در نتیجه تنوع ژنتیکی بالاتر ولی تمایز ژنتیکی میان مناطق مزبور کمتر است.

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۷۰۱) در نمونه‌های ناحیه هرمزگان (مناطق بندرعباس و بندرلنگه) دیده شد که نشانه بالا بودن تنوع و مناسب بودن ساختار جمعیت در این ناحیه نسبت به جمعیت‌های سایر نواحی نمونه‌برداری است. می‌توان علت آنرا به فرصت بیشتر برای تکثیر طبیعی، بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی، عدم تخریب زیستگاههای طبیعی، بالا بودن میزان جریان ژنی (Nm)، برون زادآوری و غیره تفسیر نمود. کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های مناطق بریس چابهار (۰/۵۸۶) و بندر دیر (۰/۶۲۳) دیده شد که علت آن در بریس چابهار عدم بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی و احتمالاً پایین بودن میزان جریان ژنی (Nm) و در بندر دیر تخریب زیستگاههای طبیعی ناشی از توسعه پارس جنوبی و تأسیسات عسلویه است.

Dewoody و Advise در سال ۲۰۰۰ میانگین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در ماهیان دریایی ۰/۷۹، ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ و ماهیان آنادراموس رقمی بینابین ماهیان دریایی و آب شیرین ۰/۶۸ گزارش کردند. در بررسی حاضر میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۵۵ کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان دریایی ۰/۷۹ می‌باشد که علل آن احتمالاً به دلیل جریان ژنی پایین، آمیزش‌های خویشاوندی و تنگناهای ژنتیکی به واسطه افزایش میزان فشار صید، تخریب زیستگاه، اندازه کوچک جمعیت، نمونه‌برداری افراد خویشاوند از یک گله و غیره می‌باشد.

جریان ژنی بین نمونه‌های مناطق خلیج فارس با یکدیگر و دریای عمان با یکدیگر بالاتر از جریان ژنی بین نمونه‌های مناطق خلیج فارس و دریای عمان با هم دیگر است. علت چنین امری را می‌توان به عوامل زیست محیطی مختلفی از جمله تفاوت درجه حرارت، شوری، مواد مغذی و جریانات دریایی بین زیستگاههای مختلف در شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان نسبت داد. بنابراین تفاوت عوامل زیست محیطی موجود بین زیستگاههای شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان موجب محدود شدن جریان ژنی بین آنها و ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود.

میزان R_{st} براساس آزمون AMOVA بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه‌برداری غیرمعنی‌دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی‌دار بود ($P<0.01$) یا بعبارتی میزان R_{st} با احتمال ۹۹ درصد ($P<0.01$) اختلاف معنی‌داری بین جمعیت ماهی سوکلای منطقه بوشهر با کلیه مناطق بغیر از منطقه دیر نشان می‌دهد و جمعیت ماهی سوکلای منطقه بندرعباس نیز با احتمال ۹۹ درصد ($P<0.01$) اختلاف معنی‌داری را با کلیه مناطق بغیر از منطقه بندر لنگه نشان می‌دهد. همچنین جمعیت ماهی سوکلای منطقه بریس با احتمال ۹۹ درصد ($P<0.01$) اختلاف معنی‌داری را با کلیه مناطق بغیر از منطقه پزم نشان می‌دهد. با توجه به درجه تمایز ژنتیکی میان دو جمعیت براساس جایگاههای ریزماهواره یا مقادیر F_{st} و R_{st} میان مناطق مختلف نمونه‌برداری می‌توان جمع‌بندی نمود که ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزا است که شامل جمعیت بوشهر، جمعیت هرمزگان و جمعیت چابهار می‌باشد.

این مطالعه مدارک و شواهد اولیه را برای وجود جمعیت‌های متمایز نشان می‌دهد و با توجه به برنامه در دست اقدام شیلات ایران در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی سوکلا در سواحل جنوبی ایران بهتر است برای مدیریت این ذخایر، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود. اگر برنامه‌های مدیریتی ذخیره‌سازی تمامیت ژنتیکی افراد را در برداشته باشند در این صورت جمعیت حفظ می‌شود، اما استفاده از افراد سایر جمعیت‌ها ممکن است تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها را به خطر بیاندازند؛ افراد باقیمانده از یک جمعیت باید به شدت محافظت شوند و برای حفاظت در هنگام گرفتن ژن باید از تعداد زیاد مولدین استفاده کرد و هنگامی می‌توان از جمعیت‌های این گونه محافظت کرد که در مدیریت به ساختار جمعیت محلی شامل برنامه‌های دقیق ذخیره‌سازی و مشکلاتی مانند کاهش زیستگاهها و صید بی رویه توجه شود.

با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش فرض‌های معلوم می‌توان جمع‌بندی کرد که نشانگرهای ریزماهواره‌ای ابزار بسیار توانمندی برای بررسی تنوع درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت‌ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی می‌باشند و برتری‌های انکار ناپذیری را در این رابطه دارا

magiran.com

می‌باشند و توصیه می‌گردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت سایر گونه‌ها این روش مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به تشخیص ۳ جمعیت مجزای ماهی سوکلای بوشهر، هرمزگان و چابهار در خلیج فارس و دریای عمان پیشنهاد می‌گردد که اختلافات این گونه در نواحی مختلف جمعیتی از نظر شرایط اکولوژیک و بیولوژی تولید مثل، زمان تخمریزی، محل تخمریزی و غیره مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس فرامرز لالوئی و آقای مهندس محمد جواد تقوی کارشناسان بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که ما را در تمام لحظات اجرای این پروژه یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

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.

Bassam B.J., Caetano-Anolles G. and Gresshoff P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochemistry, 196:80–83.

Dewoody J.A. and Avise J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadramous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 56:461-473.

Ditty J.G. and Shaw R.F., 1992. Larval development, distribution, and ecology of cobia *Rachycentron canadum* (Family: Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. Fishery Bulletin, 90:668–677.

Herwerden L., Benzie J. and Davies C., 2003. Microsatellite variation and population genetic structure of the red throat emperor on the Great Barrier Reef. Journal of Fish Biology, 62:987-999.

Hillis D.M. and Moritz C., 1990. Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sanderland, Massachusetts, U.S.A. 120P.

Hoelzel A.R. and Dover G.A., 1991. Molecular genetic ecology. Oxford University Press. New York, USA. 270P.

Lu C.C., 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan. Phuket Marine Biological Center Special Publication. Vol. 18, No. 2, pp.331-340.

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

Peakall M. and Smouse A., 2005. Gene Alex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia.

Pruett C.L., Saillant E., Renshaw M.A., Patton J.C., Rexroad C.E. and Gold J.R., 2005. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies and parentage assignment in cobia, *Rachycentron canadum*. Molecular Ecology Notes, 5:84–86.

Renshaw M.A., Saillant E., Pruett C.L., Rexroad C.E. and Gold J.R., 2005. Microsatellite markers for cobia, *Rachycentron canadum*. Gulf of Mexico Science, 23:248-254.

Rezvani Gilkolaei S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. School of biological sciences, university of Wales, Swansea. U.K. 196P.

Ryman N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. Journal of Fish Biology, 39:211-224.

magiran.com

Shaffer R.V. and Nakamura E.L., 1989. Synopsis of biological data on the Cobia, *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA technical report NMFS 82, FAO fisheries synopsis, 153, 21P.

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24:1596-1599.

Turner J.P. and Rooker J.R., 2005. Effect of dietary fatty acids on the body tissues of larval and juvenile cobia and their prey. Journal of Experiment Marine Biology and Ecology, 322:13-27.

Valinassab T., Daryanabard R., Dehghani R. and Pierce G.J., 2006. Abundance of demersal fish resources in the Persian Gulf and Oman Sea. Journal of the Marine Biology Association. U.K., 86:1455-1462.

Zhao N., Shao Z., Ai W., Zhou B., Brosse S. and Chang J., 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. Journal of Applied Ichthyology, 21: 7-13.

magiran.com

Investigation on genetic structure of Cobia (*Rachycentron canadum*) using Microsatellite Markers

Rezvani Gilkolaei S.[1]*; Salari Aliabadi M.A.[2]; Savari A.[3]; Zolgharnian H.[4] and Nabavi S.M.B.[5]

1- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box:14155-6116, Tehran, Iran

2,3,4,5- Marine Science and Technology of Khorramshahr University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran

Received: June 2008 Accepted: September 2009

Keywords: *Rachycentron canadum*, Microsatellite, Persian Gulf, Oman Sea

Abstract

The genetic diversity of Cobia, *Rachycentron canadum* populations in the Persian Gulf and Oman Sea were assessed using microsatellite technique. We removed about 3-5g of pectoral and dorsal fin tissue from 184 samples in winter 2006 and spring 2007, and stored it in pure ethylic alcohol (96%). Polymerase chain reactions (PCR) were conducted on the target DNA using 10 paired microsatellite primers. The dendrogram was constructed and drawn using MEGA software package version 4. Based on the analysis of molecular variance, the highest F_{st} (0.063) was observed when comparing specimens from Dayer Port and Pozm zones. Significant differences ($P<0.01$) were not observed between R_{st} recorded for the specimens studied in the same region but were observed between R_{st} recorded for different regions. The dendrogram of genetic distance showed two major clusters: the Bushehr and Dayer populations were in one cluster, and the remaining four populations in the other. The second cluster was further separated into two sub-clusters: the Lengeh and Bandar Abbas populations composed one cluster and the Pozm and the Beris populations were in the other cluster. The present study showed that at least three different populations of *R. canadum* are living in the Persian Gulf and Oman Sea. The populations include Bushehr, Bandar Abbas and Chabahar populations.

* Corresponding author: Rezvani@ifro.ir