CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

magiran.com

بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA (PCR-RFLP)

فرامرز لالوئی[۱]*؛ سهراب رضوانی گیل‌کلائی[۲]؛ سید محمد رضا فاطمی[۳] و محمد جواد تقوی[۴]

Laloei@yahoo.com

۱و۴ - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶- ۱۴۱۵۵

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۷

چکیده

به منظور تعیین ساختار ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تعداد ۲۶۰ نمونه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از نواحی غربی، میانی و شرقی (سواحل استانهای گیلان، مازندران و گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر، تالاب انزلی، رودخانه تجن، گرگانرود و خلیج گرگان جمع‌آوری گردید. استخراج DNA با بهینه‌سازی روش فنل – کلروفرم انجام شد، بطوریکه غلظت آن در کلیه نمونه‌ها ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بود. واکنش PCR با استفاده از دو جفت پرایمر از چینش نوکلئوتیدهای ژن ND-5/6 و ND-3/4 مولکول mtDNA انجام و جهت هضم آنزیمی محصولات PCR از ۱۵ آنزیم محدودکننده استفاده شد. پس از هضم آنزیمی، با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد، کلیه نمونه‌ها همراه با مارکر ۱۰۰pb DNA الکتروفورز و الگوهای هضم آنزیمی محصول PCR با رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردیدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها و آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار Reap انجام شد.

الگوهای هضم آنزیمی با آنزیمهای محدودکننده، در مجموع ۱۴ و ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت را بترتیب برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 نشان داد. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها ۰/۵۹ و ۰/۴۸ و میانگین تنوع نوکلئوتیدها ۰/۰۶ و ۰/۰۳ بترتیب برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 در مناطق نمونه‌برداری بود. همچنین میانگین اختلاف نوکلئوتیدی برای این دو ژن بترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۲ درصد بدست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ارزیابی دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 نشان داد که نمونه‌های سواحل استان گیلان با تالاب انزلی، سواحل استان گیلان با سواحل استان گلستان و رودخانه تجن با گرگانرود از لحاظ فراوانی هاپلوتیپ دارای اختلاف معنی‌دار بوده است ($P\leq 0/05$). با توجه به نتایج بدست آمده و وجود تفاوت ژنتیکی معنی‌دار بین نمونه‌ها، می‌توان عنوان نمود که جمعیت یکسانی از کپور معمولی در مناطق مورد بررسی وجود نداشته و بطور کلی سه گروه ژنتیکی از این گونه شناسایی شدند.

لغات کلیدی: تنوع ژنتیکی، کپور معمولی، *Cyprinus carpio*، دریای خزر، ایران

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

مقدمه

کپور ماهیان یکی از خانواده‌های مهم ماهیان می‌باشند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش یافته‌اند (Kirpichnikov, 1972). ماهی کپور معمولی با نام علمی *Cyprinus carpio* ابتدا بومی آسیای مرکزی بوده که طی قرنهای متمادی در نواحی مختلف جهان گسترش پیدا کرده است (Kohlman *et al.*,2003).

ماهی کپور از ماهیان اقتصادی دریای خزر است که در اکثر رودخانه‌های حوضه جنوبی، تالابها و خلیجها وجود دارد. براساس آمار موجود صید ماهی کپور در دهه گذشته دارای نوساناتی بوده است. در مدت ۱۰ سال، حداقل صید۲۲۲ تن در سال ۱۳۸۱ و حداکثر آن ۳۹۲۴ تن در سال ۱۳۸۴ بوده است (دریانبرد و همکاران، ۱۳۸۶).

تنوع ژنتیکی آبزیان یکی از شاخصهای مهم شرایط اکولوژیک منابع آبی می‌باشد (Zhou *et al.*, 2003). کاهش تنوع ژنتیکی برای جمعیتها زیان بار بوده و بر میزان برداشت آنها تاثیرگذار می‌باشد.

در مطالعات گذشته، ژنتیک جمعیت‌های کپور معمولی با استفاده از مارکرهای پروتئینی مورد مطالعه قرار گرفته است. در این رابطه مطالعات جمعیت‌های اهلی و وحشی کپور در ژاپن (Macaranas *et al.*, 1986)، در ایتالیا (Cataudella *et al.*, 1987)، اندونزی (Sumantadinata & Taniguchi, 1990)، مجارستان (Csizmadia *et al.*, 1995)، فرانسه (Desvignes *et al.*, 2001) صورت گرفت، سپس مطالعات mt DNA (Froufe *et al.*, 2002 ; Davis *et al.*, 1999)، RAPD (Bartfai *et al.*, 2003) و بعد از آن مارکرهای مایکروساتلیت‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Tanck *et al.*, 2001).

Kohlman و همکاران در سال ۲۰۰۳، ذخایر بومی و جمعیت‌های طبیعی کپور معمولی اروپا، آسیای مرکزی، آسیای شرقی و جنوب شرقی را با روشهای مختلف مورد مطالعه قرار داده‌اند. در این مطالعه ۲۳ جمعیت با استفاده از روش آلوزایم، ۱۱جمعیت با ریزماهواره‌ها و ۲۱ جمعیت با استفاده از mtDNA مورد بررسی قرار گرفت.

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۳، تنوع ژنتیکی بین *Cyprinus carpio carpio* و *C.c.haematopterus* را با استفاده از آنالیز mt DNA در نواحی از اروپا مورد مطالعه قرار داده و با استفاده از چینش نوکلئوتیدهای نواحی D-loop و ND-5/6 و آنالیز RFLP تفاوتهای ژنتیکی بین زیر گونه اروپایی و آسیایی را مشخص نمودند.

در مطالعات دیگر، Lehoczky و همکاران در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی کپور معمولی را با استفاده از ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 میتوکندری و آنالیز PCR-RFLP و همچنین ۴ لکوس ریزماهواره‌ای مطالعه نمودند. در این بررسی برای ژن ND-5/6، ۴ آنزیم محدودکننده و برای ژن ND-5/6، ۲ آنزیم محدودکننده بکار بردند که پلی‌مورفیسمی را نشان ندادند. اما داده‌های مربوط به ریزماهواره‌ها (۴ لکوس) اختلاف معنی‌داری را در تعداد آللها نشان داد.

Thai و همکاران در سالهای ۲۰۰۴ و ۲۰۰۶) مطالعاتی را درخصوص تنوع ژنتیکی کپور معمولی در ویتنام با استفاده از آنالیز SSCP ناحیه کنترلی mt DNA انجام دادند. در این بررسی‌ها ۲۰ نژاد یا جمعیت کپور معمولی در ویتنام با استفاده از روش ترکیبی از توالی مستقیم DNA و تجزیه و تحلیل SSCP شناسایی گردید.

علاوه بر موارد فوق مطالعات متعددی با روش PCR-RFLP در ایران از جمله بر روی کیلکا ماهیان (لالوئی و همکاران، ۱۳۸۵)، ماهی کلمه (Rezvani *et al.*, 2007)، سس ماهی بزرگ سر (لالوئی و همکاران، ۱۳۸۲) انجام شده است.

کاهش صید ماهی کپور معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر در دهه‌های گذشته، باعث گردید که اداره کل شیلات ایران با صید مولدین از رودخانه‌های منتهی به دریای خزر از سال ۱۳۷۷ تکثیر نیمه مصنوعی و رهاسازی این گونه (۲۳/۹۴ میلیون عدد) را به دریا در دستور کار خود قرار دهد (غنی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۱). بدنبال تکثیر مصنوعی ماهی کپور، این سئوال مطرح شد، آیا این گونه که در تمام طول سواحل ایرانی دریای خزر صید می‌شود، متعلق به یک جمعیت است؟ و اگر جمعیت‌های متفاوت وجود دارند،کدام جمعیت بیشتر از سایرین از لحاظ تنوع ژنتیکی و فراوانی ذخایر آسیب دیده است. هدف اصلی از انجام این تحقیق شناسایی جمعیت‌های احتمالی ماهی کپور معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر می‌باشد. همچنین فرضیه این بررسی آن است که دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 قادرند تنوع ژنتیکی را در بین نمونه‌های مختلف کپور در نوار ساحلی سه استان شمالی کشور آشکار سازند و میزان آن در نواحی مختلف، متفاوت می‌باشد.

magiran.com

مواد و روش کار

نمونه‌برداری از ماهی کپور معمولی از دریا با روش صید پره از سواحل استان گیلان ۴۰ نمونه (منطقه ساحل غازیان)، سواحل استان مازندران ۴۰ نمونه (منطقه لاریم و چپکرود) و سواحل استان گلستان ۳۰ نمونه (منطقه گمیشان) انجام گردیده است. همچنین ۴۰ نمونه از رودخانه تجن، ۴۰ نمونه از گرگانرود، ۳۰ نمونه از خلیج گرگان و ۴۰ نمونه از تالاب انزلی با دام گوشگیر صید گردید. کلیه نمونه‌ها در سنین حدود ۲ تا ۳ سال و بالغ بودند. از هر نمونه مقدار ۱ تا۲ گرم بافت باله دمی جمع‌آوری و در اتانل ۹۵ درصد نگهداری و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید.

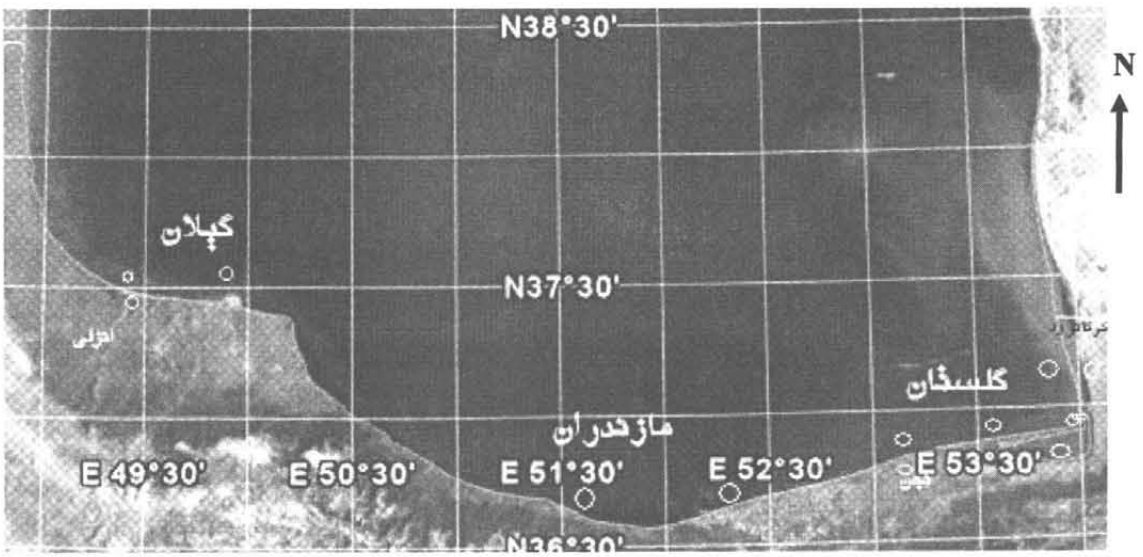
استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل - کلروفرم از بافت باله ماهیان انجام (Fevolden & Pogson, 1997) و بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده توسط دستگاه بیوفتومتر (مدل اپندورف) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت.

واکنش PCR جهت تکثیر ژن ND-3\4 و ND-5\6 مولکول mtDNA با دو جفت پرایمر طبق روش (Gross *et al.*, 2002) انجام گردید. توالی نوکلئوتیدهای پرایمرها بشرح ذیل بود:

(ND – 3/4)

Forward primer : 5´- AAA GTT AGT ACA AGT GAC TTC CAA- 3´

Reverse primer : 5´- TTT TGG TTC CTA AGA CCA ACG GAT - 3´



شکل ۱: محلهای نمونه‌برداری از ماهی کپور معمولی حوضه جنوبی دریای خزر

Forward primer : 5´- AAA GTT AGT ACA AGT GAC TTC CAA- 3´

Reverse primer : 5´- TTT TGG TTC CTA AGA CCA ACG GAT - 3´

(ND – 5/6)

Forward primer: 5´– AAC AGT TCA TCC GTT GGT CTT AGG - 3´

Reverse primer: 5´- TAA CAA CGG TGG TTC TTC AAG TCA - 3´

PCR با استفاده از dNTP با غلظت ۲mM، ۱ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase*، $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM، ۱۰ng از هر پرایمر، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA نمونه، بافر PCR و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول به ۵۰ µl برسد، انجام شد.

magiran.com

برنامه دستگاه ترمال سایکلر(مدل Auto-Q شرکت Quanta biotech) بترتیب: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) ۵۸ و ۵۳ درجه سانتیگراد برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم بسط پرایمر(Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ چرخه تنظیم گردید.

محصول PCR (۸-۷ µl) با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر ۱۰۰ bp DNA، مشاهده گردید.

هضم آنزیمی محصول PCR نمونه‌ها (جهت آنالیز RFLP) با استفاده از ۱۵ آنزیم قطع کننده محدود شامل *MaeI ،Hha I ،Hinf I ،BsuR I ،Hpa II ،Taq I ،Mbo I ،Alu I ،Hin 6I ،Dpn I ،Tha I ،Eco 47I ،Ava II ،Xba I* و *Rsa I* انجام شد. برای این منظور مقدار ۵µl -۳ محصول PCR، ۱ µl آنزیم قطع کننده محدود و ۲ µl بافر آنزیم با حجم نهائی ۲۰ µl بمدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ قرار گرفت. الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر bp DNA ۵۰ مشخص گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Reap انجام گردید (Roff & Bebtzen, 1989).

نتایج

در این بررسی ۲۶۰ نمونه باله ماهی کپور معمولی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. غلظت DNA کلیه نمونه‌ها ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بود که با توجه به نتایج الکتروفورز ژل آگارز از کیفیت مناسبی برخوردار بودند. پس از استخراج DNA، ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 ژنوم میتوکندریایی با استفاده از پرایمرهای ساخته شده، با واکنش PCR تکثیر یافت. طول قطعه تکثیر شده در کلیه نمونه‌ها با استفاده از نشانگر ۱۰۰ bp DNA برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 بترتیب ۲۴۰۰ و ۲۶۰۰ جفت باز بدست آمد (جداول ۱و۲). محصول PCR ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 توسط ۱۵ آنزیم قطع کننده محدود مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که از این تعداد آنزیم، ۶ آنزیم (*Alu I , BsuRI , Hpa II* و *Eco 47I , Rsa I , Hinf I*) برای ژن ND-3\4 و ۷ آنزیم (*Hpa II , Mbo I , Bsu I , Hinf , Rsa I Alu I*, و *Eco47I*) برای ژن ND-5/6 الگوی نواری چند ریختی را نشان دادند. در مورد سایر آنزیمها الگوهای تک ریختی مشاهده گردید. الگوهای هضم آنزیمی محدود کننده، مجموعاً ۱۴ و۱۲ هاپلوتیپ متفاوت را برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۱: تعداد و طول قطعات (bp) حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن ND3/4 در ماهی کپور معمولی حوضه‌جنوبی دریای خزر

آنزیم	*HpaII*			*AluI*			*HinfI*			*BsuRI*			*Eco47I*			*Rsa I*		
ژنوتیپ	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A
طول قطعات (bp)	۲۲۵	۲۰۳	۱۷۵	۱۵۰	۲۲۵	۱۹۰	۱۴۵	۱۰۰	۵۵	۸۵	۱۱۰	۷۰	۲۴۵	۵۰۰	۲۰۶	۲۸۰	۲۸۰	۱۵۵
	۳۹۵	۲۳۰	۲۲۵	۱۶۰	۲۳۵	۴۹۵	۱۵۵	۱۱۰	۱۰۰	۶۵۵	۱۴۵	۹۵	۳۲۰	۹۰۰	۳۱۰	۴۲۰	۵۰۰	۲۸۰
	۴۰۰	۳۷۵	۳۲۰	۱۹۰	۵۳۰	۵۰۵	۱۸۰	۱۴۵	۱۵۵	۷۱۰	۲۴۵	۲۴۰	۴۹۵	۱۰۰۰	۱۸۸۴	۷۵۰	۷۲۰	۴۰۰
	۴۵۰	۴۰۷	۳۶۰	۲۵۰	۶۱۰	۵۱۰	۲۵۰	۱۵۵	۵۱۰	۹۵۰	۳۳۵	۲۹۵	۶۰۰			۹۵۰	۹۰۰	۷۴۵
	۹۳۰	۱۱۸۵	۳۸۵	۳۵۰	۸۰۰	۷۰۰	۳۸۰	۶۸۰	۶۰۰		۴۰۰	۳۱۵	۷۴۰					۸۲۰
			۳۹۵	۴۰۰			۴۶۰	۱۲۱۰	۹۸۰		۴۷۵	۱۳۸۵						
			۵۴۰	۹۰۰			۸۳۰				۶۹۰							
جحم	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰

magiran.com

جدول ۲: تعداد و طول قطعات (bp) حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن ND5/6 در ماهی کپور معمولی حوضه جنوبی دریای خزر

آنزیم	*MboI*		*HpaII*		*BsuI*		*AluI*		*HinfI*		*Eco47I*		*RsaI*	
ژنوتیپ	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
طول قطعات (bp)	۲۵۰	۲۰۰	۳۰۰	۲۸۵	۲۵۰	۲۲۵	۸۰	۱۲۰	۸۰	۱۴۵	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
	۱۰۰۰	۲۶۰	۸۰۰	۳۱۰	۳۷۵	۲۷۵	۹۰	۱۴۵	۱۵۰	۲۶۵	۷۰۰	۸۰۰	۸۵۰	۱۰۰۰
	۱۳۵۰	۶۱۰	۱۵۰۰	۵۹۰	۱۹۷۵	۲۱۰۰	۱۱۰	۱۹۵	۱۶۰	۵۰۰	۱۶۵۰	۱۳۰۰	۱۵۰۰	۱۱۰۰
		۷۳۰		۶۳۵			۱۷۰	۲۰۰	۱۷۰	۵۹۰				
		۸۰۰		۷۸۰			۱۹۰	۴۹۰	۱۹۰	۱۱۰۰				
							۲۰۰	۶۵۰	۲۹۰					
							۴۰۰	۸۰۰	۳۰۰					
							۱۲۲۵		۳۵۰					
									۴۰۰					
									۵۱۰					
جمع	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰	۲۶۰۰

براساس نتایج بدست آمده بیشترین فاصله تکاملی در ژن ND-3/4 بین هاپلوتیپ BBBBBB با AACCCA (۰/۲۴) و کمترین فاصله تکاملی بین هاپلوتیپ‌های BBBBBA با BBBBBB (۰/۰۲) بود. در ژن ND-5/6، بیشترین و کمترین فاصله تکاملی بترتیب بین هاپلوتیپ BBBAABB با AAABBAA (۰/۳۲) و ABAAAAA با ABAABAA (۰/۰۲) بوده است.

بیشترین تنوع هاپلوتیپها برای ژن ND-3/4 مربوط به نمونه‌های تالاب انزلی (۰/۷۷) و کمترین تنوع مربوط به نمونه‌های خلیج گرگان (۰/۴۵) بود (جدول ۴). ضمن اینکه بیشترین تنوع نوکلئوتیدی و کمترین مقدار آن بترتیب مربوط به مناطق تالاب انزلی (۰/۰۱) و گرگانرود (۰/۰۴) بود. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها در مناطق نمونه‌برداری ۰/۵۹ و میانگین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۶ بود. علاوه براین اختلاف نوکلئوتیدی در ژن ND-3/4، ۰/۴۸درصد بود.

در ژن ND-5/6 بیشترین و کمترین تنوع هاپلوتیپها بترتیب مربوط به نمونه‌های تالاب انزلی (۰/۷۸) و خلیج گرگان (۰/۳۱) و همچنین بیشترین و کمترین تنوع نوکلئوتیدی در مناطق تالاب انزلی (۰/۰۶) و گرگانرود (۰/۰۲) بود. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها در کل مناطق نمونه‌برداری ۰/۴۸ و میانگین تنوع نوکلئوتیدها ۰/۰۳ بود. در این ژن اختلاف نوکلئوتیدی ۰/۰۲ درصد بوده است.

مقادیر تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپ‌ها در ژن ND-3/4 نسبت به ژن ND-5/6 در تمام مناطق نمونه برداری بیشتر است (جدول ۴). اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌های گرگانرود و تالاب انزلی بیشترین مقدار (۲/۵ درصد) و بین گرگانرود و خلیج گرگان کمترین مقدار (۰/۰۳ درصد) بود (جدول ۵).

طبق نتایج جدول ۶ و با توجه به داده‌های حاصل از ارزیابی دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 نمونه‌های سواحل استان گیلان با نمونه‌های سواحل استان مازندران از لحاظ فراوانی هاپلوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$). همچنین نمونه‌های سواحل استان مازندران با نمونه‌های جمع‌آوری شده در محدوده دریا واقع در استان گیلان اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0/05$). نکته جالب توجه اینکه نمونه‌های بررسی شده حاصل از جمع‌آوری در دریا در منطقه گمیشان با نمونه‌های جمع‌آوری شده از خلیج گرگان و حتی رودخانه گرگان اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P>0/05$). همچنین ارزیابی داده‌های حاصل از این دو ژن نیز نشان داده که نمونه‌های استان گیلان در محدوده دریا با نمونه‌های استان گلستان از لحاظ فراوانی هاپلوتیپ اختلاف معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). علاوه بر این اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های جمع‌آوری شده در محدوده دریا واقع در استان گیلان با نمونه‌های تالاب انزلی مشاهده شده است ($P<0/05$). ضمن اینکه فراوانی هاپلوتیپ‌ها بین نمونه‌های رودخانه تجن با نمونه‌های گرگانرود نیز معنی‌دار بود ($P<0/05$). این نتایج نشان می‌دهد که ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 قادرند نمونه‌های سواحل استان گیلان با گلستان و نمونه‌های رودخانه تجن با گرگانرود را از لحاظ ژنتیکی تفکیک نمایند.

magiran.com

جدول ۳: توزیع و فراوانی هاپلوتیپ‌های حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR در ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 کپور معمولی به تفکیک مناطق نمونه‌برداری

ژن	هاپلوتیپ	محدوده استان گیلان (دریا)	تالاب انزلی	محدوده استان مازندران (دریا)	رودخانه تجن	محدوده استان گلستان (دریا)	خلیج گرگان	گرگانرود
ND 3/4	AAAAAA	۲۹	۱۶	۲۵	۲۵	۱۸	۲۳	۲۹
	CCBBAA	۲	۴	۱	–	–	۱	–
	CABBAB	۳	۲	۱	۱	۱	–	–
	BBBBBB	۵	۱۰	۲	۱	۲	۲	۱
	CCABAA	–	۳	–	–	–	–	–
	BAAAAA	–	۲	۱	–	۲	–	–
	BBBBBA	۱	۲	–	–	–	–	–
	AACCAB	–	–	۱	۴	۱	۱	۱
	CCACAC	–	–	۳	۲	۳	۱	۲
	CCCAAA	–	–	۳	۲	۳	۱	–
	CCAACC	–	–	۲	۴	–	–	–
	AACACC	–	–	–	–	۱	۱	–
	AACCCA	–	–	۲	–	۲	–	۶
	CCCCCA	–	۱	–	۱	–	۱	۱
ND 5/6	AAAAAAA	۲۹	۱۶	۳۰	۲۹	۲۰	۲۵	۳۱
	AABAAAB	۲	۴	۱	–	–	۱	–
	BABAAAA	۳	۲	۱	۳	۱	–	–
	BBBAABB	۵	۱۰	۲	۱	۲	۲	۱
	AAABBAA	–	۳	–	–	–	–	–
	AABABAA	۱	۲	–	–	–	–	–
	ABAABAA	–	۲	–	–	–	–	–
	AAABAAB	–	–	۱	۴	۱	۱	۱
	ABAAAAA	–	–	۲	۲	–	–	–
	AABBAAA	–	–	۱	–	۴	–	–
	AABAABA	–	۱	۲	۱	۲	–	۶
	AAAAAAB		–	–	–	–	۱	۱

magiran.com

جدول ۴: تنوع هاپلوتیپها و نوکلئوتیدها در مناطق نمونه‌برداری ماهی کپور معمولی حوضه جنوبی دریای خزر

ردیف	منطقه نمونه‌برداری	تنوع هاپلوتیپ		تنوع نوکلئوتیدها	
		ND3/4	ND5/6	ND3/4	ND5/6
۱	سواحل گیلان	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۰۷	۰/۰۲
۲	تالاب انزلی	۰/۷۷	۰/۷۸	۰/۱۰	۰/۰۶
۳	سواحل مازندران	۰/۶۲	۰/۴۴	۰/۰۵	۰/۰۲
۴	رودخانه تجن	۰/۶۰	۰/۴۷	۰/۰۵	۰/۰۳
۵	سواحل گلستان	۰/۷۰	۰/۵۴	۰/۰۶	۰/۰۳
۶	خلیج گرگان	۰/۴۵	۰/۳۱	۰/۰۵	۰/۰۲
۷	گرگانرود	۰/۵۱	۰/۳۹	۰/۰۴	۰/۰۲

جدول ۵: اختلاف نوکلئوتیدی(درصد) بین نمونه‌های ماهی کپور معمولی حوضه جنوبی دریای خزر در مناطق مختلف

مناطق نمونه برداری	محدوده استان گیلان (دریا)		مرداب انزلی		محدوده استان مازندران (دریا)		تجن		محدوده استان گلستان (دریا)		خلیج گرگان	
	ND-3/4	ND-5/6	ND-3/4	ND-5/6	ND-3/4	ND-5/6	ND-3/4	ND-5/6	ND-3/4	ND-5/6	ND-3/4	ND-5/6
محدوده استان گیلان (دریا)	۰/۰۰	۰/۰۰										
مرداب انزلی	۰/۶۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰								
محدوده استان مازندران (دریا)	۰/۲۰	۰/۰۰۱	۱/۶۰	۰/۱۰	۰/۰۰	۰/۰۰						
تجن	۰/۲۷	۰/۰۰۵	۱/۹۰	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۰				
محدوده استان گلستان (دریا)	۰/۱۵	۰/۰۲	۱/۴۰	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۰۱	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۰		
خلیج گرگان	۰/۱۴	۰/۰۲	۱/۷۰	۰/۲۱	۰/۱۴	۰/۰۴	۰/۱۹	۰/۱۰	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۰
گرگانرود	۰/۶۲	۰/۰۱	۲/۵۰	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۲

magiran.com

جدول۶: مقایسه فراوانی هاپلوتیپ‌های ماهی کپور معمولی به تفکیک مناطق نمونه‌برداری برای دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 (* اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد را نشان می‌دهد)

ردیف	مناطق مورد مقایسه	ژن ND-5/6	ژن ND-3/4
۱	سواحل استان گیلان - سواحل استان مازندران	P = ۰/۲۳۹	P = ۰/۰۵۷
۲	سواحل استان گیلان - تالاب انزلی	P = ۰/۰۳۹*	P = ۰/۰۴۲*
۳	سواحل استان گیلان - سواحل استان گلستان	P = ۰/۰۳۷*	P = ۰/۰۰۸*
۴	سواحل استان مازندران - سواحل استان گلستان	P = ۰/۷۲۴	P = ۰/۹۶۹
۵	سواحل استان گلستان- خلیج گرگان- گرگانرود	P = ۰/۱۳۷	P = ۰/۴۵۳
۶	رودخانه تجن - گرگانرود	P = ۰/۰۳۹*	P = ۰/۰۴۷*

بحث

امروزه تنوع ژنتیکی بعنوان یکی از شاخصهای وضعیت اکولوژیک اکوسیستمهای آبی بکار می‌رود و برای مناطق مختلف کاربرد علمی و مدیریتی بعنوان یک ابزار منحصر بفرد و توانمند جهت ارزیابی وضعیت و روند طولانی مدت جوامع زیستی مطرح می‌باشد. اطلاعات ژنتیک مولکولی با استفاده از روشهای مختلف از جمله DNA میتوکندری برای روشن شدن حد و مرز گونه‌ها بسیار سودمند می باشد و بنابراین از توان قابل ملاحظه‌ای جهت حل دشواریهای رده‌بندی کپور معمولی برخورداراست (Avise, 2000; Zhou *et al.*, 2004).

اولین مرحله مهم تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیتهای در حال بهره‌برداری است. این استراتژی در صورتیکه بر پایه روشهای دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai *et al.*, 2006).

در این تحقیق پلی‌مورفیسم نواحی ژن ND-3/4 و ND-5/6 میتوکندری در بین نمونه‌هایی از مناطق غربی، میانی و شرقی حوضه جنوبی دریای خزر و برخی از رودخانه‌ها بررسی شد که در مجموع ۱۴ و ۱۲ هاپلوتیپ بترتیب برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 شناسایی گردید. همانگونه که نتایج نشان داد، میزان فراوانی و تنوع هاپلوتیپها در مناطق مختلف و برای هر یک از دو ژن بررسی شده، یکسان نبوده و وجود هاپلوتیپ‌های مختلف نشان می‌دهد که تنوع در mtDNA ماهی کپور معمولی وجود دارد.

همانگونه که اطلاعات حاصل از این بررسی نشان داده، ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 قادر نبودند که نمونه‌های جمع آوری شده در سواحل دریا واقع در استان گیلان با مازندران، مازندران با گلستان و نمونه‌های استان گلستان با خلیج گرگان و گرگانرود را از لحاظ ژنتیکی از یکدیگر تفکیک نمایند. این موضوع بیانگر آن است که کلیه نمونه‌های این مناطق از یک جمعیت واحد تشکیل شده است.

یکی از دلایل یکسان بودن جمعیت در این مناطق، احتمالاً وجود تبادل جریان ژنی می‌باشد که بین این نمونه‌ها وجود دارد. از آنجائیکه جریان ژنی یکی از مهمترین عوامل شکل‌گیری در ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌ها می‌باشد، تفاوت‌های ژنتیکی مابین جمعیتها زمانی رخ می‌دهد که جریان ژنی موجب جلوگیری از تفاوتهای ناشی از انتخاب طبیعی نگردد (Tremblay & Ackerman, 2001). علاوه بر این وجود اختلاف معنی‌دار در میزان فراوانی هاپلوتیپهای نمونه‌های استان گیلان با گلستان و استان گیلان با تالاب انزلی و همچنین نمونه‌های رودخانه تجن با گرگانرود بیانگر این است که ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 می‌توانند این نمونه‌ها را از لحاظ ژنتیکی تفکیک نمایند.

اختلاف ژنتیکی مشاهده شده بین نمونه‌های منطقه مصب رودخانه تجن با دریا (منطقه گیلان و گلستان) احتمالاً بدلیل مجاور بودن این رودخانه با مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی می‌باشد. مهاجرت ماهیان دریایی به مصب رودخانه و نیز ورود ماهیان تکثیری مجمع شهید رجائی به رودخانه تجن باعث

magiran.com

گردید که تنوع ژنتیکی در این منطقه مشاهده شود. تغییرات شرایط اقلیمی، وجود خلیج گرگان و در جوار آن مزارع پرورش ماهی، تالاب گمیشان و رودخانه گرگانرود باعث گردیده که نمونه‌های سواحل استان گلستان نیز از تنوع ژنتیکی متفاوتی نسبت به نمونه‌های سواحل استان گیلان برخوردار گردد.

یوسفیان در سال ۱۳۸۳، از طریق الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید، چند شکلی ترانسفرین را در سرم خون نمونه‌هایی از کپور دریای مازندران (منطقه گهرباران)، رودخانه تجن، مجتمع تکثیر و پرورش شهید رجائی، خلیج گرگان و تالاب انزلی را مورد مطالعه قرار داد. در این تحقیق نمونه‌های صید شده از دریا با ژنوتیپ غالب BB بوده و نمونه‌های مجتمع شهید رجائی با ژنوتیپ‌های AB, AC, BC, CC و AA و رودخانه تجن AB, BC, BB و خلیج گرگان و تالاب انزلی BC و BB بود که اختلاف معنی‌داری بین آنها ملاحظه شد ($P\leq 0.00$). مطالعات دیگری درخصوص کپور معمولی دریای خزر که بتوان اطلاعات حاصله را با آن مقایسه نمود، وجود ندارد تا بتوان تحلیل دقیق‌تری ارائه نمود.

Gross و همکاران در سال ۲۰۰۲، پلی‌مورفیسم داخل نواحی ژن ND-3/4 و ND-5/6 در بین جمعیتهای کپور معمولی متعلق به زیر گونه‌های اروپائی (دو نژاد پرورشی و سه جمعیت طبیعی) و آسیای شرقی (کپور طبیعی ویتنامی،کپور Koi، ژاپنی و کپور وحشی آمور) را مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی ۱۷۶ نمونه از کشورهای روسیه، ویتنام، ژاپن و مجارستان جمع‌آوری شده بود. آنان در مجموع ۷ هاپلوتیپ متفاوت را شناسایی کرده و بر این اساس ماهیان را به ۴ گروه اروپائی، آمور، کپور ویتنامی و کپور Koi دسته‌بندی نمودند. اختلاف نوکلئوتید بین گروهها از ۱/۲ درصد (بین آمور و کپور ویتنامی) تا ۳ درصد (بین کپور Koi کپور اروپائی) محاسبه گردیده و در داخل گروهها، اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ‌ها از ۰/۵۱ درصد تا ۰/۸ درصد بوده است.

Thai و همکاران (۲۰۰۶) بیست نژاد یا جمعیت از کپور معمولی در ویتنام را با استفاده ازناحیه D-loop و ترکیبی از توالی یابی مستقیم mtDNA و تجزیه و تحلیل SSCP مورد بررسی قرار داد. آنان یک قطعه ۷۴۵ جفت بازی از ناحیه D-loop مربوط به ۱۱۱ عدد ماهی را مورد مطالعه قرار داده که در مجموع ۱۹ هاپلوتیپ شناسایی گردید. جمعیت‌های کپور ویتنام دارای تنوع هاپلوتیپی بالا (میانگین ۰/۰۲ ±۰/۹۲) ولی با تنوع نوکلئوتیدی پایین (میانگین صفر±۰/۰۱) می‌باشند. براساس این مطالعات اختلاف بین هاپلوتیپ‌های ناحیه D-loop در بین نمونه‌های کپور ویتنام معنی‌دار بوده که این نتایج با یافته‌های بدست آمده درخصوص سایر نژادها مطابقت دارد.

Thai و همکاران در سال ۲۰۰۴، با استفاده از روش توالی یابی مستقیم ناحیه D-loop میتوکندری (۷۴۵bp) و mtATPase8/ mtATPase6 (۸۵۷bp) تنوع ژنتیکی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. تنوع نوکلئوتیدی در هر دو ناحیه پایین بود ولی ناحیه D-loop از تنوع بالاتری نسبت به ناحیه mtATPase6/ mtATPase8 برخوردار بود (صفر تا ۰/۰۱). علاوه بر این تنوع هاپلوتیپها برای کپور آسیای شرقی ۰/۸۰ و برای کپور اروپائی صفر بود.

Kohlmann و همکاران در سال ۲۰۰۳، تغییرپذیری ژنتیکی جمعیت‌های کپور معمولی اروپا، آسیای مرکزی، آسیای شرقی و جنوب شرقی را با استفاده از روشهای آلوزایم، ریزماهواره و مارکرهای mtDNA (روش PCR-RFLP) مورد مطالعه قرار داد. در این تحقیق با روش آلوزایم، ۲۳ جمعیت، ۱۱ریزماهواره جمعیت و با DNA میتوکندری ۲۱ جمعیت بررسی شد. میزان تنوع با روش آلوزایم (۱/۵-۱/۰۶ آلل به ازای هر لوکوس) بسیار کمتر از ریزماهوارها (۱۴-۲/۵ آلل به ازای هر لوکوس) بود. نتایج نشان داده که یک هاپلوتیپ مربوط به mtDNA در آسیای مرکزی غالب بود اما کلاً در آسیای شرقی و جنوب شرقی از بین رفته است که موید آن است که منشاء کپور اروپایی از آسیای مرکزی است. در این مطالعات با استفاده از مارکرهای ژنتیکی، جمعیت‌های کپور معمولی بصورت دو گروه کاملاًمتمایز شامل اروپا، آسیای مرکزی و آسیای شرقی، جنوب شرقی دسته‌بندی شدند. علاوه براین مشخص گردید که تنوع زیاد ریزماهواره‌ها مربوط به داخل جمعیت بوده در حالیکه بیشترین تنوع mtDNA و آلوزایم‌ها مربوط به اختلاف نواحی جغرافیایی می‌شود.

Ludanny و همکاران در سال ۲۰۰۶، تنوع ژنتیکی و اختلافات ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L.) روسی را در ۸۷ نمونه ماهی در مناطق Amur oblast, Altai krai, Leningrad oblast, Krasnodar krai, و Stavopol krai را با روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند. آنان با استفاده از ۴ پرایمر تنوع ژنتیکی را در ۱۲ جمعیت کپور معمولی بدست آوردند. بالاترین تنوع پلی مورفیسم مربوط به کپور Angelinskii، کپور Astai و کپور وحشی آمور بود (۱۸/۷-۲۳/۸= P)، ضمن اینکه پایین‌ترین تنوع مربوط به کپور Ropsha (۸/۱۲) بوده است.

magiran.com

مطالعات متعدد دیگری درخصوص ماهی کپور معمولی مناطق مختلف انجام شده است که نتایج تقریبا مشابهی بدست آمده است (Guo *et al.*, 2003 ;Zhou *et al.*, 2004).

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که کپور اروپایی منشاء آسیایی داشته و خصوصیات قابل توجه نمونه‌های کپور اروپایی این است که فاقد تنوع ژنتیکی می‌باشند. با استفاده از نرخ کالیبراسیون موتاسیون با تقارب ۰/۷۶ درصد به ازاء میلیون سال mtDNA کپور (Zardoya & Doadrio, 1999) می‌توان گفت که فاصله تکاملی بین گروههای هاپلوتیپ کپور اروپایی - آسیای مرکزی و آسیای شرقی (۰/۳۷۶ درصد در داده‌های انتشار یافته) حدود پانصد هزار سال می‌باشد (Kohlman *et al.*, 2005).

با توجه به داده‌های بدست آمده در این بررسی، تنوع هاپلوتیپ‌ها در مناطق نمونه‌برداری در ژن ND-3/4 بین ۰/۴۵ و ۰/۷۸ و برای ژن ND-5/6 بین ۰/۳۱ و ۰/۷۷ بود. این تنوع در نمونه‌های تالاب انزلی بیشترین و در خلیج گرگان کمترین مقدار بوده است. مقایسه دامنه تنوع هاپلوتیپ‌های بدست آمده از این بررسی با داده‌های جدول ۷ نشان می‌دهد که این مقادیر تقریباً مشابه بوده و در بعضی موارد نسبت به مطالعات انجام شده کمتر می‌باشد. همچنین تنوع نوکلئوتیدی در ژن ND-3/4 بین ۰/۰۴ و ۰/۰۹ و در ژن ND-5/6 بین ۰/۰۲ و ۰/۰۶ بوده که بیشترین مقدار مربوط به نمونه‌های تالاب انزلی و کمترین آن مربوط به گرگانرود بوده است. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی نسبت به مطالعات انجام شده (جدول ۷) بیشتر است. البته چون نمونه‌برداری‌ها در زمانها و محلهای جغرافیایی متفاوتی انجام شده است و در همه بررسی‌ها روش‌ها یکسان نبود لذا نمی‌توان داده‌ها را بطور دقیق با هم مقایسه نمود.

بطور کلی تنوع پایین هاپلوتیپ‌ها به این دلیل است که احتمالاً ماهیان دارای جد مشترک هستند که در بین جمعیت‌ها حفظ شده است (Imsiridou *et al.*, 1998) و میزان کم اختلاف در نمونه‌های مورد بررسی می‌تواند ناشی از نرخ کندتر ناحیه mtDNA در کپور معمولی باشد (Thai *et al.*, 2006).

در مجموع مقایسه الگوی ژنوتیپی وهاپلوتیپی در مناطق مختلف بیانگر آن است که توزیع نمونه‌ها در نواحی مختلف تحت تاثیر عوامل مختلف فیزیکی و اکولوژیک می‌باشد که احتمالاً تغییرات تنوع نژادی در جمعیتهای گوناگون را تحت تاثیر قرار داده است.

جدول ۷ : میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپ کپور معمولی در مطالعات انجام شده نواحی مختلف جهان و مقایسه آن با نتایج این بررسی

ردیف	ژن	منطقه نمونه‌برداری	تنوع هاپلوتیپ	تنوع نوکلئوتید	منبع
۱	ND-3/4 , ND-5/6	رودخانه‌های Hing Tiszu ، دانوب و راین	۰/۵۰-۰/۰۰	۰/۰۱-۰/۰۰	Gross *et al.*, 2002
۲	D-Loop	Ts son, Bac Ninh, Me Linh, Vinh phuc, Son La town, Bach Thong (Vietnam)	۰/۹۲	۰/۰۱-۰/۰۰	Thai *et al.*, 2006
۳	D-Loop , mtATPase8/ mtATPase6	چین، هند، ژاپن، ویتنام و مجارستان	۰/۸۰-۰/۰۰	۰/۰۱-۰/۰۰	Thai *et al.*, 2004
۴	ND-3/4 , ND-5/6	نواحی از اروپا ، نواحی مرکزی و شرقی آسیا	۰/۷۰-۰/۰۰	۰/۰۱-۰/۰۰	Kohlmann *et al.*, 2003
۵	ND-3/4, ND-5/6	حوضه جنوبی دریای خزر، رودخانه تجن، گرگانرود، خلیج گرگان و تالاب انزلی	۰/۴۹ و ۰/۵۹	۰/۰۷ و ۰/۰۳	مطالعات حاضر

magiran.com

مطالعات و آنالیزهای ژنتیکی نشان داده است که در برخی موارد میان جمعیت‌هایی که از لحاظ خصوصیات ظاهری، تولید مثلی، زیستگاهی و..... مجزا هستند، فاصله تکاملی اندکی وجود دارد (حاجی رستملو، ۱۳۸۳). این امر احتمالاً مبین این مطلب است که ایجاد فاصله تکاملی بسیار اندک برای تمایز هاپلوتیپ‌ها از یکدیگر کفایت می‌نماید یا اینکه ممکن است این روش برای بررسی فاصله تکاملی میان این جمعیت چندان مناسب نبوده باشد. از طرف دیگر گاهی اوقات ملاحظه می‌گردد فاصله تکاملی میان هاپلوتیپها قابل توجه می‌باشد که احتمالاً بیانگر پویایی جمعیت بوده و نشان می‌دهد جمعیت مورد مطالعه در حال تغییر و تبدیل می‌باشد ولی هنوز به یکنواختی وثبات ژنتیکی نرسیده است (حاجی رستملو، ۱۳۸۳).

با توجه به موارد فوق و وجود تفاوت ژنتیکی معنی‌دار بین نمونه‌ها، می‌توان عنوان نمود که جمعیت واحدی از کپور معمولی در مناطق مورد بررسی وجود نداشته و بطور کلی سه گروه ژنتیکی از این گونه شناسایی شدند.

بطور کلی با توجه به نتایج بدست آمده و فرضیه تحقیق می‌توان عنوان نمود که دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 می‌توانند تنوع ژنتیکی را در بین نمونه‌های مختلف کپور در نوار ساحلی سه استان شمالی کشور آشکار سازند. همچنین در این بررسی ژن ND-3/4 با توجه به داده‌های بدست آمده قابلیت بیشتری برای نشان دادن تنوع ژنتیکی دارد.

در این رابطه پیشنهاد می‌گردد، این تحقیق بصورت گسترده‌ای با جمع‌آوری نمونه‌هایی از نواحی شمالی و میانی دریای خزر انجام گیرد تا بتوان براساس نتایج بدست آمده و شناسایی جمعیتهای احتمالی بیشتر، مدیریت اصولی را برای ذخایر این ماهیان اعمال نمود. علاوه بر این نیاز است رفتارهای تولید مثلی، تغذیه‌ای و مهاجرتی این جمعیتها مورد مطالعه و تحقیق قرار گیرد.

منابع

حاجی رستملو، م. ، ۱۳۸۳. مطالعه مولکولی آرتمیای ایران بمنظور شناسایی جمعیتهای احتمالی به روش PCR-RFLP. پایان‌نامه دکتری، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۲۱ صفحه.

دریانبرد، غ. ؛ عبدالملکی، ش. ؛ بندانی، ع. و کر، د. ، ۱۳۸۶. گزارش نهایی پروژه ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی در سواحل دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران ۲۲۰ صفحه.

غنی نژاد، د. ؛ صیاد بورانی، م. ؛ پورغلامی، ا. ؛ فضلی، ح. ؛ عباسی، ک. و بندانی. ، ۱۳۸۱. گزارش نهایی پروژه ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۱۳۸۱. موسسه تحقیقات شیلات دریای خزر. ۱۴۷صفحه.

لالوئی. ف. ؛ رضوانی گیل‌کلائی، س. ؛ نیرانی، م. و تقوی، ج. ، ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۱۲۸-۱۱۹.

لالوئی. ف ؛ رضوانی، س. و پورکاظمی، م. ، ۱۳۸۲. بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۲، صفحات ۱۱۷ تا ۱۳۰.

یوسفیان، م. ، ۱۳۸۳. مقایسه خصوصیات مرفولوژیک و الکتروفورتیک ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L.) در منابع آبی شمال ایران. مجله علمی شیلات ایران، سال سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۳، صفحات ۱۷۹ تا ۱۸۹.

Avise , J.C. , 2000. Phylogeography– The history and formation of species . Harvard University Press. USA. 447P.

Bartfai, R. ; Egedi, S. ; Yue, G.H. ; Kovacs, B. ; Urbanyi, B. ; Tamas, G. ; Horvath, L. and Orban, L., 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. Aquaculture, Vol. 219, pp.157-167.

Cataudella, S. ; Sola, L. ; Corti, M. ; Arcangeli, R. ; La Rosa, G. ; Mattoccia, M. ; Coboldi Sbordoni, M. and Sbordoni, V. , 1987. Cytogenetic, genic and morphometric characterization of groups of common carp. Cyprinus carpio. *In*: (ed. K. Tiews), Proc. World Symp. On Selection, Hybridization,

magiran.com

and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux. 27-30 May 1986. Schriften der Bundesnstalt fur Fischerei, Hamburg, Germany. Vol. I, pp.113-129.

Csizmadia, C. : Jeney, Z. ; Szerencses, I. and Gorda, S. , 1995. Transferrin polymorphism of some race in a live gene bank of common carp. Aquaculture, Vol. 129, pp.193-198.

Davis, K.M. ; Dixon, P.I. and Harris, J.H. , 1999. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of carp, *Cyprinus carpio* L., from south – eastern Australia. Marine Freshwater Resources. Vol. 50, pp.253-260.

Desvignes, J.F. ; Laroche, J. ; Durand, J.D. and Bouvet, Y. , 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. Aquaculture, Vol. 194, pp.291-301.

Fevolden, S.E. and Pogson, G.H. , 1997. Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian coastal and northeast Arctic population of Atlantic Cod. Journal of fish Biology, Vol. 51, pp.895-908.

Froufe, E. ; Magyary, L. ; Lehocky, I. and Weiss, S. , 2002. mtDNA sequence data supports an Asian ancestry and single introduction of the common carp into the Danube Basin. Journal of Fish Biology, Vol. 61, pp.301-304.

Gross, R. ; Kohlman, K. and Kersten, P. , 2002. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture, Vol. 204, pp.507-516.

Gue, X. ; Liu, S. and Liu, Y. , 2003. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in Cyprinids with different ploidy level. Aquaculture, Vol. 224, pp.25-38.

Kirpichnikov, V.S. , 1972. Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Ommunication I. Breeding Aims, Original Forms and Cross System, Russian Journal of Genetics, Vol. 8, No. 1, pp.65–72.

Kohlmann, K. ; Gross, R. ; Murakaeva, A. and Kersten, P. , 2003. Genetic variation and structure of common carp populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mtDNA marker. Aquatic Living Resources, Vol. 16, pp.421-431.

Kohlmann, K. ; Kersten, P. and Flajshans, M. , 2005. Microsatellite based genetic variability and differentiation of domesticated wild and feral common carp populations. Aquaculture, Vol. 247, pp.253-266.

Lehoczky, I. ; Jeney, Z. ; Magyary, I. ; Hancz, C. and Kohlmann, K. , 2005. Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. Aquaculture, Vol. 247, pp.45–49.

Ludanny, R.I. ; Chrisanfova, G.G. ; Vasilyev, V.A. and Prizenkov, V.K. , 2006. Genetic diversity and differentiation of Russian common carp breeds inferred from RAPD markers. Animal genetics. Vol. 42, No. 8, pp.1121-1129.

magiran.com

Macaranas, J.M. ; Sato, J. and Fujio, Y. , 1986. Genetic characterization of culture populations of Japanese common carp. Tohoku Journal of Agriculture Research. Vol. 37, pp.21-29.

Rezvani Gilkolaei, S. ; Imanifar, A. ; Aghili, R. and Laloei, F., 2007. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. Journal of Marine Biology Association. U.K. Vol. 86, pp.1463-1467.

Tremblay, R.L., and Ackerman, J.D. , 2001. Gene flow and effective population size in Leopanthes (Orchidaceas): A case for genetic drift. Biological Journal of the Linnean Society, Vol. 72, pp.47-62.

Roff, D.A. and Bentzen, P. , 1989. The statistical analysis of mtDNA polymorphism: X2 problem of small sample size. Journal of Molecular Evolution. Vol. 2, pp.539-545.

Sumantadinata, K. and Taniguchi, N. , 1990. Comparison of electrophoretic allele frequencies and genetic variability of common carp stocks from Indonesia and Japan. Aquaculture, Vol. 88, pp.263-271.

Tanck, M.W.T. ; Baars, H.C.A. ; Kohlmann, K. ; Van der Poel, J.J. and Komen, J. , 2000. Genetic characterization of wild Dutch common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture Research, Vol. 31, pp.779-783.

Thai, B.T. ; Pham, T.A. and Austin, G.M. , 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. Aquaculture, Vol. 258, pp.228-240.

Thai, B.T. ; Burridge, C.P. ; Pham, T.A. and Austin, C.M. , 2004. Using mitochondrial nucleotide sequences to investigate diversity and genealogical relationships within common carp. Animal genetics, Vol. 36, pp.23-28.

Zardoya, R. and Doadrio, I. , 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. Journal of Molecular Evolution. Vol. 49, pp.227-237.

Zhou, J.F. ; Wu, Q.J. ; Ye, Y.Z. and Tong, J.G. , 2003. Genetic divergence between *Cyprinus carpio carpio* and *Cyprinus carpio haematopterus* as assessed by mitochondrial DNA analysis, with emphasis on origin of European domestic carp. Genetica, Vol. 119, pp.93-97.

Zhou, J.F. ; Wu, Q.J. ; Ye, Y.Z. and Tong, J.G. , 2004. Genetic variation analysis within and among six varietics of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers, Russian Journal of Genetics , Vol. 40, No. 10, pp.1144-1148.

magiran.com

Investigation of population genetic structure of common carp (*Cyprinus carpio*) in the south Caspian Sea using mtDNA Method (PCR-RFLP)

Laloei F.[(1)*] ; Rezvani Gilkolaei S. [(2)] ; Fatemi S.M.R.[(3)] and Taghavi M.J.[(4)]

Laloei@yahoo.com

1,4- Caspian Sea Ecology Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

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

3- Science and Research Branch of Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775

Received: September 2007 Accepted: August 2008

Keywords: Genetic variation, Common carp, Caspian Sea, Iran

Abstract

The population genetic structure of common carp (*Cyprinus carpio*) was examined on 260 specimens from Tajan and Gorgan Rivers, Gorgan Gulf, Anzali Lagoon and other regions in east, middle and west of south Caspian Sea. DNA was extracted from fin tissue by phenol-chlorophorm method with a concentration of 50-100 nanograms. PCR was performed using ND-3/4 and ND-5/6 genes. The PCR products of samples were digested by 15 restriction endonuclease enzymes. The digested products accompanied with standard marker (50 pb). To measure fragment size, samples were run on a 6% vertical poyacrylamide gel. The fragments were visualized by silver staining of the polyacrylamide gel. Statistical analysis of data was performed by Reap software. We detected 14 and 12 different haplotypes in ND-3/4 and ND-5/6 genes of common carp. The mean values of haplotype diversity among populations were 0.59 and 0.48 and the average nucleotide diversity was 0.06 and 0.03 for ND3/4 and ND5/6 genes. Also, the mean values of nucleotide divergence among populations were 0.05% and 0.02%, respectively. The haplotype distribution was not significantly different between Mazandaran and Guilan coasts, Mazandaran and Golestan coasts, Golestan coast and Gorgan Gulf and Gorgan River ($P \leq 0.05$), but this divergence was significantly different between Guilan region and Anzali Lagoon, Guilan and Golestan coasts, Tajan and Gorgan Rivers ($P \leq 0.05$). We found a significant genetic divergence between some of the samples such that three genetic groups of common carp were identified in the southern part of the Caspian Sea.

* Corresponding author