

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

بررسی جامع اکولوژیک امکان کنترل جمعیت شانه‌دار مهاجم  
دریای خزر- فعالیت ۶: آزمایش مولکولی در شناسایی شانه‌دار  
مهاجم دریای خزر

مجری :

فرامرز لالوئی

شماره ثبت

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

---

- عنوان پروژه/ طرح: بررسی جامع اکولوژیک امکان کنترل جمعیت شانه‌دار مهاجم دریای خزر- فعالیت ۶:  
آزمایش مولکولی در شناسایی شانه‌دار مهاجم دریای خزر
- شماره مصوب: ۴۰-۴۶۰۰۰-۲۴۶۰۰۰-۰۷۱-۸۲
- نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده گان: فرامرز لالوئی
- نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد):  
نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: فرامرز لالوئی
- نام و نام خانوادگی همکاران: حسین نگارستان- رضا پورغلام- محجوبه نیرانی- مهدی یوسفیان- نوروزی  
مقدم- علیرضا کیان ثانی- سیدابراهیم صفوی- علی کفشدار- مجید نظران- عبدالله نصرالله تبار- یوسف‌زاد- صداقت  
کیش- مددی- محمودی- پورمند- سهراب رضوانی- احمد کدیش- حسینعلی خوشباور رستمی
- نام و نام خانوادگی مشاور(ان) -
- محل اجرا: استان مازندران
- تاریخ شروع: ۸۲/۳/۱
- مدت اجرا: ۱ سال و ۹ ماه
- ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
- شمارگان (تیراژ): ۱۵ نسخه
- تاریخ انتشار: ۱۳۸۸
- حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ  
بلامانع است.

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION**  
**ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Persian**  
**Gulf and Oman Sea Ecology Research Center**

**Title:**

**An Ecological investigating on controlling *Mnemiopsis leidyi*  
population**

**Activity 6: Molecular Test in identification of *Menmiopsis leidyi***

**Executor :**

Faramarz Laloei

**Registration Number**

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Persian**  
**Gulf and Oman Sea Ecology Research Center**

---

**Title :** An Ecological investigating on controlling Mnemiopsis leidyi population -  
Activity 6: Molecular Test in identification of Menmiopsis leidyi

**Apprpved Number:** 82-710246000-40

**Author:** Faramarz Laloei

**Executor :** Faramarz Laloei

**Collaborator :** Rezvani gilkolaie,. M. J. Nayerani,H.Negarstan, R.porgholam,  
M.yosefian, Noroozimoghadam, A.R.Kian Sani, S.A.Safavi, A.Kafshdar, M.Nazaran,  
A.Nasrollahtabar,Yoosefzad, Sedaghatkish, Madadi, Mahmoodi, Poormand, A.  
kedish, H.A.Khoshbavarrostami.

**Location of execution : :** Ecological Academy of Caspian Sea

**Date of Beginning :** 2003

**Period of execution :** 1 years & 9 months

**Publisher :** Iranian Fisheries Research Organization

**Circulation :** 15

**Date of publishing :** 2009

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or  
Transmitted without indicating the Original Reference**





پروژه: بررسی جامع اکولوژیک امکان کنترل جمعیت شانه‌دار مهاجم  
دریای خزر- فعالیت ۶: آزمایش مولکولی در شناسایی شانه‌دار مهاجم  
دریای خزر

کد مصوب: ۴۰-۴۶۶۰۰۰-۲۴۱۰۷۱-۸۲

با مسئولیت اجرایی: فرامرز لالوئی<sup>۱</sup>

در تاریخ ۱۳۸۸/۳/۶ در کمیته علمی فنی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران  
مورد تأیید قرار گرفت.

معاون تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

<sup>۱</sup> آقای فرامرز لالوئی متولد سال ۱۳۳۹ در شهرستان نیشابور بوده و دارای مدرک تحصیلی  
فوق لیسانس در رشته بیولوژی ماهیان دریا می‌باشد و در زمان اجرای پروژه: بررسی جامع  
اکولوژیک امکان کنترل جمعیت شانه‌دار مهاجم دریای خزر- فعالیت ۶: آزمایش مولکولی در  
شناسایی شانه‌دار مهاجم دریای خزر

ایستگاه

مرکز

پژوهشکده

در ستاد

در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول فعالیت بوده است.



## فهرست مطالب

| صفحه    | عنوان  |
|---------|--|
| ۱.....  | مقدمه:   |
| ۲.....  | ۱- شانه دار <i>Mnemiopsis leidyi</i> .....       |
| ۳.....  | ۲- مارکرهای مولکولی:.....                        |
| ۵.....  | ۳- مواد و روشها.....                             |
| ۵.....  | ۳-۱- مواد مصرفی مورد نیاز.....                   |
| ۶.....  | ۳-۲- دستگاههای مورد استفاده:.....                |
| ۷.....  | ۳-۲- روشها.....                                  |
| ۷.....  | ۳-۲-۱- روش نمونه برداری.....                     |
| ۸.....  | ۳-۲-۲- استخراج DNA.....                          |
| ۹.....  | ۳-۲-۳- واکنش PCR.....                            |
| ۱۰..... | ۳-۲-۳- هضم آنزیمی محصولات PCR (آنالیز RFLP)..... |
| ۱۰..... | ۳-۲-۴- واکنش PCR با پرایمرهای تصادفی (RAPD)..... |
| ۱۱..... | ۳-۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری.....                  |
| ۱۳..... | ۴- نتایج و بحث:.....                             |
| ۱۳..... | ۴-۱- آنالیز RFLP.....                            |
| ۱۸..... | ۴-۲- RAPD.....                                   |
| ۳۲..... | منابع.....                                       |

## فهرست جداول

| عنوان  | صفحه |
|--|------|
| جدول ۱: توالی پرایمرهای تصادفی مورد استفاده در واکنش PCR.....                                | ۱۱   |
| جدول ۲: تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصول PCR مربوط به ژن 18s rRNA         |      |
| شانه دار دریای خزر.....  | ۱۴   |
| جدول ۳: تعداد باندهای ایجاد شده توسط هر یک از پرایمرها.....                                  | ۱۹   |
| جدول ۴: تعداد و درصد باندهای چند شکلی مشاهده شده در نمونه های شانه دار دریای خزر.....        | ۲۰   |
| جدول ۵: متوسط تعداد آللهای مشاهده شده ، آللهای موثر، تنوع ژنتیکی و شاخص شانن در مناطق        |      |
| مختلف نمونه برداری از شانه دار دریای خزر.....  | ۲۱   |
| جدول ۶: فواصل ژنتیکی بین چهار منطقه نمونه برداری شده از شانه دار دریای خزر.....              | ۲۱   |
| جدول ۷: آنالیز Nei جهت محاسبه میانگین درجه تمايز ژنی و جریان ژنی در نمونه های شانه دار دریای |      |
| خزر.....   | ۲۲   |
| جدول ۸ : طول هر یک از شاخه ها و مناطق نمونه برداری.....                                      | ۲۳   |

## فهرست اشکال

| عنوان   | صفحه |
|---|------|
| شکل ۱: موقعیت مناطق نمونه برداری از شانه دار دریای خزر.....   | ۷    |
| شکل ۲: الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد.....   | ۱۶   |
| شکل ۳: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم <i>Bcl I</i> بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه های سواحل مازندران، ستون ۸-۶ نمونه های سواحل گیلان، ستون ۱۲-۹ نمون های سواحل گلستان، ستون ۱۵-۱۳ نمونه های ناحیه شمالی. ستون M مارکر..... | ۱۶   |
| شکل ۴: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم <i>Alu I</i> بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه های سواحل مازندران ستون ۸-۶ نمونه های سواحل گیلان. ستون ۱۲-۹ سواحل گلستان. ستون ۱۵-۱۳ ناحیه شمالی. ستون M.....                           | ۱۶۷  |
| شکل ۵: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم <i>Dra I</i> بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه های سواحل مازندران ستون ۸-۶ نمونه های سواحل گیلان. ستون ۱۲-۹ سواحل گلستان. ستون ۱۵-۱۳ نمونه های ناحیه شمالی. ستون M مارکر.....           | ۱۷   |
| شکل ۶: نمودار شجره ای نمونه های شانه دار دریای خزر.....   | ۲۴   |
| شکل ۶: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۱. ستون ۴-۱ سواحل سواحل مازندران، ستون ۷-۵ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۳-۱۱ ناحیه شمالی.....  | ۲۴   |
| شکل ۷: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۲. ستون ۴-۱ سواحل سواحل مازندران، ستون ۷-۵ سواحل گیلان، ستون ۱۰-۸ سواحل گلستان، ستون ۱۳-۱۱ ناحیه شمالی.....  | ۲۴   |
| شکل ۸: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۳. ستون ۵-۱ سواحل سواحل مازندران، ستون ۱۰-۶ سواحل گیلان، ستون ۱۴-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۷-۱۴ ناحیه شمالی.....  | ۲۵   |



- شكل ٩: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ٤. . ستون ٣-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٥-٤ سواحل گيلان، ستون ٨-٦ سواحل گلستان، ستون ١٠-٩ ناحيه شمالى ..... ٢٥
- شكل ١٠: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ٦. . ستون ٤-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٧-٥ سواحل گيلان، ستون ٨-١٠ سواحل گلستان، ستون ١٣-١١ ناحيه شمالى ..... ٢٥
- شكل ١١: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ٧. . ستون ٣-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٦-٤ سواحل گيلان، ستون ٩-٧ سواحل گلستان، ستون ١١-١٠ ناحيه شمالى ..... ٢٦
- شكل ١٢: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ٨. . ستون ٤-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٧-٥ سواحل گيلان، ستون ٨-١٠ سواحل گلستان، ستون ١٤-١١ ناحيه شمالى ..... ٢٦
- شكل ١٣: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ٩. . ستون ٤-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٧-٥ سواحل گيلان، ستون ٨-١٠ سواحل گلستان، ستون ١٤-١١ ناحيه شمالى ..... ٢٧
- شكل ١٤: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ١٠. . ستون ٤-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٧-٥ سواحل گيلان، ستون ٨-١٠ سواحل گلستان، ستون ١٤-١١ ناحيه شمالى ..... ٢٧
- شكل ١٦: الگوى الكتروفورز پرايمر شماره ١١. . ستون ٥-١ سواحل سواحل مازندران ، ستون ٩-٦ سواحل گيلان، ستون ١٠-١٥ سواحل گلستان، ستون ١٨-١٦ ناحيه شمالى ..... ٢٨

## خلاصه :

بمنظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت شانه دار دریای خزر *Mnemiopsis leidyi* تعداد ۲۰۰ نمونه از دریای خزر شامل ۵۰ نمونه از سواحل گیلان (منطقه آستارا)، ۵۰ نمونه از سواحل مازندران (منطقه امیرآباد)، ۵۰ نمونه از سواحل گلستان (منطقه گمیشان) و ۵۰ نمونه از ناحیه شمالی دریای خزر جمع آوری گردید.

استخراج DNA با بهینه سازی روش فنل - کلروفرم انجام ، بطوریکه غلظت آن در کلیه نمونه ها ۵۰ تا ۱۰۰ نانو گرم بود. در این بررسی از دو روش RFLP و RAPD استفاده شده است. در آنالیز RFLP، واکنش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر از چینش نوکلئوتیدهای ژن 18s rRNA انجام شد و هضم آنزیمی محصولات PCR نیز با ۱۲ آنزیم محدود کننده انجام گردید. دو آنزیم از ۱۲ آنزیم «*Alu I* و *Dra I*» دارای الگوی هضم آنزیمی متفاوتی بوده و هر یک از این آنزیمها دو ژنوتیپ متفاوت را نشان داده‌اند. آنزیم *Alu I* در ۵ نمونه و آنزیم *Dra I* در ۶ نمونه اختلاف نشان داد. بقیه آنزیمها بر روی محصول PCR دارای الگوی هضم آنزیمی یکسانی داشته و باندهای ایجاد شده در تمام نمونه ها مشابه بود.

جهت انجام آنالیز RAPD از ۱۹ پرایمر استفاده شده و کلیه نمونه ها همراه با نشانگر 50pb DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. پس از الکتروفورز نمونه ها از ۱۹ پرایمر، ۱۰ پرایمر الگوهای باندهای چندشکلی را نشان دادند. براساس تجزیه تحلیل داده ها، میانگین تنوع ژنتیکی در مناطق نمونه برداری ۰/۱۸۹ بوده که بیشترین تنوع در ناحیه شمالی دریای خزر مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *Mnemiopsis leidyi*, RAPD, RFLP، تنوع ژنتیکی، دریای خزر

## مقدمه:

شانه داران (Ctenophora) شاخه ای از بی مهرگان می باشند که تقریباً در تمام محیط دریایی از سطح تا عمق و از مناطق گرمسیری تا قطب یافت شده و اکثر گونه ها دارای شنای آزاد می باشند. دانشمندان معتقدند که شانه داران اکثراً شبیه هم بوده و تعدادی نیز در مسیر مراحل تکاملی دچار تغییراتی گردیده اند (Mills, 2001). بطور کلی شناخت از شانه داران به دلیل شکننده بودن و مشکل جمع آوری، بسیار اندک است.

امروزه پیشرفت علم ژنتیک و مارکرهای مولکولی در حد بسیار زیادی در شناسایی گونه ها موثر واقع شده، بطوریکه بررسی سیستماتیک و اکولوژی آبریان را تحت تاثیر قرار داده است. تلاش برای یافتن مارکرهای مولکولی برای تشخیص گونه ها و جمعیتها می تواند کمک موثری برای حفاظت گونه های در معرض خطر و یا شناسایی گونه های غیر بومی در شرایط بحرانی باشد که در کوتاهترین زمان ممکن و با حداکثر دقت انجام می پذیرد. تکنیکهای PCR از قبیل RAPD (Williams *et al.*, 1990)، میکروساتلیت (Cronin *et al.*, 1994; Panaud *et al.*, 1996) برای شناسایی ژنوتیپ گونه ها و جمعیت های مختلف بکار می روند.

تاکنون مطالعاتی در خصوص بررسی جمعیت های احتمالی شانه دار صورت نگرفته است. Podar و همکاران (۲۰۰۱) مطالعاتی را در مورد فایلوژنی شاخه شانه داران انجام دادند. آنان با استفاده از توالی ژن 18s rRNA، تاکسهای مهم شانه داران را مورد مطالعه قرار دادند. Bridge و همکاران (۱۹۹۲) ارتباط فایلوژنی رده Cnidaria و شاخه Ctenophora را با استفاده از mtDNA مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که mtDNA در آتروزوآ به شکل مولکولهای حلقوی می باشد، در حالیکه در سیفوزوآ، کوبوزوآ و هیدروزوآ mtDNA خطی است. علاوه بر این نشان داده شد که

هدف از این تحقیق بررسی مولکولی جمعیت شانه دار دریای خزر به روشهای مولکولی می باشد تا از این طریق بتوان نشانگرهای مولکولی مناسب را جهت شناسایی گونه و جمعیت های احتمالی شناسایی و معرفی نمود.

### ۱- شانه دار *Mnemiopsis leidyi*

*Mnemiopsis leidyi* یکی از گونه های شانه داران است که بومی مناطق مصبی سواحل غربی شمال و جنوب آمریکا می باشد. این گونه به میزان زیاد از زئوپلانکتونها ، تخم و لارو ماهیان تغذیه نموده و از این طریق می توانند به جمعیت ماهیان آسیب برسانند. شانه داران توان رشد سریعی داشته و می توانند به میزان زیاد تغذیه ، رشد و تولید مثل نمایند (روحی و همکاران ، ۱۳۸۶). طی سالهای ۱۹۸۰ تهاجم گونه *M. leidyi* به دریای سیاه به تدریج بر کل اکوسیستم اثر گذاشت بطوریکه به عنوان یکی از مهمترین دلایل کاهش شدید ذخایر و صید ماهیان پلاژیک در دریای سیاه گزارش شده است (Kideys, 2001).

کاهش سریع تراکم تخم و لارو ماهیان و مزوزئوپلانکتونها و تغییر ترکیب گونه ای اکوسیستم ها از هشدارهای ورود این جانور محسوب می شود (Konsulov & kamburska,1998). به نظر می رسد ورود شانه دار از دریای سیاه و آزوف به دریای خزر به وسیله آب توازن کشتی ها از طریق رودخانه ولگا - دون صورت گرفته است (Ivanov et al.,2000). پس از تهاجم این شانه دار به دریای خزر و سرعت تکثیر زیاد آن طی سالهای اخیر ، فراوانی و زیتوده آن به سرعت افزایش یافته و هم اکنون تمامی اکوسیستم دریای خزر را فرا گرفته است (روحی و همکاران، ۱۳۸۶). به دنبال تهاجم

## ۲- مارکرهای مولکولی:

نشانگرهای مولکولی در سطح DNA در دو گروه نشانگرهای مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم بندی شده اند. از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR می توان به <sup>1</sup>AFLP, <sup>2</sup>STS, <sup>3</sup>SSR, <sup>4</sup>SCAR اشاره نمود. این دسته از نشانگرها نیاز به زمان و هزینه کمتری برای نقشه یابی مولکولی دارند. همچنین از نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR می توان به <sup>6</sup>RFLP اشاره نمود.

مشخص شده است که ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوتی در ردیف بازهای خود می باشند و همین امر سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شود که چند شکلی ژنتیکی نام دارد. اگر این چند شکلی در ردیف بازهای DNA در جایگاه شناسائی آنزیم محدود کننده ایجاد شده باشند به راحتی قابل ردیابی است. RFLP وجود الگوهای غیریکسان است که بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA بوسیله آنزیمهای محدود کننده مشخص می شود. این الگوهای غیریکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیمهای محدود کننده بوجود می آید.

---

<sup>1</sup>- Amplified fragment length polymorphism  
<sup>2</sup>- Sequence tagged site  
<sup>3</sup>- Microsatellites  
<sup>4</sup>- Sequence characterized amplified region  
<sup>5</sup>- Random amplified polymorphic DNA  
<sup>6</sup>- Restriction fragment length polymorphism



علاوه بر روش RFLP روش RAPD نیز در مطالعات جمعیت کاربرد دارد. در این روش یک آغازگر چند نوکلئوتیدی کوتاه که بطور تصادفی از توالیهای بازهای مختلف انتخاب شده است در مجاور سایر مواد لازم برای تکثیر در PCR قرار می گیرد. در این تکنیک چندشکلی های DNA یا از اختلافات موجود در توالی DNA و در مکانهای اتصال آغازگر یا از طریق دگرگونیهای که در اثر اضافه شدن، حذف و انورسیون در نواحی تکثیر شده روی داده است مشاهده می گردد. اگر مکانهای اتصال آغازگر روی دو رشته الگو، در فاصله مناسبی قرار گرفته باشند، DNA پلیمراز قادر به طی کردن فاصله دو پرایمر اتصالی خواهد بود. در این روش بطور کلی از آغازگرهایی با طول ۹ تا ۱۰ نوکلئوتید با حداقل محتوای ۵۰ درصد C + G استفاده می شود.

### ۳- مواد و روشها

#### ۳-۱- مواد مصرفی مورد نیاز

۱- STE شامل NaCl (۱۰۰mM)، Tris (۱۰mM)، EDTA (۱mM) با pH= ۸

۲- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۲ درصد

۳- پروتئیناز k با غلظت ۱۰mg/ml

۴- فنل با pH= ۷/۵-۸

۵- 8-hydroxy quinoline با نسبت ۰/۱g درصد (۰/۱g در ۱۰۰ میلی لیتر فنل)

۶- استات سدیم با pH= ۵/۲ و غلظت ۳ مولار

۷- الکل اتانل مطلق و ۷۰ درصد

۸- آنزیم RNase

۹- آگارز

۱۰- TBE (۱۰x) شامل: Tris (۸۹۰mM)، اسیدبوریک (۸۹۰mM) و EDTA (۲۵mM) با pH=۸

۱۱- بافر سنگین کننده Loading buffer شامل: گلیسرول (۵۰w/v)، EDTA (۱۰mM)،

و بروموفنل بلو (۱ درصد)

۱۲- اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰mg/ml

۱۳- DNA هدف

۱۴- مخلوط dNTP با غلظت ۲mM

۱۵- MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۵۰ mM

۱۶- بافر (۱۰x) PCR

۱۷- آنزیم Taq DNA Polymerase

۱۸- نمونه های شانه دار

۱۹- پرایمر

۲۰- مارکر ۱۰۰bp و ۵۰bp

### ۲-۳- دستگاههای مورد استفاده:

دستگاههای مورد استفاده در این بررسی عبارتند از:

- دستگاه Thermal cycler مدل Corbet reserch

- ژل داکيومنتيشن مدل HOEFER - UVIF 20

- الکتروفورز عمودی مدل HOEFER - FE 6152

- الکتروفورز افقی مدل پویا پژوهش

- میکرو سانتریفوژ مدل سیگما

بیوفتومتر مدل Eppendorf

- بن ماری

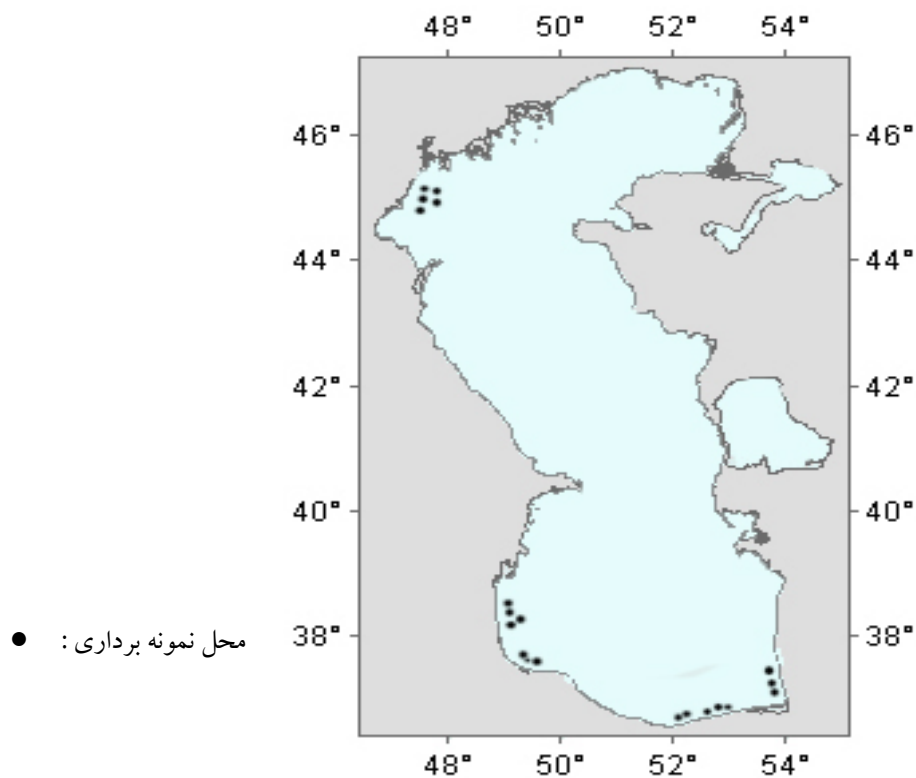
- انکوباتور

- همزن

### ۲-۳- روشها

#### ۱-۲-۳- روش نمونه برداری

نمونه برداری از شانه دار دریای خزر به تعداد ۲۰۰ نمونه از حوضه جنوبی دریای خزر شامل ۵۰ نمونه از سواحل گیلان (منطقه آستارا)، ۵۰ نمونه از سواحل مازندران (منطقه امیرآباد) و ۵۰ نمونه از سواحل گلستان (منطقه گمیشان) و همچنین ۵۰ نمونه از خزر شمالی (آبهای روسیه) جمع آوری گردید (شکل ۱). کلیه نمونه ها با استفاده از تور زئوپلانکتون با چشمه ۱۰۰ میکرون و به صورت کشتی صید گردید. نمونه ها پس از فیکس در الکل مطلق، به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید.



شکل ۱: مناطق نمونه برداری از شانه دار در دریای خزر

### ۳-۲-۲- استخراج DNA

برای استخراج DNA روشهای مختلفی وجود دارد که در این بررسی از بهینه سازی روش فنل

- کلروفرم استفاده شده است (Fevolden & Pogson, 1997).

ابتدا یک عدد شانه دار را درون یک میکروتیوپ انداخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر STE، ۳۰ میکرولیتر SDS و ۴ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه شد. نمونه‌ها بمدت ۳-۴ ساعت درین ماری ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اینکه بافت بخوبی حل گردید، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل به آن اضافه و سپس بمدت ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی همزن قرار می گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی را جدا و به یک میکروتیوپ دیگر منتقل کرده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شده است. بعد از این مدت در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می شود. مجدداً لایه رویی را در یک میکروتیوپ دیگر ریخته و مقدار ۴۰ میکرولیتر استات سدیم و دو برابر حجم برداشت شده (حدود ۸۰۰ میکرولیتر) الکل مطلق به آن اضافه شد. در این مرحله هاله‌ای ابر مانند بشکل کلافی از نخ‌های سفید رنگ تشکیل می گردد که همان DNA است. برای رسوب دادن DNA، محلول با ۱۳۰۰۰rpm بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس الکل داخل لوله را دور ریخته و رسوب شیری رنگ ته لوله با ۵۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. پس از این مرحله، الکل موجود در دیواره لوله را بطور کامل خارج و مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه و بمدت ۳۰-۴۵ دقیقه درین ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در این مرحله DNA استخراج شده در آب مقطر حل می گردد.

جهت بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از دستگاه فتویومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم برمایند استفاده شد. در این روش مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شده است.

### ۳-۲-۳- واکنش PCR

در این بررسی جهت انجام آنالیز RFLP و واکنش PCR از توالی نوکلئوتیدهای ژن 18s ribosomal RNA مربوط به *M. leidyi* که از طریق ژن بانک بدست آمد (Podar *et al.*, 2001) استفاده گردیده و با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی (Mircea, 2001) عمل PCR انجام گردید.

Primer 1: 5' -TGT ACA CAC CGC CCG TC -3'

Primer 2: 5' - CTT AAG TTC AGC GGG TAG TCT CG -3'

واکنش PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ µM، ۱ واحد آنزیم

Taq DNA polymerase، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر

به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰ µl برسد، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب واسرشته سازی (Denaturation)، ۹۴ درجه سانتیگراد

بمدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر (Annealing)، ۵۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و برای بسط واکنش

(Extension) ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر DNA ۵۰ pb و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶

درصد و رنگ آمیزی نترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.



### ۳-۲-۳- هضم آنزیمی محصولات PCR (آنالیز RFLP)

جهت هضم آنزیمی نمونه‌ها متناسب با شدت باند DNA، حجم مشخصی از محصول PCR را در یک میکروتیوپ ۰/۵ میکرولیتری ریخته و مقدار ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱ میکرولیتر آنزیم به آن اضافه کرده و سپس با  $dH_2O$  حجم آن به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. محلول فوق پس از مخلوط کردن بمدت ۲-۳ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس جهت بررسی کمیت و کیفیت عمل هضم آنزیمی، نمونه‌ها بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد الکتروفورز و با رنگ آمیزی نترات نقره باندهای ایجاد شده قابل مشاهده گردید. در این بررسی آنزیمهای *Alu I*, *Dra I*, *Alw26*, *Bcl I*, *HaeII*, *HapII*, *MaeII*, *MaeI*, *Eco 47I*, *Msp I*, *Hae III*, *Rsa I* استفاده شد.

### ۳-۲-۴- واکنش PCR با پرایمرهای تصادفی (RAPD)

برای انجام این واکنش از ۱۹ پرایمر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی استفاده گردید. توالی پرایمرهای مزبور در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR با استفاده از ۵  $\mu l$  بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت  $200 \mu M$ ، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase،  $MgCl_2$  با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰  $\mu l$  برسد، انجام شد.

برنامه حرارتی دستگاه ترمال سایکلر به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت اولیه و سپس ۳۰ چرخه حرارتی به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۳۶ تا ۴۱ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه به منظور بسط واکنش تنظیم و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور مشاهده باندهای حاصل از واکنش PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای تصادفی مورد استفاده در واکنش RAPD

| شماره | توالی         | شماره | توالی         |
|-------|---------------|-------|---------------|
| ۱     | ACT TGT GCG G | ۱۱    | CAA GGG AGG T |
| ۲     | TGG GCT CGC T | ۱۲    | GAG CTC GCG A |
| ۳     | CCC ACT GAC G | ۱۳    | CAA GGG AGG T |
| ۴     | GCT GCT GGA G | ۱۴    | GAG CTC GCG A |
| ۵     | GGT GGC GGG A | ۱۵    | GGG CAC GCG A |
| ۶     | GCT GCT GGA G | ۱۶    | GAG GGC AAG A |
| ۷     | GAG GTC CAG A | ۱۷    | TTC CCC GCG C |
| ۸     | ATC GGG TCG G | ۱۸    | GAG CAC CAG G |
| ۹     | GCT GCT GGA G | ۱۹    | CCT GGG CTT C |
| ۱۰    | CTT TCG TGC T |       |               |

### ۳-۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

پس از مشخص نمودن اندازه دقیق باندهای حاصله توسط شاخص وزنی DNA، در هر ژل در صورت حضور باند امتیاز یک و در صورت عدم حضور باند امتیاز صفر داده شد. برای این منظور ابتدا برای هر منطقه جدولی تهیه شده که در ستون آن افراد مختلف هر گروه و در ردیفهای آن جایگاههای مختلف هر آغاز گر به ترتیب از قطعات سنگین تر به سبکتر درج گردید.

این جدول برای همه افراد در گروههای مختلف طبقه بندی شد و برای تمام آغازگرهای بکار رفته تکمیل گردید. برای امتیاز دهی از باندهایی که از حالت تکرار پذیری بالا (سه بار تکرار) و

به منظور تعیین تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد داخل جمعیت‌ها و نیز ساختار ژنتیکی افراد از تست ANOVA استفاده گردید (Excoffier *et al.*, 1992; Sivasundar & Biemann, 2005).  
قابل ذکر است با توجه باینکه در روش RFLP آنزیم‌های پلی مورفیک به تعداد کافی یافت نشد، تجزیه تحلیل آماری انجام نشد.

#### ۴- نتایج:

تعداد ۲۰۰ نمونه شانه دار دریای خزر که در الکل معمولی نگهداری شده بود، برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA از شانه دار دریای خزر با روش بهینه شده فنل-کلروفرم انجام شد. غلظت DNA در کلیه نمونه ها حدود ۵۰ نانوگرم بوده و با توجه به نتایج الکتروفورز ژل آگارز از کیفیت مناسبی برخوردار بودند (شکل ۲).

#### ۴-۱- آنالیز RFLP

پس از کنترل کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، ژن 18S rRNA با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، با واکنش PCR تکثیر یافت. طول قطعه تکثیر شده در کلیه نمونه ها با استفاده از نشانگر DNA 50pb برای ژن 18S rRNA حدود ۸۲۵ جفت باز بدست آمد (شکل ۳). جهت هضم آنزیمی محصولات PCR جمعا از ۱۲ آنزیم محدودگر استفاده شده است. برای هضم آنزیمی محصول PCR، آنزیمهای *Alu I*, *Dra I*, *Alw26*, *Bcl I*, *Eco 47I*, *Msp I*, *Hae III*, *Rsa I*, *HaeII*, *HapII*, *MaeI* و *MaeII* مورد استفاده قرار گرفتند و الگوهای الکتروفورزی با ژل پلی اکریل آمید بدست آمد. جدول ۲ تعداد و اندازه هر یک از قطعات ایجاد شده بر اثر عمل آنزیمهای محدود کننده که با توجه به توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR محاسبه گردیده را نشان می دهد. این اندازه ها با توجه به تعداد و موقعیت قطع هر آنزیم (شماره باز) و تعداد بازهای محصول PCR محاسبه شد.

جدول ۲: تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصول PCR مربوط به ژن 18s rRNA شانه دار

دریای خزر

| ردیف | آنزیم          | ژنوتیپ | تعداد قطعات | طول قطعات (bp)     |
|------|----------------|--------|-------------|--------------------|
| ۱    | <i>Alu I</i>   | A      | ۴           | ۱۷۰-۲۵۶-۲۰۷-۱۹۲    |
|      |                | B      | ۳           | ۱۷۰-۲۵۰-۴۰۵        |
| ۲    | <i>Dra I</i>   | A      | ۲           | ۳۹۰-۴۳۵            |
|      |                | B      | ۲           | ۱۰۰-۷۲۵            |
| ۳    | <i>Alw26 I</i> | A      | ۲           | ۷۰-۷۵۵             |
| ۴    | <i>Bcl I</i>   | A      | ۲           | ۱۰۵-۷۲۰            |
| ۵    | <i>Eco 47I</i> | A      | ۲           | ۶۲۰-۲۰۵            |
| ۶    | <i>Msp I</i>   | A      | ۳           | ۵۵-۲۳۰-۵۴۰         |
| ۷    | <i>Hae III</i> | A      | ۵           | ۸۰-۱۰۰-۱۲۵-۲۲۰-۳۰۰ |
| ۸    | <i>Rsa I</i>   | A      | ۲           | ۵۵۰-۲۷۸            |
| ۹    | <i>HaeII</i>   | A      | ۳           | ۱۹۵-۲۲۰-۴۱۰        |
| ۱۰   | <i>HapII</i>   | A      | ۴           | ۱۳۰-۱۵۵-۲۰۰-۳۴۰    |
| ۱۱   | <i>MaeII</i>   | A      | ۲           | ۲۶۵-۵۶۰            |
| ۱۲   | <i>MaeI</i>    | A      | ۳           | ۱۲۵-۱۶۰-۵۴۰        |

براساس جدول فوق آنزیم‌های *Alu I*, *Alw26 I*, *Bcl I*, *Eco47 I*, *Rsa I* و *Dr al* هر کدام یک

محل قطع بر روی محصول PCR داشته که در نتیجه ۲ قطعه DNA حاصل شده است. آنزیمهای *Msp*

*Mae I* و *Hae II* هر کدام ۲ محل قطع داشته که در نتیجه هضم آنزیمی، تعداد ۳ قطعه DNA بدست

آمده است. همچنین آنزیم *Hap II* نیز ۳ محل قطع داشته که تعداد ۴ قطعه DNA و آنزیم *Hae II* ۴

محل قطع داشت که از نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بدست آمده است.

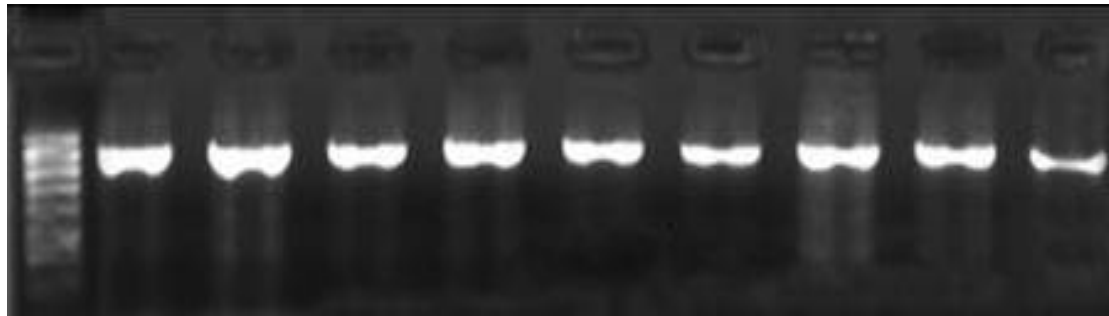
آنزیم *Alu I* با توجه به ترتیب اسیدهای نوکلئوتید ژن 18s rRNA دارای ۳ جایگاه قطع بر روی محصول PCR بوده که در نتیجه عمل هضم آنزیمی ۴ قطعه به اندازه ۱۷۰، ۱۹۲، ۲۰۷ و ۲۵۶ جفت باز را ایجاد می‌نماید. تعداد و اندازه باندهای ایجاد شده در جدول ۲ قابل مشاهده است.

قابل ذکر است که در ۵ نمونه از شانه‌دار دریای خزر (۲ نمونه از ناحیه شمالی و ۲ نمونه از سواحل گلستان و ۱ نمونه از سواحل گیلان) تعداد و اندازه باندهای ایجاد شده با سایر نمونه‌ها متفاوت بود. شکل ۴ دو نوع الگوی هضم آنزیمی *Alu I* را بر روی نمونه ژل پلی‌اکریل آمید نشان می‌دهد. در این نمونه‌ها آنزیم فوق ۲ محل قطع داشته که در نتیجه قطعات DNA با اندازه‌های ۱۷۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ جفت باز ایجاد شده است.

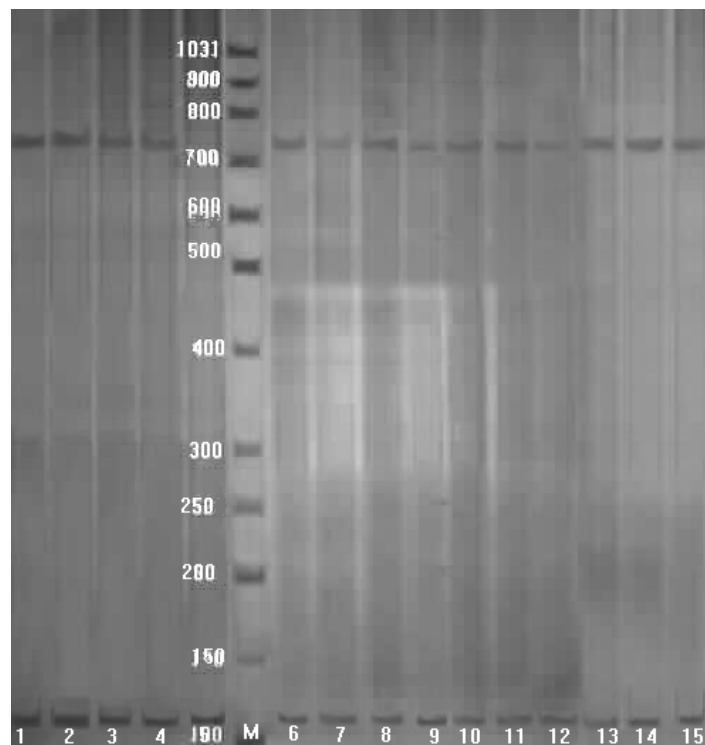
آنزیم *Dra I* دارای یک محل قطع بوده که در نتیجه محصول PCR به دو قطعه ۴۰۰ جفت بازی تقسیم شده است (شکل ۵). این قطعات چون در تعداد بازها برابر می‌باشند، بر روی ژل پلی‌اکریل آمید بصورت یک باند ظاهر می‌شوند. اثر این آنزیم بر روی محصول PCR نیز، دو نوع الگوی هضم آنزیمی را نشان داده است. در ۶ نمونه از شانه‌دار دریای خزر (۳ نمونه از ناحیه شمالی و ۳ نمونه از سواحل گلستان)، آنزیم فوق دارای یک جایگاه قطع بوده که در نتیجه، قطعات DNA با اندازه‌های ۷۰۰ و ۱۰۰ جفت باز را مشاهده گردیده است.

با توجه به اینکه ۱۰ آنزیم از ۱۲ آنزیم بر روی کلیه نمونه‌ها الگوی بانندی تک ریختی را نشان دادند و تعداد آنزیمهای پلی مورفیک و تعداد نمونه‌ها کم بود، تجزیه تحلیل آماری انجام نگرفته است. قابل ذکر است عدم مشاهده الگوهای بانندی چند ریختی در نمونه‌های مورد بررسی نمی‌تواند دلیل بر عدم وجود پدیده پلی مورفیسم در شانه دار دریای خزر باشد. در صورتیکه از ژنهای دیگری استفاده گردد و یا روشهای مولکولی دیگری مورد استفاده قرار گیرد، احتمالاً پدیده پلی مورفیسم مشاهده خواهد شد.

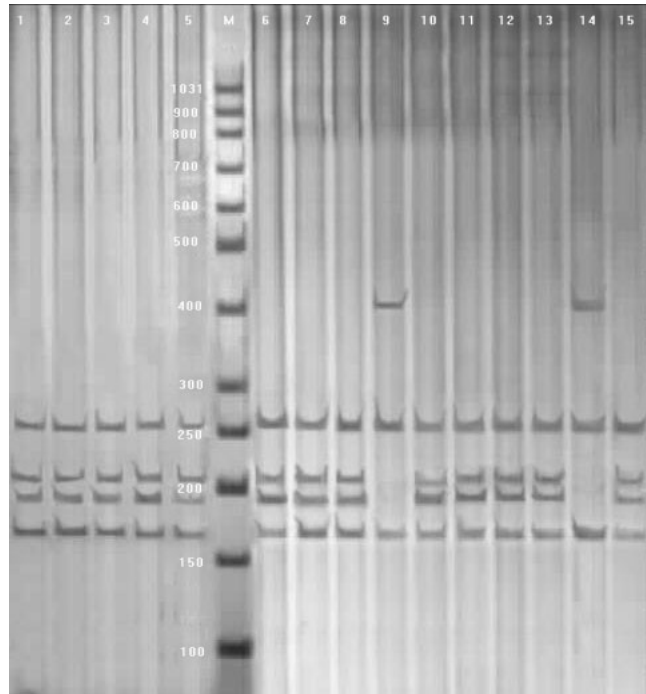




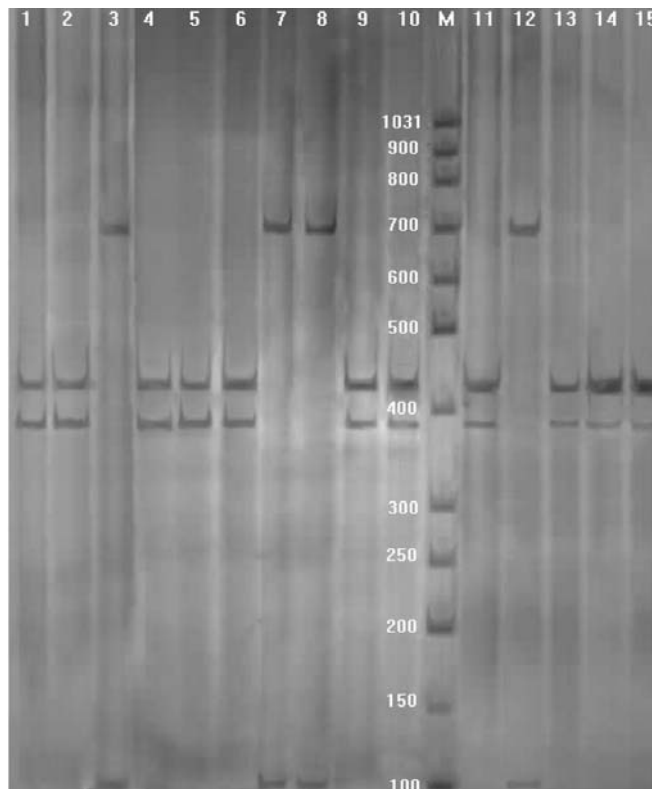
شکل ۲: الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد



شکل ۳: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Bcl I* بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه‌های سواحل مازندران، ستون ۶-۸ نمونه‌های سواحل گیلان، ستون ۹-۱۲ سواحل گلستان، ستون ۱۳-۱۵ ناحیه شمالی و ستون M مارکر



شکل ۴: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Alu I* بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه‌های سواحل مازندران، ستون ۶-۸ نمونه‌های سواحل گیلان، ستون ۹-۱۲ سواحل گلستان، ستون ۱۳-۱۵ ناحیه شمالی و ستون M مارکر



شکل ۵: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Dra I* بر روی ژل پلی اکریل آمید. ستون ۵-۱ نمونه‌های سواحل مازندران، ستون ۶-۸ نمونه‌های سواحل گیلان، ستون ۹-۱۲ سواحل گلستان، ستون ۱۳-۱۵ ناحیه شمالی و ستون M مارکر

#### RAPD -۲-۴

با توجه به اینکه پلی مرفیسم مشاهده شده از هضم آنزیمی نمونه های مورد بررسی از اختلاف معنی داری برخوردار نبود، تصمیم گرفته شد که با استفاده از پرایمرهای تصادفی و روش RAPD، نمونه ها مورد بررسی قرار گیرد. از اینرو تعداد ۱۹ پرایمر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی (جدول ۳) برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. از این تعداد پرایمر، ۱۰ پرایمر الگوهای باندهای چند شکلی را در بین نمونه های مورد بررسی نشان دادند (شکلهای ۶ تا ۱۵). جدول ۳ تعداد باندهای ایجاد شده توسط هر پرایمر را نشان می دهد. طی این بررسی در مجموع ۱۴۴ باند مشاهده گردیده که از این تعداد ۱۱۷ باند به عنوان باندهای ناهمسان در بین نمونه های مورد استفاده ظاهر شدند. با توجه به جدول ۳ پرایمر شماره ۱۵ بیشترین باند (۱۲ باند) و پرایمرهای شماره ۶، ۹، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ نیز کمترین باند را (۶ باند) را ایجاد نمودند. با توجه به جدول ۴ نمونه های ناحیه شمالی دریای خزر با ۴۹/۳۱ درصد دارای بیشترین باند های چند شکلی و نمونه های سواحل مازندران با ۴۷/۲۲ درصد دارای کمترین باند های چند شکلی بودند.

تعداد آللهای مشاهده شده و تعداد آللهای موثر در جدول ۵ خلاصه شده است. میانگین تعداد آللهای مشاهده شده و آللهای موثر در ناحیه شمالی بیشترین مقدار (۱/۴۹۲ و ۱/۳۰۴) و کمترین آن در سواحل مازندران بود. ضمن اینکه میانگین تعداد آللهای مشاهده شده و تعداد آللهای موثر در کل مناطق نمونه برداری شده، بترتیب ۱/۴۹۳ و ۱/۳۳۶ بود.

جدول ۳: تعداد باندهای ایجاد شده توسط هر یک از پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RAPD

| تعدادباند | توالی نوکلئوتیدهای پرایمر | شماره پرایمر |
|-----------|---------------------------|--------------|
| ۷         | ACT TGT GCG G             | ۱            |
| ۷         | TGG GCT CGC T             | ۲            |
| ۷         | CCC ACT GAC G             | ۳            |
| ۷         | GAG GCT GGA G             | ۴            |
| ۷         | GGT GGC GGG A             | ۵            |
| ۶         | GCT GCT GGA G             | ۶            |
| ۸         | GAG GTC CAG A             | ۷            |
| ۹         | ATG GGG TCG G             | ۸            |
| ۶         | GCT GCT GGA G             | ۹            |
| ۷         | CTT TCG TGC T             | ۱۰           |
| ۶         | CAA GGG AGG T             | ۱۱           |
| ۸         | GAG CTC GCG A             | ۱۲           |
| ۱۰        | CAA GGG AGG T             | ۱۳           |
| ۱۰        | GAG CTC GCG A             | ۱۴           |
| ۱۲        | GGG CTC GCG A             | ۱۵           |
| ۶         | GAG GGC AAG A             | ۱۶           |
| ۸         | TTC CCC CGG C             | ۱۷           |
| ۶         | GAG CAC CAG G             | ۱۸           |
| ۷         | CCT GGG CTT C             | ۱۹           |

جدول ۴: تعداد و درصد باندهای چند شکلی مشاهده شده در نمونه های شانه دار دریای خزر

| مناطق | مازندران | گلستان | گیلان | ناحیه شمالی | میانگین |
|-------|----------|--------|-------|-------------|---------|
| تعداد | ۶۸       | ۷۰     | ۶۹    | ۷۱          | ۷۲      |
| درصد  | ۴۷/۲۲    | ۴۸/۶۱  | ۴۷/۹۲ | ۴۹/۳۱       | ۵۰      |

براساس شاخص تنوع ژنتیکی Nei (Nei, 1973) میزان تنوع در نمونه های سواحل گلستان از ۰/۰۵ تا ۰/۱۱، در سواحل مازندران ۰/۰۱ تا ۰/۰۲، در سواحل گیلان ۰/۰۶ تا ۰/۱۸ و در نمونه های ناحیه شمالی دریای خزر از ۰/۱۲ تا ۰/۲۸ برآورد گردید. بر این اساس بیشترین تنوع در ناحیه شمالی دریای خزر مشاهده می گردد.

میانگین تنوع ژنتیکی در نمونه های سواحل مازندران، گیلان، گلستان و ناحیه شمال دریای خزر به ترتیب ۰/۱۳۹، ۰/۱۴۶، ۰/۱۳۳ و ۰/۱۷۲ بوده و میانگین تنوع ژنتیکی در کل مناطق نمونه برداری شده ۰/۱۸۹ بود (جدول ۵). همانگونه که جدول نشان میدهد بیشترین میانگین تنوع ژنتیکی مربوط به ناحیه شمالی دریای خزر بوده است.

براساس داده های جدول ۵، بیشترین میانگین میزان شاخص شانه در نمونه های ناحیه شمالی دریای خزر (۰/۲۵۶) و کمترین آن مربوط به سواحل گلستان بود (۰/۲۰۶). ضمن اینکه میانگین این شاخص در کل نمونه های مورد بررسی ۰/۲۵۶ محاسبه گردید.

فواصل ژنتیکی بین نمونه های شانه دار به صورت ماتریسی براساس فاصله ژنتیکی Nei برآورد شدند. جدول ۶ فواصل ژنتیکی نمونه های مورد بررسی را بین مناطق نمونه برداری نشان می دهد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه های شانه دار سواحل استان گلستان با ناحیه شمالی دریای خزر

جدول ۵: متوسط تعداد آللهای مشاهده شده، آللهای موثر، تنوع ژنتیکی و شاخص شانن در مناطق مختلف نمونه

برداری از شانه دار دریای خزر

| مناطق       | $h^{10}$ | $Ne^9$ | $Na^8$ | $I^7$ |
|-------------|----------|--------|--------|-------|
| مازندران    | ۰/۱۳۹    | ۱/۲۳۸  | ۱/۴۷۲  | ۰/۲۱۳ |
| گیلان       | ۰/۱۴۶    | ۱/۲۵۰  | ۱/۴۷۹  | ۰/۲۲۳ |
| گلستان      | ۰/۱۳۳    | ۱/۲۲۴  | ۱/۴۸۶  | ۰/۲۰۶ |
| ناحیه شمالی | ۰/۱۷۲    | ۱/۳۰۴  | ۱/۴۹۳  | ۰/۲۵۶ |
| میانگین     | ۰/۱۸۹    | ۱/۳۳۶  | ۱/۴۹۳  | ۰/۲۷۶ |

جدول ۶: فواصل ژنتیکی بین چهار منطقه نمونه برداری شده از شانه دار دریای خزر

| مناطق       | مازندران | گلستان | گیلان | ناحیه شمالی |
|-------------|----------|--------|-------|-------------|
| مازندران    | ۰/۰۰۰    | ۰/۹۹۶  | ۰/۹۹۸ | ۰/۹۲۶       |
| گیلان       | ۰/۰۰۱    | ۰/۹۹۶  | ۰/۰۰۰ | ۰/۹۳۱       |
| گلستان      | ۰/۰۰۴    | ۰/۰۰۰  | ۰/۰۰۴ | ۰/۹۱۵       |
| ناحیه شمالی | ۰/۰۷۶    | ۰/۰۸۹  | ۰/۰۷۲ | ۰/۰۰۰       |

<sup>7</sup> - Shannon's information index

<sup>8</sup> - Observed number of alleles

<sup>9</sup> - Effective number of alleles

<sup>10</sup> - gene diversity



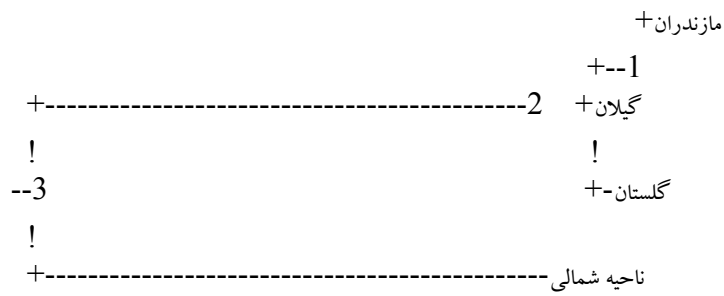
جدول ۷ میزان جریان ژنی را بین نمونه های شانه دار دریای خزر در مناطق مختلف نشان می دهد. میزان جریان ژنی بین سواحل مازندران و گیلان ۴/۴۵۰ و بین سواحل گلستان و ناحیه شمالی ۲/۱۲۴ بود.

جدول ۷: آنالیز Nei جهت محاسبه میانگین درجه تمايز ژنی و جریان ژنی در نمونه های شانه دار دریای خزر

| Nm <sup>11</sup> | G <sub>st</sub> | H <sub>s</sub> | H <sub>t</sub> | مناطق                |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------|
| ۴/۴۵۰            | ۰/۰۰۴           | ۰/۱۴۳          | ۰/۱۴۳          | مازندران و گیلان     |
| ۲/۱۲۴            | ۰/۱۹۱           | ۰/۱۵۳          | ۰/۱۸۹          | گلستان و ناحیه شمالی |
| ۲/۰۴۷            | ۰/۰۳۹           | ۰/۱۶۶          | ۰/۱۷۳          | بین تمام مناطق       |

ترسیم نمودارهای شجره ای نمونه های شانه دار در ۴ منطقه مورد بررسی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش UPGMA انجام گرفت. براساس نتایج حاصله (شکل ۱۶) نمونه های سواحل مازندران ، گیلان و گلستان در یک شاخه و نمونه های ناحیه شمالی دریای خزر در یک شاخه جداگانه قرار گرفت. ضمن اینکه در شاخه اول نیز نمونه های سواحل استان مازندران و گیلان مجدداً در یک شاخه و نمونه های سواحل استان گلستان در شاخه دیگر قرار گرفته است. بدین ترتیب خوشه ۱ شامل نمونه های شانه دار سواحل مازندران و گیلان ، خوشه ۲ شامل نمونه های سواحل استان گلستان ، همراه با خوشه ۱ و خوشه ۳ شامل نمونه های ناحیه شمالی با خوشه ۲ می باشد. طول هر یک از شاخه ها و نمونه های مورد بررسی در جدول ۸ آمده است. با توجه به داده های جدول ، بیشترین فاصله بین نمونه های ناحیه شمالی با خوشه ۳ بوده (۳/۹۴۴) و کمترین طول بین نمونه های سواحل مازندران و گیلان با خوشه ۱ بود.

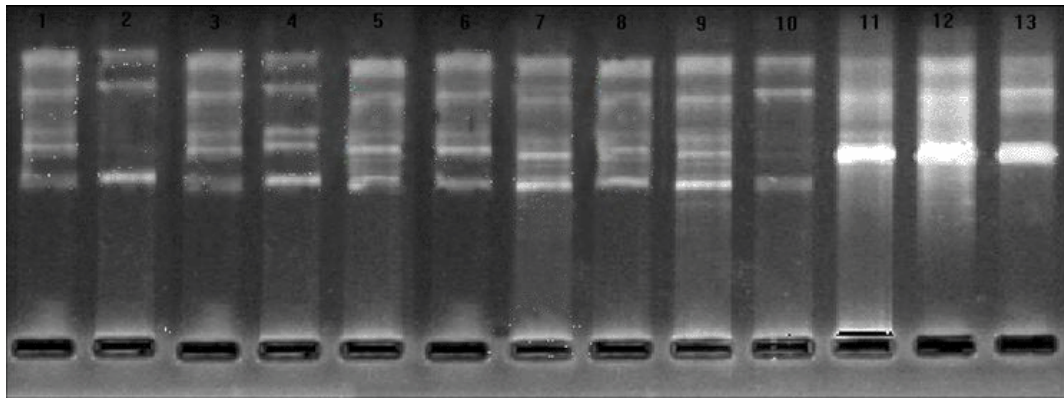
<sup>11</sup> - Gene flow



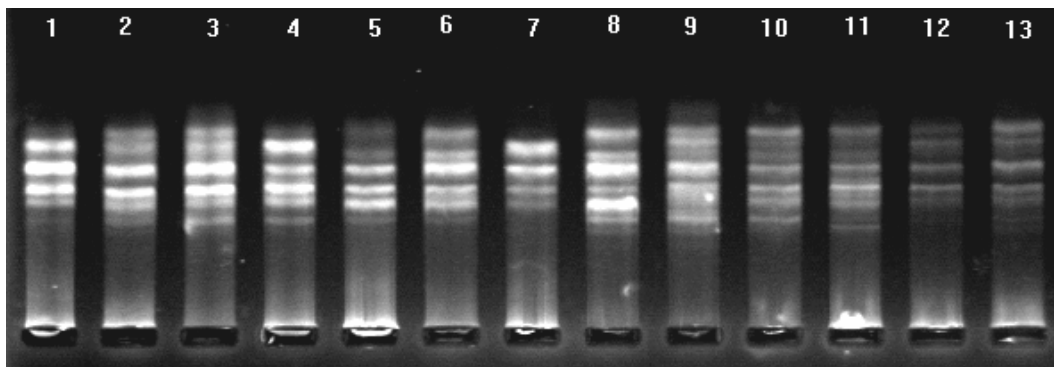
شکل ۶: نمودار شجره ای نمونه های شانه دار دریای خزر

جدول ۸ : طول هر یک از شاخه ها و مناطق نمونه برداری

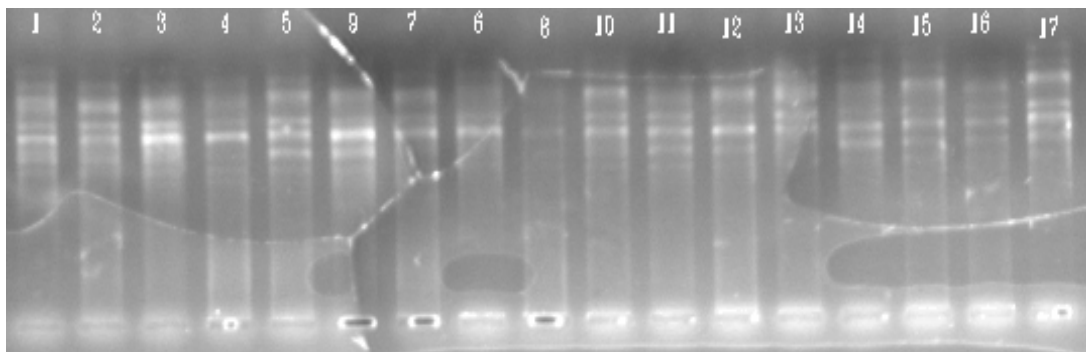
| خوشه | خوشه و جمعیت | طول   |
|------|--------------|-------|
| ۳    | ۲            | ۳/۷۵۱ |
| ۲    | ۱            | ۰/۱۲۸ |
| ۱    | مازندران     | ۰/۰۶۵ |
| ۱    | گیلان        | ۰/۰۶۵ |
| ۲    | گلستان       | ۰/۱۹۳ |
| ۳    | ناحیه شمالی  | ۰/۹۴۴ |



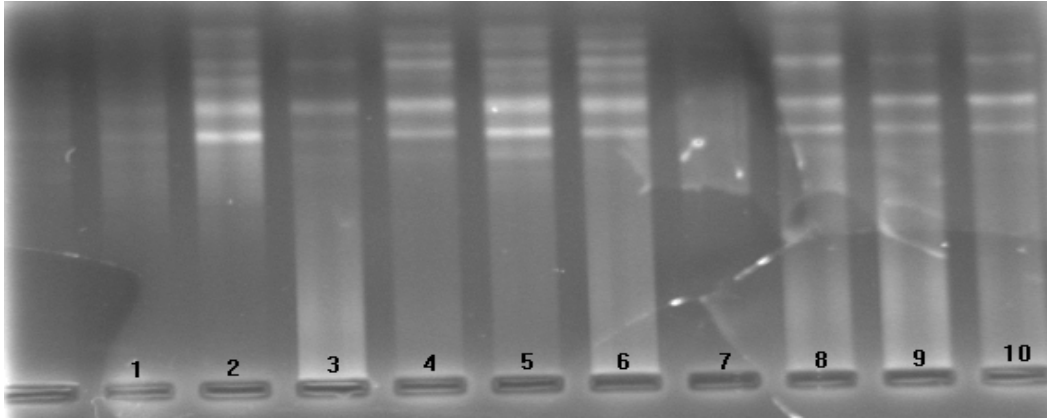
شکل ۶: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۱، ستون ۱-۴ سواحل مازندران، ستون ۵-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۱-۱۳ ناحیه شمالی



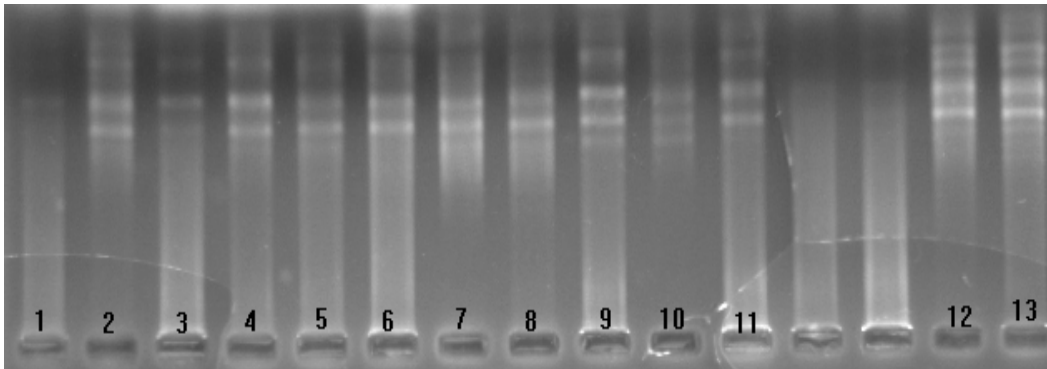
شکل ۷: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۲، ستون ۱-۴ سواحل مازندران، ستون ۵-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۱-۱۳ ناحیه شمالی



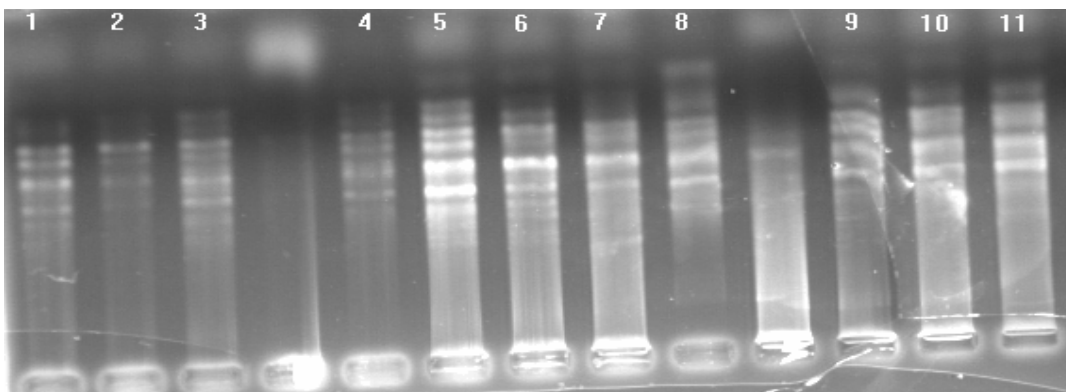
شکل ۸: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۳، ستون ۱-۵ سواحل سواحل مازندران، ستون ۶-۱۰ سواحل گیلان، ستون ۱۰-۱۴ سواحل گلستان، ستون ۱۴-۱۷ ناحیه شمالی



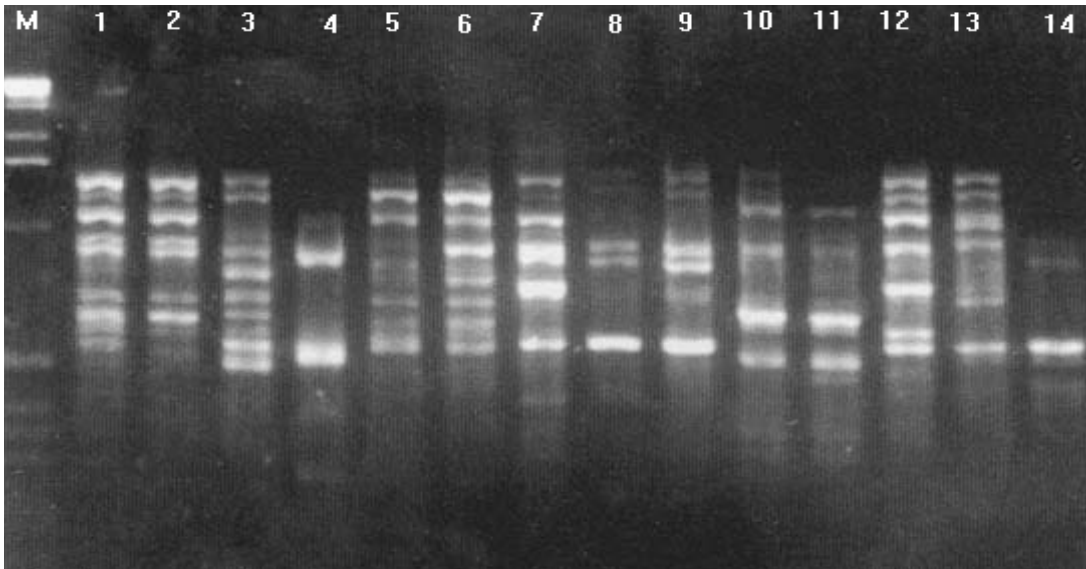
شکل ۹: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۴، ستون ۱-۳ سواحل مازندران، ستون ۴-۵ سواحل گیلان، ستون ۶-۸ سواحل گلستان، ستون ۹-۱۰ ناحیه شمالی



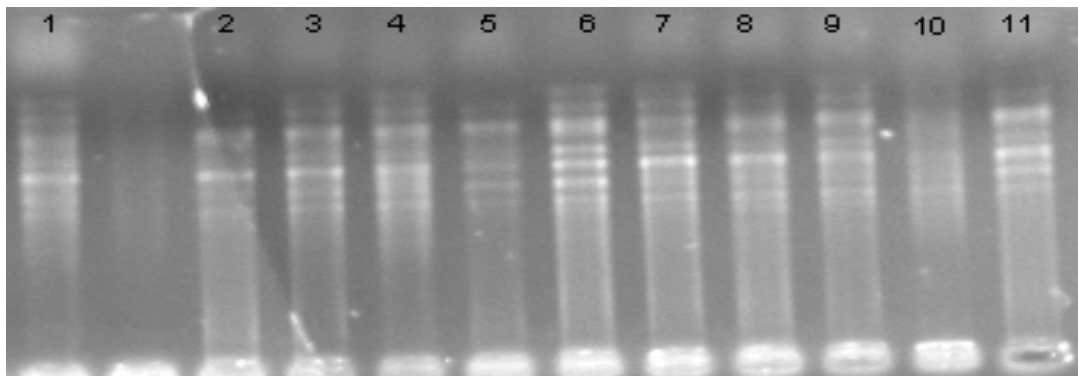
شکل ۱۰: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۵، ستون ۱-۴ سواحل مازندران، ستون ۵-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۱-۱۳ ناحیه شمالی



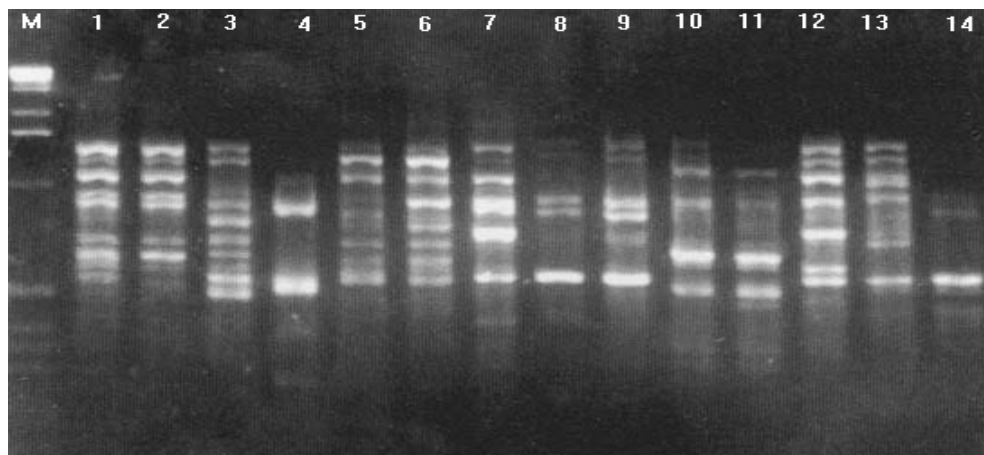
شکل ۱۱: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۶، ستون ۱-۳ سواحل مازندران، ستون ۴-۶ سواحل گیلان، ستون ۷-۹ سواحل گلستان، ستون ۱۰-۱۱ ناحیه شمالی



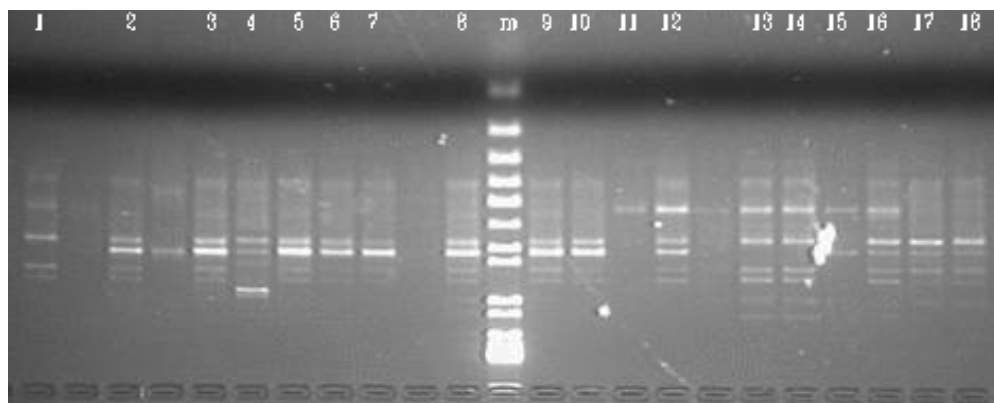
شکل ۱۲: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۷، ستون ۱-۴ سواحل مازندران، ستون ۵-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۱-۱۴ ناحیه شمالی



شکل ۱۳: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۸، ستون ۱-۳ سواحل سواحل مازندران، ستون ۴-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۹ سواحل گلستان، ستون ۹-۱۱ ناحیه شمالی



شکل ۱۴: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۹، ستون ۱-۴ سواحل سواحل مازندران، ستون ۵-۷ سواحل گیلان، ستون ۸-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۱-۱۴ ناحیه شمالی



شکل ۱۵: الگوی الکتروفورز پرایمر شماره ۱۰، ستون ۵-۱ سواحل مازندران، ستون ۹-۶ سواحل گیلان، ستون ۱۵-۱۰ سواحل گلستان، ستون ۱۸-۱۶ ناحیه شمالی

## ۵- بحث و نتیجه گیری :

در سالهای اخیر، پیشرفت های وسیعی در خصوص استفاده از تکنیک های مولکولی DNA به منظور شناسایی تغییرات ژنتیکی، در اکثر گونه ها صورت گرفته است (Isabel *et al.*, 1999). تکنیک RAPD در بین انواع متعدد شاخص های مولکولی، روش ساده و سریع در جهت شناسایی تفاوت های ژنتیکی بر اساس تکثیر نقاط ژنومی با استفاده از پرایمرهای تصادفی می باشد (Williams *et al.*, 1990).

همچنین طبق مطالعات انجام آنالیز mtDNA می تواند تفاوت های ژنتیکی بین گونه ها و یا جمعیت های درون گونه را آشکار ساخته و بنابراین از توان قابل ملاحظه ای جهت حل تناقض های رده بندی آبزیان برخوردار باشد (Nguyer & Nge, 2001; Rezvani gilkolaei *et al.*, 2007).

بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت ها و نیز بین افراد داخل جمعیت به دلیل تغییرات شرایط محیطی لازم و ضروری است (Sole- cava, 2001)

از آنجاییکه تفکیک جمعیت ها و شناسایی ذخایر ژنتیکی براساس داده های ریخت شناسی از ضریب اطمینان کمتری نسبت به داده های مولکولی برخوردار می باشد و از طرفی تفاوت های مورفولوژیک از ذخایر ژنومی هر ارگانسیم ناشی می شود، لذا در مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی و

براساس داده های جمع آوری شده از روش RAPD و تجزیه و تحلیل آماری ، بیشترین و کمترین درصد چند شکلی باندهای مشاهده شده به ترتیب مربوط به ناحیه شمالی و سواحل مازندران بود. با توجه به اینکه بیشترین درصد چند شکلی باندها مربوط به ناحیه شمالی دریای خزر می باشد ، چنین استنباط می گردد که نمونه های این منطقه دستخوش بیشترین تغییرات محیطی واقع شده است. تعداد آللهای مشاهده شده و تعداد آلل موثر در جدول ۵ خلاصه شده است. تعداد آللهای واقعی همان تعداد آللهای مشاهده شده برای یک جایگاه در یک جمعیت می باشد. از آنجاییکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه قرار می گیرد، مقایسه بین جمعیت هایی که تعداد نمونه های آنها متفاوت می باشد، باید با احتیاط صورت گیرد.

تعداد آللهای موثر برابر  $\frac{1}{F}$  می باشد که F نسبت هموزیگوت ها بوده و به عبارتی نسبت هموزیگوت ها معادل عکس تعداد آللهای موثر برای یک لوکوس در یک جمعیت خواهد بود. چون آللهای فراوانی یکسانی ندارند، تعداد آلل موثر از تعداد آلل واقعی کمتر است.

شاخص شانن نیز به عنوان یکی از معیارهای تنوع ژنی برای جمعیت ها مورد استفاده قرار می گیرد. مقایسه مقادیر هتروزیگوستی به عنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چند شکل همچون ریز ماهواره ها صحیح نبوده و تفاوتها در این سطح ، اطلاعات درستی را در دسترس قرار نمی دهند. با توجه به اینکه شاخص شانن در نمونه های مربوط به ناحیه شمالی دریای خزر بیشترین مقدار می باشد (۰/۲۵۶) ، می توان نتیجه گرفت که این ناحیه دارای بیشترین چند شکلی است. با در نظر



یکی از مشکلات در آنالیز ساختار جمعیتی مربوط به محاسبه مقدار جریان ژنی می باشد. جریان ژنی یکی از مهمترین معیار در تکوین ساختار جمعیتی گونه های مورد مطالعه می باشد (ایمانی فر، ۱۳۸۶). بطوریکه میزان آن بیانگر واحد تکاملی مستقل جمعیت های محلی یک منطقه می باشد (Slatkin, 1993). در صورتیکه جریان ژنی مابین جمعیت ها زیاد باشد، بیانگر تکامل گروهی آنها بوده و در صورتیکه کم باشد، نشانگر اینست که هر یک از جمعیت ها تقریباً بطور مستقل از یکدیگر تکامل می یابند. بنابراین تفاوت های بالای ژنتیکی مابین جمعیت ها زمانی رخ می دهد که میزان جریان ژنی کمتر از یک باشد و اگر میزان جریان ژنی بزرگتر از یک باشد، بیانگر اینست که جریان ژنی بحدی زیاد است که موجب جلوگیری از تفاوت های ناشی از انتخاب طبیعی می شود (Ackerman, 2001, Tremblay & )

بنابراین میزان جریان ژنی بدست آمده در این بررسی برای تمام مناطق نمونه برداری (۲/۰۴۷) بیانگر اینست که جریان ژنی بحدی است که باعث عدم بروز تفاوت ژنتیکی بالا می گردد.

همانگونه که ذکر گردید، نمونه های شانه دار ناحیه شمالی دریای خزر دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی نسبت به سایر مناطق بود (۰/۲۵۶) که این امر می تواند حاکی از بروز تفاوت های ژنتیکی بعلا متفاوت بودن خصوصیات اکولوژیکی منطقه نسبت به سایر مناطق باشد.

تجزیه تحلیلهای انجام شده نشان می دهد که اثرات درجه حرارت، شوری، دسترسی به شکار و شکارچی از مهمترین عوامل موثر در جمعیت شانه دار می باشد (Maro et al., 2006; Shiganova et al., 2001). با توجه باینکه ناحیه شمالی دریای خزر از نظر عمق، شوری، و دما با نواحی میانی و جنوبی متفاوت می باشد، افراد این ناحیه دارای ساختار ژنتیکی متفاوت با سایر مناطق دریای خزر بوده که

*Mnemiopsis leidyi* در دامنه وسیعی از زیستگاههای دریائی قادر به زندگی است و در درجات متفاوت شوری، دما و کیفیت آب یافت می شود. گرچه که این موجود می تواند دامنه وسیعی از تغییرات دما و شوری را تحمل نماید، اما خصوصیات بوم شناختی آن در اکوسیستم های مختلف سراسر جهان ممکن است کاملاً با ویژگی های این جاندار در دریای خزر متفاوت باشد.

آنچه که از میزان فواصل ژنتیکی و برخی خویشاوندی نمونه های شانه دار استنباط می شود، اینست که نمونه های سواحل مازندران و گیلان از شباهت ژنتیکی نسبتاً بالائی برخوردار بوده و نمونه های سواحل گلستان نیز از شباهت ژنتیکی نسبتاً کمتری نسبت به دو استان دیگر برخوردار است. نمونه های شانه دار ناحیه شمالی دریای خزر با توجه باینکه در شاخه مجزائی قرار گرفته، از تنوع ژنتیکی نسبتاً متفاوتی نسبت به سایر نمونه ها برخوردار می باشد.

این موضوع بیانگر این است که شانه دار دریای خزر ممکن است از منابع واحد و یا جمعیت واحد به طریقی وارد دریای خزر شده و بعدها با توجه به شرایط مناسب دریای خزر دچار تغییرات ژنتیکی شده و یا اینکه این گونه از ابتدا از منابع متفاوتی وارد دریای خزر گردیده و متناسب با شرایط زیستی خود، در سرتاسر دریای خزر پراکنده شده است.

با توجه به موارد فوق و وجود تفاوت ژنتیکی معنی دار بین نمونه ها، می توان عنوان نمود که جمعیت واحدی از شانه دار در دریای خزر وجود نداشته و حداقل دو جمعیت از این گونه در دریای خزر زیست می کند. بطور کلی با توجه به فرضیه تحقیق و نتایج بدست آمده پرایمرهای RAPD می توانند تنوع ژنتیکی را در بین نمونه های مختلف شانه دار در ناحیه شمالی و جنوبی دریای خزر آشکار سازند.

در این رابطه پیشنهاد می گردد، این تحقیق بصورت گسترده تر با جمع آوری نمونه هائی از نواحی شمالی و میانی دریای خزر و همچنین از دریای سیاه انجام تا بتوان براساس نتایج بدست آمده جمعیت های بیشتری شناسایی نمود.

## منابع :

- ایمانی فر، امین. ۱۳۸۶. بررسی تفاوت های ژنتیکی استرین های دوجنسی و پارتنوژنز آرتیمیا در دریاچه ارومیه به روش PCR-RAPD. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۶۵ صفحه
- باقری، سیامک. سبک آرا، جلیل. روحی، ابوالقاسم. پرافکنده حقیقی، فرخ. قاسمی، شهرام. رضوی، بهرامعلی. (۱۳۸۴). بررسی فراوانی و پراکنش شانه داران در حوزه جنوبی دریای خزر (سواحل استان گیلان). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۲ صفحه
- روحی، ابوالقاسم. نادری، مهدی. واحدی، فریبا. قاسمی، شهرام. افراپی، محمد علی. باقری، سیامک. رستمیان، محمد تقی (۱۳۸۶). بررسی فراوانی و پراکنش شانه داران و امکان مبارزه بیولوژیک با آنها در حوزه جنوبی دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۳ صفحه.
- Bridge, D.; Cunningham, C.W.; Schierwater, B.; Desalle, R. and Buss, L.W.; 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol.89, pp.8750–8753.
- Cronin, M. A.; Hilis, S., Born, E. W. and potton, C., 1994. mtDNA variation in atlantic and pacific waleruses. *Gen. 3. 2001. 72, pp. 1035-1043*
- Excoffer, L., Smouse, P., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics 131, 479-491.*

- Fevolden, S.E. and Pogson, G.H. (1997). Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian Coastal and North – east Arctic population of Atlantic Cod. *J. of fish Biology*. 51: 895-908
- Ivanov PI,,AM Kamakim,VB Ushitzhev,T.Shiganova ,O.Zhukova, N.Aladin, S.I., Wilson,G.R., Harbison,Hj Dumont. 2000 .Invasion of Caspian Sea by the comb jellyfish *Mnemiopsis leidyi* (ctenophore).*Biological Invasions* 2:255-258.
- Isabel , N.,J. Beaulieu, P.Theriault & J.Bousquet, 1999.Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8:477-483.
- Kideys, A.E.S., Ghasemi, D., Ganinejad, A., Roohi, A., and Bagheri, S., 2001. Strategy for combating *Mnemiopsis* in the Caspian Waters of Iran , *Final Report*.
- Konsulov,A.S.& Kamburska, L.T., 1998. Ecological determination of the new Ctenophore – *Beroe ovata* invasion in the Black Sea. *Proc. Inst. Oceanol .Varna* 2:195-198.
- Marco, M., Faasse, A., and Bayha, M., 2006. The ctenophore *Mnemiopsis Leidy* A.Agassiz 1865 in coastal waters of the Nether lands : an unrecognized invasion *Aquatic Invasions . volume 1 , Issue 4 :270-277 .*
- McDermott, J.M., and McDonald , B.A.,1993: Gene flow in plant pathosystems. *Ann.Rev.Phytopathy*. 31:353-373.
- Medlin, L.; Elwood, H.J.; Stickel, S. and Sogin, M.L., 1998. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene. Vol. 71, pp.491–499.*
- Mircea, P., Steven, H. D., Mitchell, L., 2001. A molecular phylogenetic farme work for the phylum ctenophora using 18s rRNA *Geneso Molecular phylagenetics and Evaluation. Vol. 21, No. 2, pp. 218-230*
- Mills, C., 2001. Phyllum ctenophora list of all valid species, *science* 238 : 933-937.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321-3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nguyan, V.H. & Ngo, S.V. (2001) . Vietnamese freshwaters fish, cyprinid famil. *Agriculture publish house, Hanoi, Vietnam. Pp. 584- 70.*

- Panaud, O., Chen, X. and McCouch, S.R., 1996. Development of microsatellite markers and characterization of single sequence length polymorphism (*SSLP*) in rice *Gen Genet* 252: 597-607
- Podar, M.; Haddock, S.H.D.; Sogin, M.L. and Harbison, G.R.; 2001. A molecular phylogenetic framework for the phylum Ctenophora using 18S rRNA genes. *Molecular phylogenetic and Evolution*. Vol.21, pp.218-230.
- Rezvani gilkolaei, S., imanifar, A., Aghili, R., Laloei, F., (2007). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* , 86,1463-1467
- 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*, 72:47-62
- Shiganova, T.A.,Mirzoyan,2.A.,Studenikina, E.A., Volovik , S.P. Zervoudaki, So, Cristou, E.D., Skirta, A.Y.,Dumont, H.J.,(2001) Population development of the invader ctenophore *Mnemiopsis Leidy* , in the Black sea and in the others sea of the Mediterranean basin, *marine Biology* . 139:431-445
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population . *Evolution*, 47: 264-279
- Sole-Cava, A.J.,2001.Biodiversity molecular e genetica conservaco. In Matioli, S.R. (ed),*Biologia Molcular e Evolucao* . (Ist edn ).*Holos, Ribeirao Preto* 171-190.
- Williams, J.G.K., Kubelic, AR, Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. *Univ. of Illinois Press, Urbana*.
- Sivasundar, A. and Biemann, C. H.; 2005. Genetic evidence of postglacial population expansion in Puget sound rockfish (*Sebastes emphaeus*). *Marine Biotechnology*. Vol.7, pp.223-230.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.,1999. Popgene . *Version 1.31*



## Abstract :

### **An Ecological investigating on controlling *Mnemiopsis leidyi* population Activity 6: Molecular Test in identification of *Mnemiopsis leidyi***

In this study population genetic structure of *Mnemiopsis leidyi* were examined by 200 samples from the Caspian Sea . Samples were collected from Guilan province (Astara region), Mazandaran province (Amir abad region) , Golestan province (Gomishan region) and north part of the Caspian Sea. 50 samples were collected from each region.

DNA was extracted by phenol - chlorophorm method and its concentration was 50 to 100 nanogram . PCR was performed using 18s rRNA gene.

The PCR products of samples were digested by 12 restriction endonuclease enzymes. The digested products accompanied with standard marker (50 bp ladder ) . in order to measure fragment size samples were run on a 6% vertical polyacrylamide gel. The fragments were visualized by silver staining of the polyacrylamide gel.

In this study, *Dra I* and *Alu I* enzymes showed different digestion pattern, as each of these enzymes had two genotypes. Other enzymes had similar digestion pattern.

RAPD method used by 19 random primers. Ten of nineteen primers showed polymorphisme patterns. Statistical analysis of data was performed by Popgene software. In this study, The maximum of genetic variation was in north of the Caspian Sea. Also, The maximum of genetic distance was between north area and Golestan coasts(0.089) and The minimum of genetic distance was between Mazandaran and Guilan coasts(0.001). The UOGMA dendogram showed two clusters. The samples of Mazandaran , Guilan and Golestan coasts placed in one cluster and samples of north area in other cluster The genetic diversity was significantly different between samples of north area and Golestan coasts ( $p \leq 0.05$ ). As result, there is a significant genetic divergence between some of samples. Therefore , two genetic group of *Mnemiopsis leidyi* were identified in the Caspian Sea.

Key word: RFLP, RAPD, *Mnemiopsis leidyi*, Genetic variation, Caspian Sea