Archive of SID

بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP

فرامرز لالوئی [۱] ؛ سهراب رضوانی گیل کلائی [۲] ؛ محجوبه نیرانی [۳] و محمد جواد تقوی [۴]

laloei@yahoo.com

۱، ۳ و۴ - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

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

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۴

چکیده

در این بررسی ۱۰۰ عدد ماهی کیلکای معمولی از حوضه جنوبی دریای خزر (۵۰ عدد از منطقه امیرآباد در استان مازندران و ۵۰ عدد از منطقه بندر انزلی در استان گیلان) جمع‌آوری گردید. DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت باله ماهی استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر از توالی نوکلئوتیدهای ناحیه D-Loop مولکول mtDNA انجام شد که در نتیجه آن محصول PCR در کلیه نمونه‌ها حدود ۱۰۱۵ جفت باز بدست آمد. جهت هضم آنزیمی محصول PCR از ۱۳ آنزیم اندونوکلئاز استفاده شد. الگوهای هضم آنزیمی برروی ژل پلی‌اکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردیدند. از ۱۳ آنزیم مورد استفاده، ۵ آنزیم (*Nde II, Mae III, Msp I, Hae III, Acy I*) الگوهای پلی مورفیک را نشان دادند که در نتیجه آن ۹ هاپلوتیپ مختلف بدست آمد. فاصله ژنتیکی بین هاپلوتیپها از ۰/۰۰۷۳ تا ۰/۰۳۶۹ متغیر بود. میا نگین عددی تنوع هاپلوتیپها ۰/۰۰۰۶۸ ± ۰/۷۳۳۹ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۹۸ بود. همچنین اختلاف نوکلئوتیدی بین جمعیت ها ۰/۰۱ درصد بود.

براساس نتایج حاصله و آنالیز آماری داده‌ها، تفاوت بین هاپلوتیپ‌ها معنی‌دار بود ($P \leq 0/01$) و بنابراین می‌توان گفت ساختار ژنتیکی متفاوتی بین دو منطقه نمونه‌برداری مشاهده گردیده است.

لغات کلیدی: ماهی کیلکا معمولی، *Clupeonella cultriventris*، PCR-RFLP ، تنوع ژنتیکی، دریای خزر

مقدمه

شناسایی گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها در برنامه‌های بهره برداری از ذخایر آبزیان دریایی ، برنامه های آبزی پروری و اصلاح نژاد دارای اهمیت زیادی می‌باشد (Lin *et al.*, 2002). در سالهای اخیر پیشرفت علم ژنتیک و نشانگرهای ژنتیکی به یاری متخصصین آمده و به ابزاری قابل اعتماد و مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی و ژنتیک جمعیت تبدیل گردیده است. روش استفاده از تفاوت درتوالیهای DNA از جمله دقیق‌ترین روش در طبقه‌بندی موجودات بوده و بدور از هر گونه اشتباه می‌باشد (Hedrick, 1999).

www.SID.ir

Archive of SID

امروزه تکنیک‌های متکی بر PCR از قبیل RAPD (Williams *et al.*, 1990)، ماکروستلایت و مینی ستلایتها (Panaud *et al.*, 1996) ، RFLP (Cronin *et al.*, 1994) تعیین توالی نوکلئوتید رشته‌های DNA و ... جهت بررسی و شناسایی ژنوتیپ گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف بکار می‌روند.

هر چند که روش مستقیم تعیین توالی DNA بسیاری از مشکلات محققین را بر طرف نموده ولی اصولاً این روش گران و زمان بر می‌باشد. آنالیز RFLP نسبت به شناسایی توالی DNA بسیار اقتصادی‌تر بوده و نسبت به داوری براساس صفات مورفولوژیک بسیار موفق‌تر و دقیق‌تر می باشد. طی سالهای اخیرRFLP تکنیکی مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین مارکرهای ژنتیکی گونه‌ها و آنالیز جمعیت‌ها بوده است (Cronin *et al.*, 1994 ; Rezvani Gilkolaei, 2000 Imsiridou). و همکاران (۱۹۹۸) اختلاف ژنتیکی و روابط فایلوژنی ماهی Chub یونانی (*Leuciscus cephalus*) را با استفاده از آنالیز RFLP بررسی نمودند. آنان با استفاده از توالی ناحیه D-Loop و سیتوکروم b روابط سیستماتیک و فیلوژنی ۱۲ جمعیت از ماهی Chub را مشخص کردند. Grant وهمکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی و روابط فایلوژنی را بین ماهیان ساردین (*Clupeid sardinops*) ژاپن، استرالیا و آفریقای جنوبی با روش آنالیز RFLP و تکثیر ناحیه D-loop و ژن سیتوکروم b انجام دادند.

Waters و همکاران (۲۰۰۰) اختلافات ژنتیکی ماهی *Alosa sapidissima* (گونه‌ای از شگ ماهیان، جنس *Alosa*) را با استفاده از mtDNA و ماکرو و مینی ستلایت‌ها مطالعه نمودند.

علاوه بر این Gross و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از آنالیز PCR–RFLP و ژنهای ND-3/4 و ND- 5/6 ژنوم میتوکندری ، روابط ژنتیکی بین دو زیر گونه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio carpio* , *C. carpio haemotopterus*) را در اروپا و آسیای شرقی مورد مطالعه قرار داده‌اند.

در دریای خزر سه گونه از کیلکا ماهیان بنام کیلکا آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*)، چشم درشت (*C. grimmi*) و کیلکای معمولی (*C. cultriventris*) زیست می‌نمایند. ترکیب گونه‌ای کیلکا ماهیان در صید تجاری شامل ۹۱/۸۱ درصد کیلکای آنچوی، ۶/۸۴ درصد کیلکای چشم درشت و ۱/۳۵ درصد کیلکای معمولی است (فضلی و همکاران، ۱۳۸۱).

کیلکای معمولی در بین سه گونه، بیشترین قابلیت مطابقت با شرایط اکولوژیک دریای خزر را از خود نشان داده و بعبارتی کمترین لطمه به ذخایر آن وارد شده است. از این رو ماهی کیلکای معمولی از نظر بیولوژی، رفتارشناسی، تغذیه، مهاجرت و جمعیت شناسی مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق ذخایر این گونه به روش مولکولی و با استفاده از توالی ناحیه D-Loop مولکول mtDNA مورد بررسی قرار گرفته تا وجود جمعیتهای متعدد احتمالی در مناطق غرب و شرق حوضه جنوبی دریای خزر روشن و ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت مشخص گردد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری با استفاده از لنجهای صیادی مجهز به تورهای قیفی و لامپ در مناطق شرقی (محدوده امیرآباد با طول جغرافیایی ″۲۴،′ ۱۴ ،°۵۳ و عرض جغرافیایی ″۶۷،′۵۹،°۳۶) و در مناطق غربی (محدوده بندر انزلی با طول جغرافیایی ″۲۸،′۳۲،°۴۹ و عرض جغرافیایی ″۵۴،′۳۶،°۳۷) حوضه جنوبی دریای خزر انجام شده است. صید ماهیان در حدود بین اعماق ۶۰ تا ۸۰ متر انجام شده است. پس از صید، باله دمی مربوط به ۵۰ عدد ماهی از منطقه شرق و ۵۰ ماهی از منطقه غرب آبهای حوضه جنوبی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزرمنتقل شد.

استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل-کلروفرم انجام گردید (Fevolden & Pogson, 1997). جهت بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم برماید استفاده شد.

واکنش PCR جهت ازدیاد ناحیه D-Loop مولکول mtDNA از یک جفت پرایمر طبق روش Lee و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گردید. توالی نوکلئوتیدهای پرایمرها بشرح زیر می باشد:

www.SID.ir

Archive of SID

Primer Forward: 5 ′ - CCT AAT CTC TGG CGA CAC G C – 3′

Primer Reverse: 5 ′ - GCT ACA CTA GCC ACA CAC TA – 3′

پیش‌بینی می‌شود محصول PCR با استفاده از این پرایمرها، ۱۰۱۷ جفت باز باشد.

PCR با استفاده از ۵µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، یک واحد آنزیم *Taq DNA polymerase*، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ mM، از هر پرایمر۰/۲µM، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول به ۵۰µl برسد، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: Denaturation ۹۴درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، Annealing ۵۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و Extension ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰bp DNA و الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید.

برای هضم آنزیمی محصول PCR نمونه‌ها (آنالیز RFLP) از ۱۳ آنزیم *Mae III ،Hinf I ،Bcn I ،Taq II ،Mbo I ،Alu I ،Alw 26I ، Msp I ،Hac III ،Acy I ، Dde II ،Eco 47I* و *Mbo II* استفاده شده است. الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشخص گردید.

انتخاب آنزیمها و تجزیه و تحلیل داده با استفاده از نرم‌افزارهای Generun و Reap انجام شد. در بحث آماری فاصله ژنتیکی، تنوع هاپلوتیپ‌ها و نوکلئوتیدها و اختلاف نوکلئوتیدها محاسبه گردید. همچنین مشابه‌سازی سری‌های هاپلوتیپ نمونه‌ها با استفاده از تست Monte-Carlo simulation X^2 انجام شد (Roff & Bentzen, 1989).

نتایج

قطعات تکثیر یافته ناحیه D-Loop مربوط به مولکول mtDNA در تمامی نمونه‌ها، حدود ۱۰۱۵ جفت باز بود (شکل۱). ۵ آنزیم از ۱۳ آنزیم مورد استفاده (*Nde II, Acy I, Hae III, Msp I, Mae III*) الگوهای پلی‌مورفیک را نشان داده (جدول ۱، شکلهای ۲ و۳) و سایر آنزیمها دارای الگوهای مشابه در تمام نمونه‌ها بودند. الگوهای هضم آنزیمی محدود کننده، ۹ هاپلوتیپ متفاوت را در ۱۰۰ عدد از کیلکای معمولی متعلق به آبهای منطقه شرقی و غربی حوضه جنوبی دریای خزر نشان داد (جدول۲). همچنین فاصله ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌های مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است.

براساس داده‌های جدول۳ بیشترین فاصله تکاملی بین هاپلوتیپ ABABA با AAACA (۰/۰۳۶۹) و کمترین فاصله بین هاپلوتیپ AAAAA با ABAAA (۰/۰۰۷۳) بوده است.

تنوع هاپلوتیپ‌ها در آبهای منطقه بندر انزلی ۰/۷۱۵۱±۰/۰۴۶۲ و در منطقه امیرآباد ۰/۷۵۲۷ ±۰/۰۴۷۰۷ بوده و تنوع نوکلئوتیدی داخل جمعیتها بترتیب ۰/۰۱۰۵۴۵ و ۰/۰۰۸۵۴۰ بوده است. علاوه بر این تنوع نوکلئوتیدی بین جمعیتها ۰/۰۰۹۹ و درصد اختلاف نوکلئوتیدها (Nucleotid divergence) در بین جمعیت‌ها ۰/۰۱ درصد بوده است. همچنین اختلاف نوکلئوتیدی جمعیت‌ها بین مناطق نمونه‌برداری نیز ۰/۰۱ درصد بود.

مشابه‌سازی سری‌های هاپلوتیپ نمونه‌ها با استفاده از تست Monte-carlo simulation X^2 انجام شد (Roff & Bentzen, 1989). آنالیز آماری داده‌های فوق نشان داد که تکرار هاپلوتیپ‌های mtDNA در دو منطقه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری دارند ($P \leq ۰/۰۱$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: اندازه قطعات ایجاد شده و الگوهای هضم آنزیمی ناحیه D-Loop با آنزیمهای *AcyI ,HaeIII ,MspI ,MaeIII, NdeII* در ماهی کیلکای معمولی حوضه جنوبی دریای خزر

	AcyI		*HaeIII*		*MspI*		*MaeIII*			*NdeII*		
ژنوتیپ	*A*	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*	*C*	*A*	*B*	*C*
طول قطعات	۸۰۰			۷۰۰	۵۷۰	۵۷۰	۵۰۰		۵۰۰			۷۵۵
(bp)		۶۰۰	۴۰۰		۴۰۰			۳۶۰		۵۳۰	۵۳۰	
	۲۱۵	۲۱۵	۳۲۵	۳۲۵		۲۶۰		۳۲۰	۳۲۰		۳۳۰	
		۲۰۰	۲۹۰			۱۴۰	۲۰۰		۲۰۰	۲۲۰		
					۵۰	۵۰	۱۳۵	۱۳۵		۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰
							۱۰۰	۱۰۰		۱۰۰		۱۰۰
							۷۰	۷۰				

جدول ۲: فراوانی و درصد هاپلوتیپهای مربوط به ناحیه D-loop هضم شده با آنزیمهای *Nde II, Mae III, Msp I, Hae III, Acy I* در کیلکای معمولی حوضه جنوبی دریای خزر

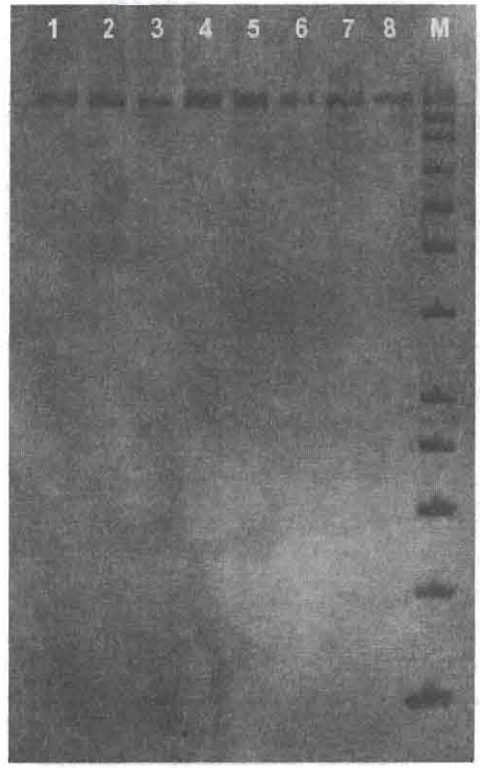
ردیف	هاپلوتیپ	تعداد		جمع	درصد
		منطقه غرب	منطقه شرق		
۱	AAAAA	۲۳	۲۲	۴۵	۴۵
۲	AAAAB	۱	۷	۸	۸
۳	AAABA	۱۲	۹	۲۱	۲۱
۴	AABAA	۷	۵	۱۲	۱۲
۵	ABAAA	۳	۰	۳	۳
۶	BAAAA	۴	۰	۴	۴
۷	ABABA	۰	۲	۲	۲
۸	AAACA	۰	۳	۳	۳
۹	AAAAC	۰	۲	۲	۲
جمع		۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: فاصله ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌های مختلف در جمعیت کیلکای معمولی حوضه جنوبی دریای خزر (مثلث بالایی مربوط به انحراف استاندارد و مثلث پائین مربوط به فاصله ژنتیکی می‌باشد).

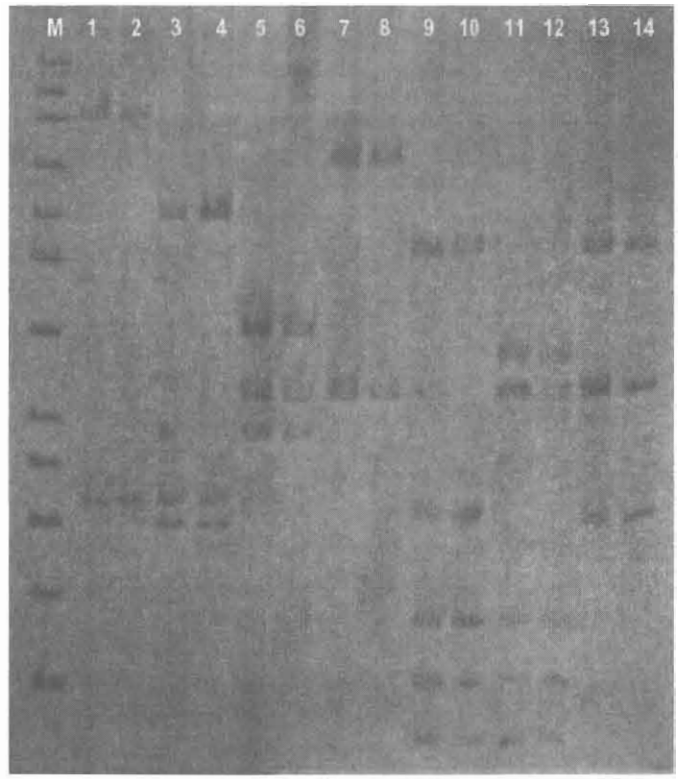
هاپلوتیپ	*AAAAA*	*AAAAB*	*AAABA*	*AABAA*	*ABAAA*	*BAAAA*	*ABABA*	*AAACA*	*AAAAC*
AAAAA		۰/۱۳۹۰	۰/۰۱۸۲	۰/۰۱۲۸	۰/۰۱۲۸	۰/۰۲۰۵	۰/۰۲۲۱	۰/۰۲۱۳	۰/۰۱۳۹
AAAAB	۰/۰۰۷۸		۰/۰۲۳۱	۰/۰۱۸۵	۰/۰۱۸۵	۰/۰۲۴۹	۰/۰۲۶۰	۰/۰۲۵۹	۰/۰۱۶۶
AAABA	۰/۰۱۲۱	۰/۰۲۰۳		۰/۰۲۲۱	۰/۰۲۲۱	۰/۰۲۷۲	۰/۰۱۲۸	۰/۰۲۷۶	۰/۰۲۳۱
AABAA	۰/۰۰۷۳	۰/۰۱۷۲	۰/۰۱۹۱		۰/۰۱۷۲	۰/۰۲۳۸	۰/۰۲۴۷	۰/۰۲۴۸	۰/۰۱۸۵
ABAAA	۰/۰۰۷۳	۰/۰۱۷۲	۰/۰۱۹۱	۰/۰۱۵۸		۰/۰۲۳۸	۰/۰۱۷۸	۰/۰۲۴۸	۰/۰۱۸۵
BAAAA	۰/۰۱۰۷	۰/۰۱۸۶	۰/۰۲۲۴	۰/۰۱۷۵	۰/۱۷۵		۰/۰۲۹۷	۰/۰۲۹۷	۰/۰۲۴۹
ABABA	۰/۰۱۹۲	۰/۰۲۸۳	۰/۰۰۷۳	۰/۰۲۷۴	۰/۰۱۱۵	۰/۰۲۸۹		۰/۰۳۰۳	۰/۰۲۶۰
AAACA	۰/۰۱۴۳	۰/۰۲۳۲	۰/۰۲۹۹	۰/۰۲۱۸	۰/۰۲۱۸	۰/۰۲۵۲	۰/۰۳۶۹		۰/۰۲۵۹
AAAAC	۰/۰۰۷۹	۰/۰۱۱۴	۰/۰۲۰۳	۰/۰۱۷۲	۰/۰۱۷۲	۰/۰۱۸۶	۰/۰۲۹۳	۰/۰۲۳۲	



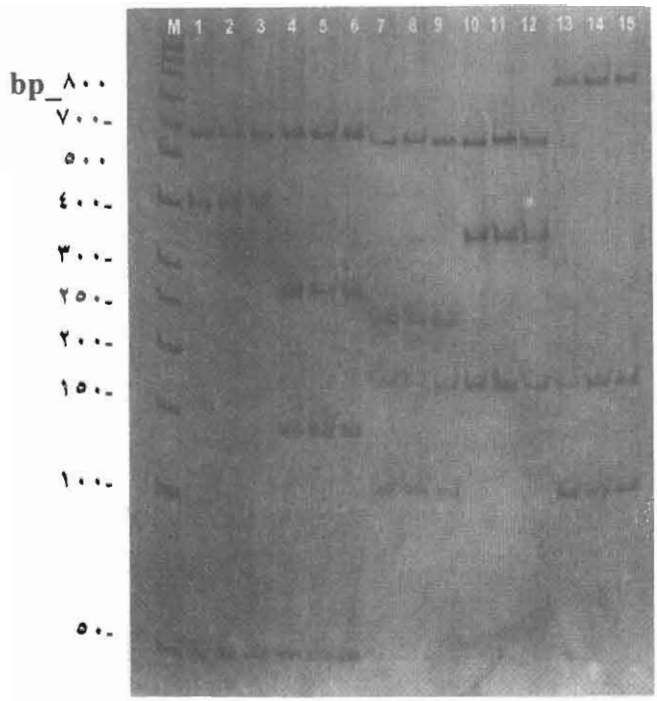
شکل ۱: محصول PCR نمونه‌های کیلکای معمولی بر روی پلی اکریل آمید، ستون M مارکر معمولی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: الگوهای هضم آنزیمی ناحیه D-Loop ماهی کیلکای معمولی، ستون M مارکرمولکولی،
ستون ۴-۱ :آنزیم *AcyI*،
ستون ۸-۵ : آنزیم *HaeIII*،
ستون ۱۴-۹: *MaeIII*



شکل ۳: الگوهای هضم آنزیمی ناحیه D-Loop ماهی کیلکای معمولی،
ستون M مارکر مولکولی،
ستون ۶-۱ :آنزیم *MspI*،
ستون ۱۵-۷ : آنزیم *NdeII*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

آگاهی از میزان ذخایر توارثی و تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد می‌باشد. استفاده توام از داده های ریختی و داده های ژنی می تواند برای توضیح فرآیندهای تکاملی به جز رانش ژنی مورد استفاده قرار گیرد (Avis, 2000). خصوصیات ظاهری ضرورتاً یک راهنمای خوب برای تشخیص تغییرات ژنتیکی نیست. اعضای یک نژاد یا جمعیت ممکن است برحسب ظاهر شبیه بهم ولی از لحاظ ژنتیکی کاملاً با هم متفاوت باشند. متقابلاً برخی از نژادها ممکن است خیلی متفاوت به نظر برسند ولی از لحاظ ژنتیکی نزدیک بهم باشند (Barker *et al.*, 1997). مولکول mtDNA می‌تواند اطلاعات گذشته را که مربوط به چگونگی انتخاب از اجزاء می‌باشد را در خود نگه دارد. اصولاً اختلاف ژنتیکی بین جمعیتها در نتیجه جمع شدن و انبوه شدن افراد در یک منطقه می‌باشد (Gyllensten & Wilsan, 1986).

در تحقیق حاضر، تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدهای ناحیه D-Loop ماهی کیلکای معمولی مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی تعداد ۸۲ نوکلئوتید که حدود ۸ درصد ژن مورد نظر را شامل می‌شود، بطور غیرمستقیم مورد مطالعه قرار گرفته است. فاصله ژنتیکی در افراد مورد مطالعه (هاپلوتیپها) بین ۰/۰۰۷۳ تا ۰/۰۳۶۹ متغیر بوده است. از ۹ هاپلوتیپ مشاهده شده، هاپلوتیپ‌های AAAAA (۴۵درصد)، AAAAB (۸درصد)، AAABA درصد (درصد ۲۱) و AABAA (۱۲ درصد) در هر دو منطقه نمونه‌برداری مشترک و هاپلوتیپ‌های ABAAA (۳ درصد) و BAAAA (۴ درصد) به تنهایی در منطقه شرق و هاپلوتیپ‌های ABABA (۲ درصد)، AAACA (۳ درصد) و AAAAC (۲ درصد) در منطقه غرب حوضه جنوبی دریای خزر مشاهده گردیدند. همانگونه که ملاحظه می‌گردد میزان فراوانی و نوع هاپلوتیپ‌ها در مناطق مختلف یکسان نیست و وجود هاپلوتیپ‌های مختلف نشان می‌دهد که تنوع در ژنوم میتوکندری کیلکا ماهیان وجود دارد. اختلاف نوکلئوتیدی بین جمعیتها در مناطق نمونه‌برداری ۰/۰۱ درصد بوده و علاوه بر این میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها در دو منطقه نمونه‌برداری ۰/۰۰۰۳±۰/۷۳۳۹ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۰±۰/۰۰۹۸ بود. ازطرفی آنالیز آماری انجام شده، اختلاف معنی‌داری را بین هاپلوتیپ‌های مختلف نشان داده که می‌تواند بیانگر وجود جمعیت‌های متفاوت کیلکای معمولی در حوضهٔ جنوبی دریای خزر باشد (P= ۰/۰۰۴). بنابراین براساس نتایج حاصله می‌توان گفت، ساختار ژنتیکی متفاوتی بین دو منطقه نمونه‌برداری مشاهده گردیده است.

Waters و همکاران (۲۰۰۰) تحقیقات مشابهی را بر روی ۴ جمعیت ماهی *Alosa sapidissima* در رودخانه‌های Pamunkey, James و Hudson در سواحل اقیانوس اطلس و رودخانه کلمبیا در سواحل اقیانوس آرام انجام دادند. براساس مطالعات انجام شده، تنوع ژنی در رودخانه‌های Pamunkey, James و Hudson بترتیب ۰/۶۴، ۰/۸۱ و ۰/۷۶ و در رودخانه کلمبیا ۰/۳۶ بوده است. بدین ترتیب مشاهده می‌گردد میزان تنوع در رودخانه کلمبیا حدود ۵۳ درصد کمتر از سه رودخانه دیگر بوده است. یکی از دلایل این اختلاف، عدم وجود جریانات ژنی در جمعیت رودخانهٔ کلمبیا با هر یک از جمعیتهای سواحل اقیانوس اطلس بوده و بعبارتی، جمعیت ماهیان مورد مطالعه در این رودخانه بمقدار زیادی متمایز از جمعیتهای ساحل اقیانوس اطلس بوده است. همچنین Imsiridou و همکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی و روابط فایلوژنی ۱۲ جمعیت ماهی Chub یونانی (*Leuciscus cephalus*) را با استفاده از ناحیه D-Loop به روش PCR-RFLP بررسی نمودند که توانستند ۲۱ هاپلوتیپ مختلف را شناسایی نمایند. اختلاف نوکلئوتیدی مشاهده شده بین ۲۱ ژنوتیپ mtDNA از ۰/۳۱۳ تا ۶/۷۹ درصد بود. همچنین میانگین تنوع داخل جمعیتها ۰/۰۰۰۷±۳/۶۸۴ درصد و تنوع بین جمعیتها ۰/۰۰۰۱±۰/۲۶۳۸ درصد بود.

Grant و همکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی وروابط فایلوژنی را بین ماهیان ساردین (*Clupeid sardinops*) ژاپن، استرالیا و آفریقای جنوبی با روش آنالیز RFLP و تکثیر ناحیهٔ D-loop و ژن سیتوکروم b انجام دادند. تجزیه و تحلیل ۲۵۸ جفت باز از ژن سیتوکروم b مولکول DNA میتوکندری در ۷۴ نمونه از ساردین‌های استرالیا، آفریقای جنوبی، شیلی، کالیفرنیا و ژاپن وجود ۲۴ هاپلوتیپ را نشان داد.

Faria و همکاران (۲۰۰۴) خصوصیات ژنتیکی ماهیان *Alosa alosa* و *A. fallax* (از خانوادهٔ

www.SID.ir

Archive of SID

Clupeidae) در نواحی از مدیترانه و دریای سیاه را با استفاده از میکروستلایت مورد مطالعه قرار داده‌اند. تعداد آللها در هر لوکوس برای *A. alosa* از ۳ تا ۹ و برای *A. fallax* از ۲ تا ۷ بود. ضمن اینکه تنوع هتروزیگویتی برای این دو گونه بترتیب از ۰/۲۶۷ تا ۰/۹۲۶ و ۰/۲۴۰ تا ۰/۷۲۷ بود.

با توجه به تحقیقات و بررسی‌های انجام شده، چنین استنباط می‌گردد که در اکوسیستم‌هایی که امکان مهاجرت و حرکت ماهیان از منطقه‌ای به منطقه دیگر وجود دارد، اختلافات ژنتیکی افراد بین مناطق مختلف مشاهده نگردیده یا در حد بسیار پایین می‌باشد. در مجموع مقایسه الگوی ژنوتیپی و هاپلوتیپی در مناطق مختلف بیانگر آن است که توزیع نمونه‌ها در نواحی مختلف تحت تاثیر عوامل محتلف فیزیکی و اکولوژیک می‌باشد (Lin *et al.*, 2004 ; Kohlman *et al.*, 2003).

همانگونه که ذکر گردید، ماهی کیلکای معمولی از جمله ماهیان مهاجر می‌باشد که بدلیل نبود موانع فیزیکی می‌تواند بین دو منطقه غرب و شرق حوضهٔ جنوبی دریای خزر مهاجرت نماید و بعبارت دیگر جریان ژنی بین دو منطقه برقرار می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به وضعیت و شرایط فیزیولوژیک این ماهی و مقاوم بودن به شرایط محیطی (شوریهای متفاوت و درجه حرارت) و زیست در حوضه‌های شمالی، میانی و جنوبی دریای خزر، می‌تواند دلایلی بر وجود اختلافات ژنتیکی و جمعیتهای متفاوت بین کیلکای معمولی باشد.

با توجه به موارد فوق و وجود تفاوت ژنتیکی معنی‌دار بین جمعیتهای ماهی کیلکای معمولی در حوضهٔ جنوبی دریای خزر پیشنهاد می‌گردد، این تحقیق بصورت گسترده‌تری با جمع‌آوری نمونه‌هایی از حوضهٔ میانی و شمالی دریای خزر انجام گیرد تا بتوان براساس نتایج بدست آمده و شناسایی جمعیت‌های احتمالی بیشتر، مدیریت اصولی و جداگانه‌ای را بر ذخایر اعمال نمود. علاوه بر این نیاز است رفتارهای تولید مثلی، تغذیه‌ای و مهاجرتی این جمعیت‌ها مورد مطالعه و تحقیق قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر رستمی ریاست محترم وقت پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و کلیه همکارانی که در مراحل نمونه‌برداری، آزمایشگاهی و تایپ (آقایان مهندس حسن فضلی، علی اصغر جانباز و سرکار خانم علوی) ما را یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

فضلی، ح. ؛ صیاد بورانی، م. ؛ جانباز، ع.ا. ؛ نادری، م. ؛ ابو، م. ؛ مقیم، م. ؛ عوفی، ف. و آذری، ع.، ۱۳۸۱. بررسی آماری و بیولوژیک کیلکا ماهیان در مناطق صید تجاری. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۳ صفحه.

Avis, J.C. , 2000. Phylogeography–the history and formation of species. Harvard university press . USA . 447P.

Barker, J.S.F. ; Selvaraj, O.S. and Mukherjee, T.K. , 1997. Genetic variation within and relationships among population of Asian water Buffalo. Animal genetic. Vol. 28, pp.1-13.

Cronin, M.A. ; Hilis, S. ; Born, E.W. and Potton, C. , 1994. mtDNA variation in Atlantic and Pacific walruses. Gen. 3. 2001. Vol. 72, pp.1035-1043.

Faria, R. ; Wallner, B. ; Weiss, S. and Alenadrino, B. , 2004. Isolation and characterization of eight dinucleotide micro satellite loci from two closely related clupeid species (*Alosa alosa* and *A. fallan*). Molecular Ecology Notes. Vol. 4, pp.586–591.

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. Journal of fish Biology. Vol. 51, pp.895-908

Grant, W.S. ; Clank, A.M. and Bowen, W. , 1998. Why restriction fragment length polymorphism analysis of mtDNA failed to vesolue Sardine biogeography:Insights from mtDNA cytochrome b sequences. Journal of Can. Sci. Halieut. Aquato. Vol. 55, No. 12, pp.2539 –2547.

Gross, B. ; Kohlmaun, K.M. and Kerstem, P. , 2002. PCR- RFLP analysis of mitochondrial

www.SID.ir

Archive of SID

ND– 3/4 and ND– 5/6 gene polymorphism in the European and East Asian subspecies of common carp. Aquaculture. Vol. 204, pp.507–516.

Gyllensten, U. and Willson, A.C. , 1986. Mitochondrial DNA of salmonids: In trans-pacific variability detected with restriction enzymes. *In*: N. Ryman and F. Utter). Population genetics and fishery management. University of Washington press, Seattle, WA. 3:pp.34-46

Hedrick, P.W. , 1999. Genetic of populations, second edition, Jones and Bartlitt Publishers, MA, USA. Vol. 24, pp.56-64.

Imsiridou, A. ; Apostolidis, A.P. ; Durand, J.D. ; Briolay, J. ; Bouvet, Y. and Triantaphyllidis, C. , 1998. Genetic differentiation and phylo-genetic relationships among Greek Chub (*Leuciscus cephalus*) population as revealed by RFLP analysis of mtDNA. Biochemical Systematic and Ecology. Vol. 26, pp.415-429.

Kohlman, K. ; Gross, R. ; Murakaeva, A. and Skersten, P. , 2003. Genetic variability and structure of Common Carp populations throughout the distribution range inferred from allozyme , micro satellite and mtDNA makers. Aquaculture Living Resources. Vol. 16, pp.421–431.

Lee, W.J. ; Conroy, J. ; Howell, H.W. and Kocher, T.D. , 1996. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. Journal of Mol. Evol. Vol. 41, pp.54-66.

Lin, Y.S. ; Poh, Y.P. ; Lin, S.M. and Tzeng, C.S. , 2004. Molecular techniques to identify freshwaters eels: RFLP analyses of PCR–amplified DNA fragments and Allele-Specific PCR from mtDNA. Zoological studies. Vol. 41, No. 4, pp.421–430.

Lin, Y.S. ; Poh, Y.P. ; Lin, S.M. and Tzeng, C.S. , 2002. Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological S0tudies. Vol. 41, No. 4, pp.421-430.

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, pp. 597-607

Rezvani Gilkolaei, S. , 2000. Study of mtDNA variation of Russian Sturgeon population from the South Caspian Sea Using RFLP Analysis PCR Amplified ND5/6 Gene Regions. Iranian Journal of Fisheries Science. Vol. 2, No. 1, pp.13-36.

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

Waters, J.M. ; Epifanio, J.M. ; Gunter, T. and Browns, B.L. , 2000. Homing behavior facilitates subtle genetic differentiation among river population of *Alosa sapidissima* micro satellites and mtDNA. Journal of Fish Biology. Vol. 56, pp.622-636.

Williams, J.G.K. ; Kubelic, A.R. ; Livak, K.J. ; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. , 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. Vol. 18, pp.6531-6535.

www.SID.ir

Archive of SID

The PCR-RFLP investigation of *Clupeonella cultriventris* from the South Caspian Sea, Iran

Laloei F.[1] ; Rezvani Gilkolaei S.[2] ; Nirani M.[3] and Taghavi M.T.[4]

Laloei@yahoo.com

1,3,4- Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

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

Received: July 2005 Accepted: March 2005

Keywords: Kilka, *Clupeonella cultriventris*, PCR- RFLP, South Caspian Sea, Iran

Abstract

Fifty common kilka (*Clupeonella cultriventris*) specimens from Guilan Province and fifty others from Mazandaran Province, South Caspian Sea were collected to study genetic variation in the fish using Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the mtDNA. DNA was extracted from fin tissue by phenol-chloroform method. The PCR products were digested using 13 restriction endo-nuclease enzymes. Five out of thirteen restriction enzymes were polymorphic resulting in nine different haplotypes. The haplotype divergence ranged from 0.0073 to 0.0369. The mean value of haplotype and nucleotide diversity among populations was 0.7339±0.0006 and 0.0098±0.0, respectively. The nucleotide divergence among populations was 0.01%. Statistically significant differences in haplotype frequencies among all samples were observed ($P<0.01$). Therefore, we conclude the populations are different genetically.

www.SID.ir