

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

فرامرز لالوئی<sup>(۱)\*</sup>؛ سهراب رضوانی گیل‌کلائی<sup>(۲)</sup>؛ سید محمد رضا فاطمی<sup>(۳)</sup>  
و محمد جواد تقوی<sup>(۳)</sup>

Laloei@yahoo.com

۴۱- 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-3/4 و ND-5/6 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 DNA ۱۰۰ pb الکتروفوروز 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

## 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 صید ۲۲۲ تن در سال ۱۳۸۱ و حداکثر آن ۳۹۲۴ تن در سال ۱۳۸۴ بوده است (دریانبرد و همکاران، ۱۳۸۶).

تنوع ژنتیکی آبریان 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 تاثیر گذار 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 RAPD (Froufe et al., 2002 ; Davis et al., 1999)، (Bartfai et al., 2003) و بعد از آن مارکرهای میکروساتلیت‌ها 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، ۱۱ جمعیت با ریزماهورها و ۲۱ جمعیت با استفاده از mtDNA مورد بررسی قرار گرفت.

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۳، تنوع ژنتیکی بین *C. c. haematopterus* و *Cyprinus carpio* را با استفاده از آنالیز mt DNA در نواحی از اروپا مورد مطالعه قرار داده و با استفاده از چپنش 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 ریزماهورهای 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 پلی مورفیسمی را نشان ندادند. اما داده‌های مربوط به ریزماهورها (۴ لکوس) اختلاف معنی‌داری را در تعداد آلله‌ها نشان داد.

Thai و همکاران در سالهای ۲۰۰۴ و ۲۰۰۶ مطالعاتی را در خصوص 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 (لالونی و همکاران، ۱۳۸۵)، ماهی کلمه (Rezvani et al., 2007)، سس ماهی بزرگ سر (لالونی 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 سؤال 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.

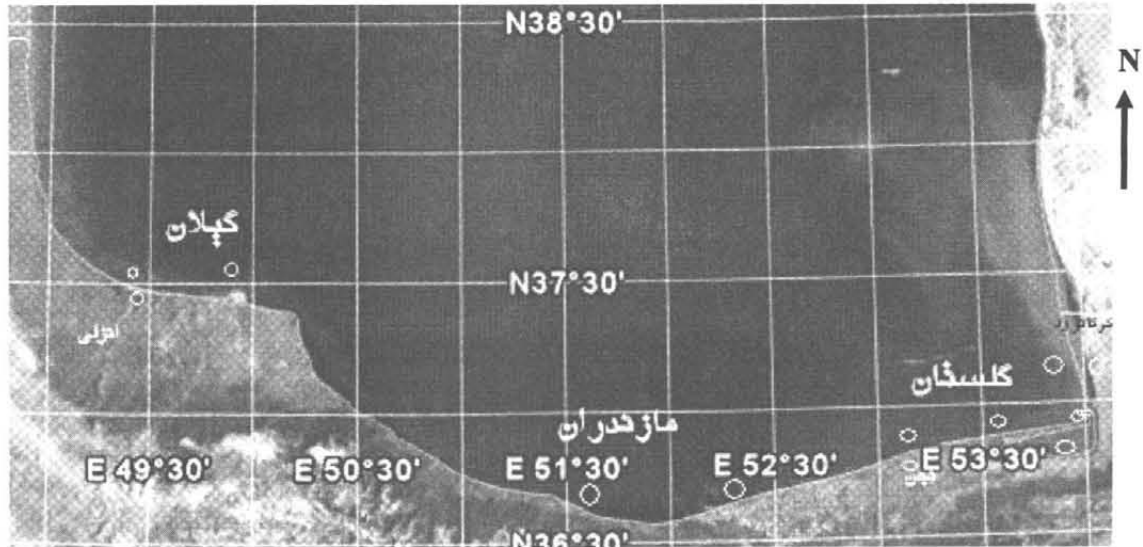
## مواد و روش کار

(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'

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 چپکرد) و سواحل استان گلستان ۳۰ نمونه (منطقه گمیشان) انجام گردیده است. همچنین ۴۰ نمونه از رودخانه تجن، ۴۰ نمونه از گرگانرود،



○ مناطق نمونه‌برداری

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*، ۵۰mM، ۱۰ng،  $MgCl_2$  با غلظت ۵۰mM، بافر PCR و آب از هر پرایمر، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA نمونه، بافر PCR و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول به ۵۰  $\mu$ l برسد، انجام شد.

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 تا ۲ 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:

**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 DNA bp ۱۰۰ برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 بترتیب ۲۴۰۰ و ۲۶۰۰ جفت باز بدست آمد (جداول ۱ و ۲). 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* , *Hinf I* , *Eco 471* , *Rsa I* , *Hpa II* ) برای ژن ND-3/4 و آنزیم (*Hpa II* , *Mbo I* , *Bsu I* , *Hinf* , *Rsa I* *Alu I* ) 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 و ۱۲ هاپلو تیپ متفاوت را برای ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 نشان دادند (جدول ۳).

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 (۷-۸ μl) با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر DNA bp ۱۰۰، 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* *Rsa I* و *Xba I* *Ava II* *Eco 471* *Tha I* *Dpn I* انجام شد. برای این منظور مقدار ۵μl - ۳ محصول PCR، ۱ μl آنزیم قطع کننده محدود و ۲ μl بافر آنزیم با حجم نهایی ۲۰ μl بمدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ قرار گرفت. الگوهای هضم آنزیمی محصولات PCR با روش الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر DNA bp ۵۰ مشخص گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Reap انجام گردید (Roff & Bektzen, 1989).

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

<i>Rsa I</i>			<i>Eco471</i>			<i>BsuRI</i>			<i>HinfI</i>			<i>AluI</i>			<i>HpaII</i>			آنزیم
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	ژنوتیپ
۱۵۵	۲۸۰	۲۸۰	۲۰۶	۵۰۰	۲۴۵	۷۰	۱۱۰	۸۵	۵۵	۱۰۰	۱۴۵	۱۹۰	۲۲۵	۱۵۰	۱۷۵	۲۰۳	۲۲۵	طول قطعات (bp)
۲۸۰	۲۲۰	۵۰۰	۳۱۰	۹۰۰	۳۲۰	۹۵	۱۴۵	۶۵۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۵۵	۴۹۵	۲۳۵	۱۶۰	۲۲۵	۲۳۰	۳۹۵	
۴۰۰	۷۵۰	۷۲۰	۱۸۸۴	۱۰۰۰	۲۹۵	۲۴۰	۲۴۵	۷۱۰	۱۵۵	۱۴۵	۱۸۰	۵۰۵	۵۳۰	۱۹۰	۳۲۰	۳۷۵	۴۰۰	
۷۲۵	۹۵۰	۹۰۰			۶۰۰	۲۹۵	۳۳۵	۹۵۰	۵۱۰	۱۵۵	۲۵۰	۵۱۰	۶۱۰	۲۵۰	۳۶۰	۴۰۷	۴۵۰	
۸۲۰					۷۴۰	۳۱۵	۴۰۰		۶۰۰	۶۸۰	۳۸۰	۷۰۰	۸۰۰	۳۵۰	۳۸۵	۱۱۸۵	۹۳۰	
						۱۳۸۵	۴۷۵		۹۸۰	۱۲۱۰	۴۶۰			۴۰۰	۳۹۵			
						۶۹۰					۸۳۰			۹۰۰	۵۴۰			حجم
۲۲۰۰	۲۲۰۰	۲۲۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	۲۴۰۰	

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

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

(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.

براساس نتایج بدست آمده بیشترین فاصله تکاملی در ژن ND-3/4 بین هاپلوتیپ BBBBBA با AACCCA (۰/۲۴) و کمترین فاصله تکاملی بین هاپلوتیپ‌های BBBBBA با BBBBBA (۰/۰۲) بود. در ژن ND-5/6، بیشترین و کمترین فاصله تکاملی بترتیب بین هاپلوتیپ BBBAABB با AAABBAA (۰/۳۲) و ABAABAA 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 بر این اختلاف نوکلئوتیدی در ژن ND-3/4، ۰/۴۸ درصد 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 ۳: توزیع و فراوانی هاپلو تیپ های حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR در ژنهای ND-3/4 و ND-5/6 کپور معمولی به تفکیک مناطق نمونه برداری

ژن	هاپلو تیپ	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	-	-
	CCCCCA	-	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

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

ردیف	منطقه نمونه برداری	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

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

جدول ۶: 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	$P = ۰/۰۲۳۹$	$P = ۰/۰۰۵۷$
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	$P = ۰/۰۷۲۴$	$P = ۰/۰۹۶۹$
۵	سواحل استان گلستان - خلیج گرگان - گرگانرود	$P = ۰/۰۱۳۷$	$P = ۰/۰۴۵۳$
۶	رودخانه تجن - گرگانرود	$P = ۰/۰۳۹*$	$P = ۰/۰۴۷*$

## بحث

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 رجایی به رودخانه تجن باعث

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 می‌باشد و بنابراین از توان قابل ملاحظه‌ای جهت حل دشواریهای رده‌بندی کپور معمولی برخوردار است (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.



اختلاف بین هاپلوتیپ‌های ناحیه D-loop در بین نمونه‌های کپور ویتنام معنی‌دار بوده که این نتایج با یافته‌های بدست آمده در خصوص سایر نژادها مطابقت دارد.

Thai و همکاران در سال ۲۰۰۴، با استفاده از روش توالی‌یابی 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 اروپایی 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، ریزماهوره و مارکرهای mtDNA (روش PCR-RFLP) مورد مطالعه قرار داد. در این تحقیق با روش آلوزایم، ۲۳ جمعیت، ۱۱ ریزماهوره 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 ریزماهوراها (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 منشأ کپور اروپایی از آسیای مرکزی است. در این مطالعات با استفاده از مارکرهای ژنتیکی، جمعیت‌های کپور معمولی بصورت دو گروه کاملاً متمایز شامل اروپا، آسیای مرکزی و آسیای شرقی، جنوب شرقی دسته‌بندی شدند. علاوه بر این مشخص گردید که تنوع زیاد ریزماهوراها 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, Stavropol krai و Krasnodar krai, Leningrad oblast 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 أمور بود ( $P=23/8-18/7$ )، ضمن اینکه پایین‌ترین تنوع مربوط به کپور Ropsha (۸/۱۲) بوده است.

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 الکتروفوروز 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, 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 در خصوص 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، پلی مورفیسم داخل نواحی ژن ND-3/4 و ND-5/6 در بین جمعیت‌های کپور معمولی متعلق به زیر گونه‌های اروپایی (دو نژاد پرورشی و سه جمعیت طبیعی) و آسیای شرقی (کپور طبیعی ویتنامی، کپور Koi، ژاپنی و کپور وحشی أمور) 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 اروپایی، أمور، کپور ویتنامی و کپور Koi دسته‌بندی نمودند. اختلاف نوکلئوتید بین گروهها از ۱/۲ درصد (بین أمور و کپور ویتنامی) تا ۳ درصد (بین کپور Koi کپور اروپایی) 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 از ناحیه D-loop و ترکیبی از توالی‌یابی 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  $0/02 \pm 0/92$ ) ولی با تنوع نوکلئوتیدی پایین (میانگین صفر  $0/01 \pm 0/01$ ) می‌باشند. براساس این مطالعات

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 (Imiridou *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 و هاپلوتیپی 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.

مطالعات متعدد دیگری درخصوص ماهی کپور معمولی مناطق مختلف انجام شده است که نتایج تقریباً 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 کالبراسیون 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

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 <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 2006
۳	D-Loop , mtATPase8/ mtATPase6	چین، هند، ژاپن، ویتنام و مجارستان	۰/۸۰-۰/۰۰	۰/۰۱-۰/۰۰	Thai <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 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

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. ۱۴۷ صفحه.

لالونی، ف.؛ رضوانی گیل کلائی، 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.

لالونی، 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 الکتروفوریتیک 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.

Avisé, 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,

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 رستمی، 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 و ثبات ژنتیکی نرسیده است (حاجی رستمی، 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 رستمی، 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.

دریانی‌برد، غ.؛ عبدالملکی، ش.؛ بندانی، ع. و کر، د.، ۱۳۸۶. گزارش نهایی پروژه ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی

- and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux. 27-30 May 1986. Schriften der Bundesanstalt für Fischerei, Hamburg, Germany. Vol. I, pp.113-129.
- Csizmádia, 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. ; Chisanfova, 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.

- 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 *Leopanthus* (Orchidaceae): 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 varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers, *Russian Journal of Genetics*, Vol. 40, No. 10, pp.1144-1148.

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

**Laloei F.<sup>(1)\*</sup> ; Rezvani Gilkolaei S.<sup>(2)</sup> ; Fatemi S.M.R.<sup>(3)</sup>  
and Taghavi M.J.<sup>(4)</sup>**

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 polyacrylamide 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