Archive of SID

علـوم محـیـطی سال ششم ، شماره سوم، بهار ۱۳۸۸
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.6, No.3 , Spring 2009
۴۳-۵۲

# تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی شاه کولی *Chalcalburnus chalcoides* در رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود با استفاده از ژن 18S rRNA به روش PCR-RFLP

حسین رحمانی[۱*]، بهرام کاظمی[۲]، محمد پورکاظمی[۳]، مژگان بنده پور[۴]، مهدی نادری جلودار[۵]، نگار سید[۶]، فریبا عطایی[۷]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- بخش ژنتیک ماهی- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری رشت
٤- گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری
٥- گروه بوم‌شناسی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر
٦- بخش فراورده‌های بیولوژیک، انستیتو پاستور ایران
۷- گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

## چکیده

در این بررسی ۱۰۵ نمونه ماهی شاه کولی *Chalcalburnus chalcoides* در اردیبهشت ۱۳۸۳ از مصب رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود صید شد. تنوع ژنتیکی و تفاوتهای احتمالی بین جمعیت‌ها با استفاده از روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و ژن 18S rRNA، مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم از بافت باله ماهی‌ها انجام شد. ۵ آنزیم از ۸ آنزیم برش دهنده پلی (*PstI*, *SacI*, *SacII*, *SmaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *RsaI*,*TaqI*) مرفیسم را نشان دادند و ۱۰ هاپلوتیپ مختلف مشخص شد. تنوع نوکلئوتیدی بین جمعیت‌ها از ۰/۰۴۴۵۶۸ تا ۰/۰۴۹۴۴۲ متغیر بوده و میانگین تنوع در سه جمعیت مورد مطالعه ۰/۰۴۵۹۸±۰/۰۰۰۰۳۳۸ بوده است. تست ناهمگنی با استفاده از شبیه سازی مونت- کارلو با ۱۰۰۰ بار تکرار نشان داده که اختلاف معنی‌داری بین هاپلوتیپ‌های سه جمعیت وجود نداشته و جمعیت‌ها از یک جامعه همگنی می‌باشد ($\chi^2 = 12.12$ و $P \geq ۰/۰۵$).

*کلمات کلیدی:* تنوع ژنتیکی، PCR- RFLP، 18S rRNA، شاه کولی *C. chalcoides*.

## Genetic Diversity of the Shemaya (*Chalcalburnus chalcoides*) Populations in Haraz, Shirud and Gazafrud Rivers Using 18S rRNA gene and the PCR-RFLP Method

## Genetics Diversity of Shemaya (*Chalcalburnus chalcoides*) Population in Haraz, Shirud and Gazafrud Rivers Using 18S rRNA Gene and PCR-RFLP Method

**Hossein Rahmani[1*], Bahram Kazemi[2], Mohammad Pourkazemi[3], Mozhgan Bandehpour[4], Mehdi Naderi Jolodar[5], Negar Seyed[6], Fariba Ataei[7]**

*1- Department of Fisheries, Faculty of Animal and Fisheries Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.*
*2- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, University of Shahid Beheshti.*
*3- Department of Fish Genetic, International Sturgeon Research Institute, Rasht.*
*4 - Department of Molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.*
*5-Departmen of Ecology, Caspian sea Research, Institute of Ecology.*
*6- Department of Biological Production, Pasteur Institute of Iran.*
*7- Department of Molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.*

**Abstract**

In this study, 105 specimens of Shemaya *C. chalcoides* were collected from the Haraz, Shirud and Gazafrud rivers in May 2004. Genetic variation and probable population differentiation were investigated using RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of one PCR amplified genome segments (18S rRNA). The DNA was extracted from fish fins using the Phenol-Chloroform method. Five out of eight restriction enzymes (*BamHI*, *EcoRI*, *RsaI*, *TaqI PstI*, *SacI*, *SacII*, *SmaI*) showed polymorphism, and ten different haplotypes were detected. The estimated nucleotide sequence divergence ranged from 0.044568 to 0.049442 and the mean value of sequence divergence among populations was 0.045981±0.0000338. Monte Carlo simulation analysis with 1000 iteration showed that there were no significant differences among haplotypes in three populations. It seems that the three populations were homogeneous ($\chi2=12.12$, $p\geq0.05$).

*Keywords*: Genetic variation, PCR-RFLP, 18S rRNA, *chalcalburnus*

* Corresponding author. *E-mail Address*: shemaya1975@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

گونه ماهی شاه کولی (Guldenstaedt, 1772) *Chalcalburnus chalcoides* از گونه های بنتو پلاژیک بوده و در آبهای لب شور و شیرین زندگی می کند و برای تولیدمثل به رودخانه‌ها مهاجرت می‌نماید (Slastenenko, 1955) این گونه دارای پراکنش وسیعی در رودخانه‌های حوزه دریای خزر، آرال و سیاه می‌باشد (Bogutskaya, 1997). شاه کولی یک ماهی ریزجثه و مورد پسند مردم شمال ایران است که از اواخر فروردین تا اواخر تیرماه جهت تولید مثل وارد رودخانه‌های حوضه دریای خزر می‌شوند (Rahmani, 2006; Berg, 1949) ولی میزان صید این ماهی در سال‌های اخیر در سواحل جنوبی این حوضه کاهش محسوسی نشان داده است (Ghaninezhade *et al*., 2000).

تاکنون روش‌های متعددی برای شناسایی و تفکیک جمعیت‌های مختلف ماهیان ارائه شده، ولی امروزه از مطالعات مولکولی جهت تفکیک زیرگونه ها و یا جمعیت‌ها به عنوان یک روش قابل اعتماد استفاده می گردد (Nahavandi *et al*., 2005).

روش RFLP یکی از تکنیک‌های مولکولی مناسب برای مطالعات سیستماتیک گونه‌ها و تمایز جمعیت‌ها می‌باشد (Cronin *et al*., 1994). برای بیان تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها از ژن‌های مختلفی از جمله، ژن 18S rRNA استفاده شده که دارای محل‌های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی است که از نظر مرفولوژی خیلی به‌هم نزدیک هستند، و لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می گردد (Hansen and Loeschcke, 1996).

با توجه به ارزش اقتصادی شاه کولی در حوزه جنوبی دریای خزر و ارزش حفاظتی آن که از نظر طبقه بندی IUCN[1] جزء گونه‌های آسیب پذیر تا در معرض تهدید محسوب می شود (Kiabi *et al*,. 1999) ولی مطالعات کمی در حوزه دریای خزر روی این گونه صورت گرفته است (Khaval, 1998; Karimpour *et al*., 1993; Azari Takami and Rajabinezhad, 2002). تاکنون هیچ‌گونه مطالعات مولکولی در مورد گونه شاه کولی انجام نشده ولی با استفاده از این روش و این ژن در مورد سایر گونه‌ها، مطالعاتی انجام شده است (Gross *et al*,. 2002; Imsiridou *et al*., 1998; Nahavandi *et al*., 2005). هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه *C. chalcoides* در سه جمعیت رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود و شناخت ذخایر ژنی این گونه با استفاده از روش PCR-RFLP می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تعداد ۳۵ نمونه شاه کولی از رودخانه هراز، ۳۵ نمونه از رودخانه شیرود و ۳۵ نمونه از رودخانه گزافرود بوسیله تور سالیک در مصب این رودخانه‌ها در اردیبهشت ۱۳۸۳صید گردید (شکل ۱). مقدار ۲۰۰ میلی گرم از باله ماهی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شد.

در استخراج DNA، ۳۰ میلی گرم از باله‌ها بطور کامل خرد شد و در لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری ریخته و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز جهت باز شدن بافت‌ها و یک میکرولیتر پروتئیناز K جهت هضم پروتئین ها اضافه نموده و به مدت یک شبانه‌روز در بن ماری با دمای ۵۵°C قرار داده شد. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فنل به آن اضافه شده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ ۸۰۰۰ دور قرار داده، محلول لایه‌رویی به دقت جدا و به لوله دیگری منتقل شد. هم حجم محلول فوق، کلروفرم اضافه نموده و به‌مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ ۸۰۰۰ دور قرار داده و مجددا لایه‌رویی به


www.SID.ir

Archive of SID

آرامی جدا و به لوله دیگر منتقل شد. سپس معادل ۰/۱ حجم محلول به دست آمده، استات سدیم و ۲ برابر حجم آن الکل مطلق سرد اضافه نموده و در سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰دور و در دمای ۴ °C سانتریفوژ نموده، محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاوی DNA را با الکل ۷۰٪ شستشو داده و به مدت ۲ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور مجددا سانتریفوژ نموده و محلول را دور ریخته و لوله ها در دمای آزمایشگاه کاملا خشک شدند. به رسوب حاصل مقدار ۴۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در بن ماری ۳۷ °C قرار داده شد (Sambrook and Russell, 2001). DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد (۰/۸۰ گرم آگارز + ۱۰ میلی لیتر بافر TBE ۱٪) لود شده و با ولتاژ ۸۰-۶۰ ولت الکتروفورز شدند. با مقایسه باند DNA با مارکرهای کمی مقدار آن برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین شد.

آغازگرهای مورد استفاده برای ژن 18S rRNA از توالی این ژن در ماهی قزل آلا و با استفاده از نرم افزار DNAsis طراحی گردید. جهت موفقیت در واکنش PCR از روش Nested- PCR استفاده شد که توالی آغازگرهای آن بصورت زیر می باشد: توالی آغازگر اول برای واکنش $PCR_1$:

فوروارد: 5'-CACATCCAAGGAAGGCAG-3' و

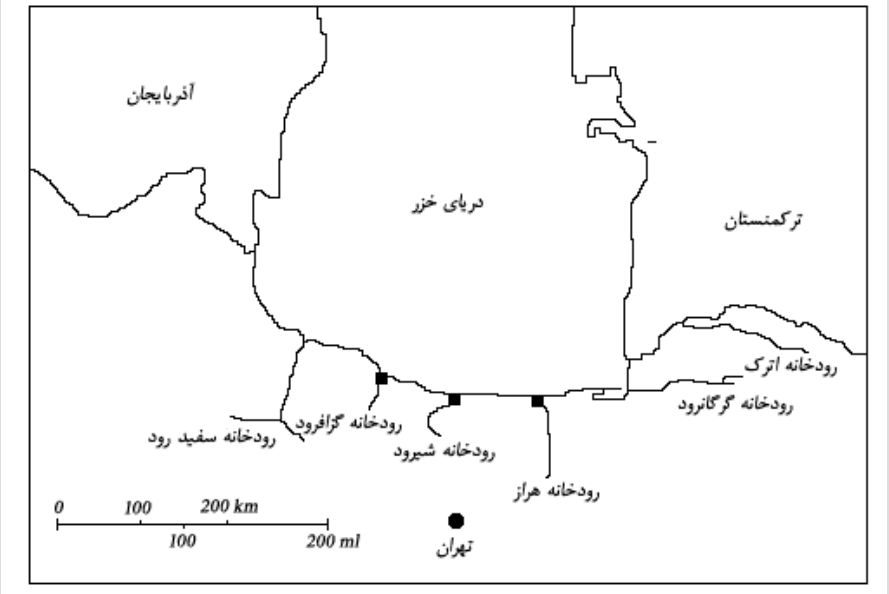
ریورس:5'-CGATTGGATGGTTTAGTGA-3'

که محصول واکنش قطعه ای با ۱۲۷۷ جفت باز بوده و توالی آغازگر دوم برای واکنش $PCR_2$ (Nested- PCR):

فوروارد:5'-CCTGTAATTGGAATGAGTACA-3'،

ریورس:5'-GATTGCAATTATTTCCCATGA-3'

که قطعه ای ۱۰۷۲ جفت بازی را از این ژن جدا می‌کند. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اول شامل ۱ میکروگرم DNA، ۲۰ پیکومول از هر یک از




**شکل ۱**- موقعیت جغرافیایی رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود



www.SID.ir

Archive of SID

آغازگرهـا، ۰/۲ میکرولیتـر dNTP (10mM)، بـافر PCR (1x)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میلی مولار $Mgcl_2$ (50mM) و آب مقطر اسـتریل تـا حجـم ۲۵ میکرولیتر بود.

محلول فوق در ویالهای ۰/۲ میلی لیتری تهیـه شـده و بوسیله سمپلر کاملا بهم زده و پـس از سـانتریفوژ کوتـاه، ویالها در دستگاه مولد حرارتی مدل Primus با برنامه زیـر انکوبه شدند: مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سـانتیگراد برای واسرشته سازی اولیه، ۲۰ چرخه شـامل: ۳۰ ثانیـه در دمـای ۹۴ درجـه سـانتیگراد (Denaturation)، ۴۰ ثانیـه در دمـای ۵۰ درجـه سـانتیگراد بـرای اتـصال آغـازگر (Anneling) و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط (Extention) و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط نهایی.

پس از اتمام واکنش زنجیره ای پلیمـراز، از محـصول $PCR_1$ بدسـت آمـده، مقـدار ۳-۱ میکرولیتـر در واکـنش $PCR_2$ به جای DNA الگو استفاده شـد کـه شـرایط انجـام واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز دوم ($PCR_2$) بـرای ژن 18S rRNA شـامل: ۱ میکروگـرم محـصول واکـنش اول، ۲۰ پیکومـول از هـر یـک از آغازگرهـا، ۰/۲ میکرولیتـر dNTP (10mM)، بافر PCR (1x)، یک واحـد آنـزیم Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میلـی مـولار $Mgcl_2$ (50mM) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود.

محلول فوق در ویالهای ۰/۵ میلی لیتری تهیـه شـده و بوسیله سمپلر کاملا بهم زده و پـس از سـانتریفوژ کوتـاه، ویالها در دستگاه مولد حرارتی مدل Primus با برنامه زیـر انکوبه شدند: مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سـانتیگراد برای واسرشته سازی اولیه، ۲۰ چرخـه شـامل: ۳۰ ثانیـه در دمـای ۹۴ درجـه سـانتیگراد (Denaturation)، ۳۰ ثانیـه در دمـای ۵۴ درجـه سـانتیگراد بـرای اتـصال آغـازگر (Anneling) و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط (Extention) و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط نهایی.

پس از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مقـدار ۱۰ میکرولیتر از محصول بدسـت آمـده روی ژل آگـارز ۱/۲ درصد ( ۰/۱۲ گرم آگـارز + ۱۰ میلـی لیتـر بـافر TBE بـا غلظت ۱ درصد) ران شدند. بـرای انجـام آنـالیز RFLP بـا توجه به توالی ژن مورد نظر و جایگاه خـاص هـر آنـزیم، آنـزیم‌هـای *SacI*, *SacII*, *TaqI*, *SmaI*, *EcoRI*, *BamHI*, *RsaI*, *PstI*، با استفاده از نرم افزار DNAsis انتخاب شدند. محلـول واکـنش آنزیمـی حـاوی ۱۰- ۵ میکرولیتـراز محصول واکـنش دوم (۱ میکروگـرم)، ۲ میکرولیتـر بـافر آنزیم، ۰/۱ میکرولیتر از آنـزیم هـای بـرش دهنـده و آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود.

محلول فوق در دمـای بهینـه هـر آنـزیم بمـدت یـک ساعت در بن ماری قرار داده و سپس روی ژل آگارز ۲ ٪ بهمـراه مـارکر Fast Ruler$^{TM}$ DNA Ladder Low Range مورد بررسی قرار گرفتند. جهت مطالعات آمـاری داده‌هـا و محاسـبه تنـوع و تفـرق نوکلوتیـدها در درون و بـین جمعیت‌ها و تست معنی دار بودن فراوانی هاپلوتیپ‌هـا از نرم افزار REAP و شبیه سازی Monte- Carlo بـا هـزار بـار تکرار استفاده شد (Roff and Bentzen, 1989).

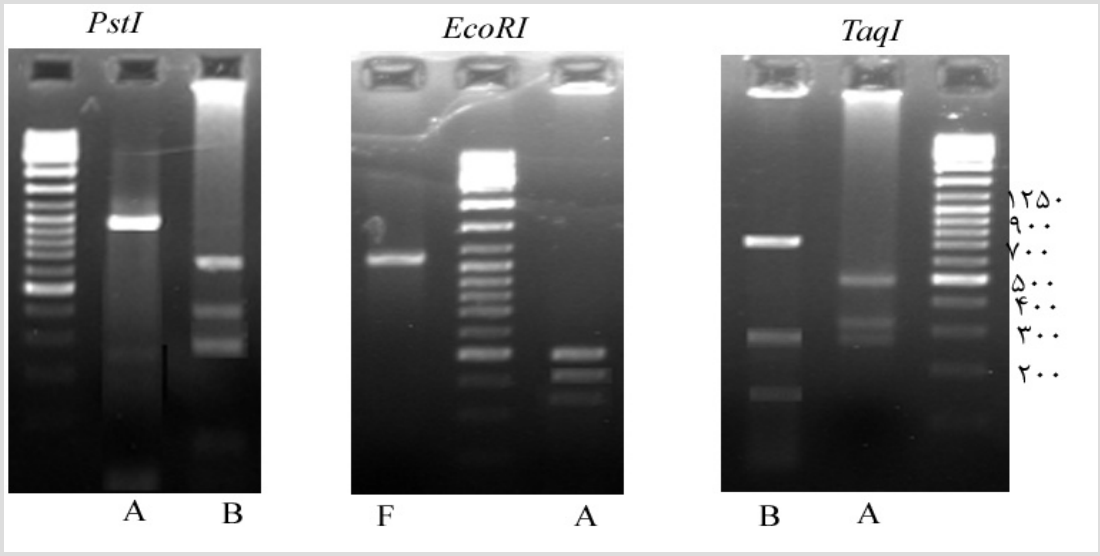
## نتایج

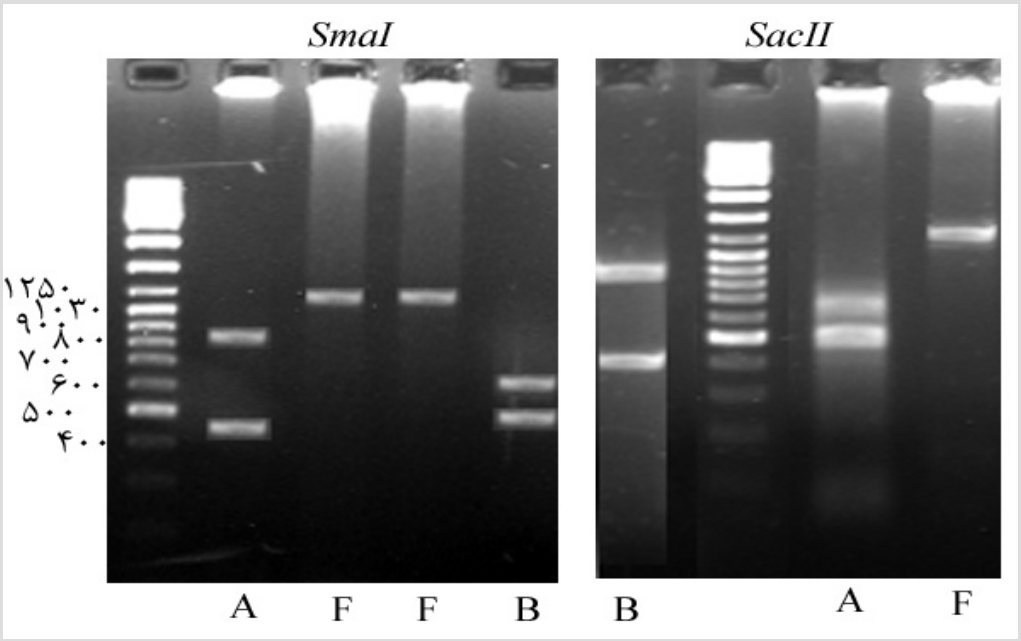
استخراج DNA با روش فنل کلروفرم به خوبی انجام شـده و محـصول نهـایی PCR، قطعـه ای ۱۰۷۲ جفـت‌بـازی کـه بـا اسـتفاده از پرایمرهـای سـنتز شـده، تکثیـر شـد. بـرای هـضم آنزیمی قطعه فوق، از ۸ آنزیم برشی استفاده شده و الگوهـای الکتروفورزی با ژل آگارز ۳-۲ درصد به دست آمد.

از ۸ آنـزیم مـورد اسـتفاده،۳ آنـزیم *BamHI*, *RsaI* و *SacI* محصولات PCR را برش ندادند ولی ۵ آنزیم *SacII*, *PstI*, *SmaI*, *EcoRI* و *TaqI* محـصولات PCR را بـا الگوهای متفاوتی، برش دادند (شکل های ۲ و ۳).


www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۲**– الگوهای هضمی محصول PCR بوسیله آنزیم های برشی *EcoRI, PstI*، *TaqI*، *SmaI* و *SacII* روی ژل آگارز ۲ درصد (حروف A, B و F ژنوتیپ های ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی می باشد).



www.SID.ir

Archive of SID

در مجموع ۱۰ هاپلوتیپ بوجود آمد که بیشترین فراوانی هاپلوتیپ‌ها در رودخانه های هراز و گزافرود مربوط به هاپلوتیپ AFFAA و در رودخانه شیرود مربوط به هاپلوتیپ AFFAF می‌باشد. ۳ هاپلوتیپ AFFAA, AFFAF و ABFAF در جمعیت‌های هر سه رودخانه وجود داشته است و هاپلوتیپ های AFFBB و AFFBF مختص رودخانه هراز، هاپلوتیپ AAABB مختص رودخانه شیرود و هاپلوتیپ های BAAAB و AAABA مختص رودخانه گزافرود بودند ( جدول ۱).

**جدول ۱**- توزیع فراوانی نسبی هاپلوتیپهای مختلف در ماهی شاه کولی *Chalcalburnus chalcoides* جمعیتهای هراز، شیرود و گزافرود.

| هاپلوتیپ ها | فراوانی ٪ | | |
|---|---|---|---|
| | رودخانه هراز (n=۲۲) | رودخانه شیرود (n=۲۰) | رودخانه گزافرود (n=۱۹) |
| AFFAA | ۳۸/۰۸ | ۲۰ | ۶۲/۴ |
| AFFBB | ۴/۷۶ | ۰/۰ | ۰/۰ |
| AFFBF | ۴/۷۶ | ۰/۰ | ۰/۰ |
| BFFAF | ۹/۵ | ۱۰ | ۰/۰ |
| AFFAF | ۲۳/۸ | ۳۰ | ۱۵/۶ |
| ABFAF | ۱۹/۰۴ | ۲۵ | ۱۰/۴ |
| ABFAA | ۴/۷۶ | ۱۰ | ۰/۰ |
| AAABB | ۰/۰ | ۵ | ۰/۰ |
| BAAAB | ۰/۰ | ۰/۰ | ۵/۲ |
| AAABA | ۰/۰ | ۰/۰ | ۵/۲ |

انجام آزمون ناهمگنی با استفاده از شبیه سازی Monte-carlo، نشان داد که اختلاف معنی داری در توزیع هاپلوتیپ‌ها بین جمعیت‌های هراز، شیرود و گزافرود وجود ندارد ($P \geq ۰/۰۵$ و $\chi^2 = 12.12$) و توزیع هاپلوتیپ‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه همگن می‌باشد. بیشترین تنوع هاپلوتیپ‌ها در درون جمعیت رودخانه شیرود (۰/۸۲۶۳) و کمترین تنوع در جمعیت رودخانه گزافرود (۰/۵۹۰۶) دیده شد. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها در سه منطقه نیز ۰/۷۴۰۷ می‌باشد.

تنوع نوکلئوتیدها در درون سه جمعیت نشان داده که بیشترین و کمترین تنوع به ترتیب در جمعیت‌های رودخانه‌های هراز و گزافرود بوده و میانگین تنوع نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ‌های سه جمعیت ۰/۰۰۰۰۳۳۸ ± ۰/۰۴۵۹۸۱ می‌باشد که تنوع نسبتا پایینی را نشان می‌دهد. این شاخص در بین دو جمعیت هراز و شیرود نیز بیشترین مقدار (۰/۰۴۹۴۴۲) و بین دو جمعیت هراز و گزافرود کمترین مقدار (۰/۰۴۴۵۶۸) بوده است.

بیشترین تفرق نوکلئوتیدی بین دو جمعیت رودخانه شیرود و گزافرود (۰/۲۱۵۱ ٪) و کمترین تفرق نوکلئوتیدی بین دو جمعیت هراز و شیرود (۰/۲۳۴۸- ٪) مشاهده شد. میانگین تفرق نوکلئوتیدهای نمونه‌های سه جمعیت۰/۰۰۰۰۰۱۹ ± ۰/۰۳۵۶ ٪ بوده که از نظر آماری این میزان جدایی جمعیت‌ها، نسبتا پایین می‌باشد.

## بحث

روش RFLP یکی از تکنیک‌های مولکولی مناسب برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها می‌باشد (Cronin *et al.*, 1994). اغلب گزارشات در زمینه تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری ماهی‌ها، تنوع هاپلوئیدی کمی را نشان داده و در واقع تعداد هاپلوتیپ‌های موجود، مشتقات جهش یافته می باشند (Billington and Herbert, 1991).

نتایج نشان داده که اندازه محصول PCR ژن 18S rRNA، ۱۰۷۲ جفت باز بوده که برای ۶۱ نمونه از سه جمعیت رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود بدست آمد. با توجه به اینکه توالی ژن 18S rRNA برای گونه شاه‌کولی در ژن بانک جهانی وجود نداشته و به ناچار


www.SID.ir

Archive of SID

جهت طراحی و سنتز آغازگر از توالی این ژن در ماهی قزل‌آلا استفاده گردید. تکثیر ژن 18S rRNA با آغازگرهای فوق توسط واکنش PCR منجر به تولید قطعه‌ای تقریبا به طول ۱۲۷۷ جفت باز در این ماهی شده است که در برخی نمونه ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز موفقیت آمیز نبوده و از PCR داخلی (Nested- PCR) جهت تهیه محصول PCR استفاده شد و اندازه قطعه نهایی ۱۰۷۲ جفت باز می باشد.

نتایج حاصل از تعیین توالی محصول PCR نشان داده که ۸۵۰ جفت باز تعیین توالی شده و به کمک نرم افزار DNAsis آنزیم‌های برش دهنده مشخص شدند که از ۸ آنزیم محدود کننده، ۵ آنزیم برشی، وجود پلی مرفیسم را در جمعیت‌ها نشان دادند که نتایج فوق، نظر (Herbert and Billington, 1991) را در مورد تعداد کم هاپلوتیپ‌ها با فراوانی زیاد و تعداد زیاد هاپلوتیپ‌ها با فراوانی کم در جمعیت‌هایی که محصول موتاسیون هستند را تایید می‌کند.

فراوانی هاپلوتیپ‌ها در بین مناطق مورد مطالعه اختلاف معنی داری را نشان نداد (P=./۹۰۶ و $\chi^2$=۷/۳۴) که علت این امر ممکن است تعداد کم نمونه‌ها و یا تعداد محل‌های نمونه‌برداری باشد که برای رفع آن از شبیه سازی Monte- carlo با هزار بار تکرار استفاده گردید. نتایج نشان داد که با هزار بار تکرار نیز اختلاف معنی داری در فراوانی هاپلوتیپ‌های جمعیت‌های مورد مطالعه وجود ندارد (P=./۹۰۶ و $\chi^2$=۱۲/۱۲) که با نتایج محققین دیگر در مورد گونه‌های دیگر مطابقت دارد.

بررسی ها نشان داد که بیشترین و کمترین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در درون جمعیت‌ها به ترتیب در رودخانه‌های هراز و گزافرود مشاهده شد. مقایسه میزان تنوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیت نشان داد که بیشترین میزان تنوع بین دو جمعیت هراز و شیرود و کمترین آن بین دو جمعیت هراز و گزافرود می‌باشد که البته این تفاوت‌ها قابل توجه نمی‌باشد.

نتایج بدست آمده تفاوت نوکلئوتیدی پایینی (۰/۰۳۵۶ ٪) را بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داده است، (Loeschcke and Hansen, 1996) مهم‌ترین عامل شکل‌گیری ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را جدایی جغرافیایی می‌داند که باعث ایجاد جمعیت‌های جدا در یک گونه می‌شوند. مراحل اولیه گونه‌زایی نیز ایجاد جمعیت‌های جدا از هم بوده که بواسطه جدایی تولید مثلی ایجاد می شود (Quinta *et al.*, 2004) و اصولا اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه خاص بوجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه بواسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌کنند و خصوصیات تولید مثلی یک گونه عامل اصلی در تمایز آن جمعیت می‌باشد (Gyllensten and Wilson, 1986).

با توجه به یافته‌های این تحقیق و احتمال جدایی جمعیت‌ها انجام مطالعات بیشتر با استفاده از تعداد نمونه بیشتر، ژن‌های مناسب و موثر در مهاجرت این گونه به رودخانه‌های مختلف، آنزیم های قطع‌کننده متنوع و استفاده از روش‌ها دیگر مانند AFLP و Microsatellite ضروری به نظر می‌رسد. این اطلاعات می‌تواند در بهره‌برداری و بازسازی احتمالی ذخایر این گونه در سال‌های آینده، مورد استفاده قرار گیرند.

## تشکرو قدردانی

از ریاست و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی، سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و همکارهای صمیمانه شان کمال تشکر را داریم.



www.SID.ir

Archive of SID

## پی‌نوشت

1- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

## منابع


Azari Takami, G. and R. Rajabinezhad (2002). Study of fecundity of Shemaya, *Chalcalburnus chalcoides* in the Sefidrud River. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6(4): 231-239.

Berg, L.S. (1949). *Freshwater fishes of the U.S.S.R. and adjacent countries*. Trady institute Acad, U.S.S.R. (translated to English in 1962). Vol 2: 469p.

Billington, N. and P.D.N. Herbert (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implication for introduction. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 48(supple 1): 80-94.

Bogutskaya, N.G. (1997). Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 2. An annotated check- list of leuciscine fishes (Leuciscinae, Cyprinidae) of Turkey with descriptions of a new species and two new subspecies. *Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst*, 94: 161-186.

Bonnaud, L., R. Boucher- Rodoni and M. Monnerot (1997). Phylogeny of cephalopods inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 7(1): 44-54.

Cronin, M.A., S. Hilis, E.W. Born and C. Potton. (1994). mtDNA variation in Atlantic and Pacific waleruses. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 1035-1043.

Iranian Fisheries Research and Training Organization (2000). *Stock assessment of Teleost fishes in Caspian Sea*. Ghaninezhade, D., S. Abdolmaleki and H. Fazli. Tehran: Iranian Fisheries Research and Training Organization.

Gross, R., K. Kohlmann and P. Kersten (2002). PCR-RFLP analysis of the mtDNA ND3/4 and ND5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp *(Cyprinus carpio* L.). *Journal of Aquaculture*, 204: 507-516.

Gyllensten, U. and A.C. Wilson (1986). *Mitochondrial DNA of Salmonids: Intraspecific variability detected with restriction enzymes. Population genetic and fishery management*. Washington: University of Washington press.

Hansen, M.M. and V. Loeschcke (1996). Genetic differentiation among Danish brown trout population as detected by RFLP amplified mtDNA segments. *Journal of fish Biology*,19: 422-439.

Imsiridou, A., A.P. Aostolidis, J.D. Durand, J. Brioly, Y. Bouvet and C. Triantaphyllidis (1998). Genetic differentiation and Phylogenetic relationships among Greek Chub *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mtDNA. *Journal of Biochemical Systematics & Ecology*, 26:416-429.

Karimpour, M., N. Hosseinpour and D. Haghighi (1993). Biological survey of *Chalcalburnus chalcoides* spawning migration in Anzali Lagoon. *Iranian Fisheries Scientific Journal*, 4: 39-52.




www.SID.ir

Archive of SID

Sambrook, J. and D.W. Russell (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Habor, New york.

Slastenenko, E. (1955). *The fishes of the Black Sea basin. The publication of the Meat and Fish Office*, Islanbul-Turkey (in Turkish with English summery).

Khaval, A. (1998). The migration of *Rutilus frissi Kutum*, *Vimba vimba persa* and *Chalcalburnus chalcoides* to the Sefidrud River. *Iranian Fisheries Scientific Journal*, 6(4): 75-86.

Kiabi, B.H., A. Abdoli, and M. Naderi (1999). Status of the fish fauna in the south Caspian basin of Iran. *Journal of Zoology in the Middle East*, 18: 57-65.

Nahavandi, R., S. Rezvani Gilkolaei, G.H. Vosoughi, and B. Kazemi (2005). Gene 18s rRNA variation of Cuttlefish population, *Sepia pharaonis*, in the Persian Gulf and the Oman Sea using PCR-RFLP method. *Iranian Fisheries Scientific Journal*, 14(2)157-168.

Quinta, R., L. Gomes and A.T.D. Santos (2004). A mitochondrial DNA PCR – RFLP marker for population studies of the black Scabbard fish (*Aphanopus carbo*). *Journal of Marine Sciences*, 61: 864 – 867.

Rahmani, H. (2006). *Population dynamics and Genetic variation of Shemaya, Chalcalburnus chalcoides in Haraz, Shirud and Gazafrud rivers.* Ph.D. thesis, Gorgan University.

Rezvani Gilkolaei, S. (1997). *Molecular population genetic of Sturgeon species in the south Caspian Sea*. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences University of Wales.

Roff, D.A. and P. Bentzen (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: $\chi^2$ and problem of small sample size. *Molecular Biology Evolution*, 5: 539-545.



www.SID.ir