

بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 در تالاب انزلی و مصب گرگانرود به روش مولکولی میکروستلایت

آمنه امیرجنتی^۱، مهرنوش نوروزی^{۱*}، علی ناظمی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه شیلات و بیولوژی دریا، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۴۶۸۱۷

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن گروه زیست شناسی، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۴۶۸۱۷

تاریخ پذیرش: ۲۰ تیر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲۲ فروردین ۱۳۹۲

چکیده

ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* متعلق به خانواده Cyprinidae، بزرگ‌ترین خانواده ماهیان استخوانی حقیقی آب شیرین و یکی از گونه‌های مهم اقتصادی در دریای خزر است. در دهه‌های اخیر جهت بازسازی ذخایر کپور معمولی از طریق تکثیر مصنوعی اقدام شده که می‌تواند منجر به تغییر در تنوع ژنتیکی شود. از این رو ساختار ژنتیک جمعیت آن در تالاب انزلی و مصب گرگانرود با استفاده از میکروستلایت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۶۰ نمونه ماهی بالغ از دو منطقه جمع‌آوری شد و از هفت جفت پرایمر میکروستلایت، بر روی DNA ژنومی ماهی کپور استفاده گردید که پنج جفت از پرایمرها چند شکل (پلی مورف) نشان دادند. میانگین الی آن‌ها در لوکوس‌ها ۵/۹ (دامنه Na، ۷ تا ۱۲ ال در جایگاه‌ها) بود. هر دو منطقه نمونه‌برداری ال‌های اختصاصی در تمامی لوکوس‌ها نشان دادند. میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۴۹ و ۰/۸۱ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) به جز یک جایگاه در نمونه‌های انزلی (Syp4)، سایر جایگاه‌ها خارج از تعادل هاردی-وینبرگ بودند ($P < 0/01$). بر اساس تست AMOVA میزان Rst و Fst بین دو منطقه معنی دار بود ($P < 0/01$). این بررسی، وجود حداقل دو جمعیت متمایز ژنتیکی ماهی کپور در تالاب انزلی و مصب گرگانرود را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: تالاب انزلی، مصب گرگانرود، ماهی کپور، *Cyprinus carpio*، ژنتیک جمعیت، میکروستلایت.

مقدمه

ماهیان در بین مهره‌داران بیشترین تنوع را به خود اختصاص داده‌اند. بررسی ماهیان در بوم‌سازگان‌های آبی به دلایل متعددی از جمله حفاظت از آن‌ها، مدیریت منابع آبی و بهره‌برداری ذخایر و پرورش ماهی حائز اهمیت است. استفاده اصولی و پایدار از این ذخایر ارزشمند زیستی در دریای خزر در درجه اول نیازمند شناخت کامل از ذخایر و جمعیت‌های موجود این ماهیان می‌باشد. این آگاهی می‌تواند راهگشای برنامه‌ریزی برای مسئولین مربوطه و کلیه عوامل بهره‌بردار در جهت کمک به حفظ ذخایر موجود، کاهش فشار صید، رهاسازی اصولی بچه ماهیان تکثیر شده در مراکز مربوطه و گسترش فعالیت‌های تکثیر و پرورش مصنوعی کپور ماهیان دریای خزر باشد. در طول قرن گذشته پراکنش و فراوانی اندازه جمعیت بسیاری از گونه‌ها به شدت تحت تاثیر فعالیت‌های انسانی قرار داشته است. انقراض گونه‌ها، تکثیر مصنوعی و یا انتقال و معرفی انواع گونه‌ها به محل دیگر به یک امر متداول تبدیل شده و در مورد این که این اعمال چگونه پراکنش افراد و اختلاف ژنتیکی در یک جمعیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد، شناخت کمی وجود دارد. فعالیت‌های انسانی ساختار جمعیت‌ها را تحت تاثیر قرار داده تا جاییکه افزایش تکثیر مصنوعی سبب یکسان سازی ژنتیکی می‌شود، بنابراین شناخت ترکیب طبیعی و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌ها امری مهم است (Zhao et al., 2005). ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758 از خانواده Cyprinidae، بومی آسیای مرکزی است که طی قرن‌های متمادی در نواحی مختلف جهان گسترش پیدا کرده‌است (Kohlmann et al., 2003). این ماهی از

گونه‌های اقتصادی دریای خزر است و به عنوان منبع غذایی مهمی محسوب می‌گردد. هرچند این گونه به صورت بومی و طبیعی در تمام سواحل دریای خزر وجود دارد و برای تولید مثل وارد مصب رودخانه‌ها می‌شود، اما در سال‌های اخیر به علت صید بیش از حد و از بین رفتن محل‌های تولید مثل، نسل آن کاهش پیدا کرده، به طوری که جزء گونه‌های نیازمند به حفاظت در منطقه به شمار می‌رود (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). در از سالیان گذشته، حفاظت و بازسازی ذخایر این ماهی با ارزش در ایران از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان تولیدی در آب‌های طبیعی صورت می‌پذیرد. تنوع ژنتیکی منابع دریایی اهمیتی حیاتی برای حفاظت و مدیریت از آن‌ها داشته و به عنوان اولین پیش نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر محسوب می‌گردد (Diz and Persa, 2009). لذا اطلاعات درباره تاریخچه جمعیت‌ها و ساختار ژنتیکی آن‌ها برای پیشبرد برنامه‌های مربوط به حفاظت از گونه‌هایی که در معرض تکثیر مصنوعی قرار دارند، سودمند خواهد بود (Zhang et al., 2002). از آنجاییکه اثر روش‌های تکثیر مصنوعی بر ذخایر ژنتیکی آبزیان اثبات شده‌است و هم اکنون نیز بخشی از ذخایر این گونه از تکثیر مصنوعی حاصل می‌گردد، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه بسیار ضروری است. روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی آبزیان وجود دارد از جمله این تکنیک‌ها استفاده از ریز ماهواره‌ها یا همان میکروستلایت (Microsatellite) است که به علت مزایای زیاد از جمله فراوانی و گسترده‌گی بالا در ژنوم، همباز بودن، پلی مورفیسم بالا و رتبه دهی آسان و دقیق کاربرد گسترده‌ای دارند (Chen et al., 2008). لذا در این بررسی از نشانگرهای

نگهداری شدند. استخراج DNA از بافت باله‌ی دمی ماهی کپور معمولی با استفاده از کیت شرکت Roach آلمان و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری (CECIL مدل CE2040) و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز PCR با ۷ جفت پرایمر میکروستلایت MF7، MF6، MF9 (Thai et al., 2007)، Ca3/4 (Dimoski et al., 2000)، SyP4 (Turner et al., 1997)، Z9/10 و Loc5 (Crooijmans et al., 2004) انجام گردید (جدول ۱). واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت BIO-RAD با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میلی مولار dNTP، یک میکرولیتر پرایمر، ۵۰ میلی مولار MgCl₂، ۱ میکرولیتر، ۰/۴ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲-۳ میکرومولار DNA هدف و با آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به ترتیب مرحله جدا سازی ۹۵-۹۴ درجه سانتی گراد از ۳۰-۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۸ تا ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰-۴۰ ثانیه و ۳۵ چرخه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه تا یک دقیقه بهینه‌سازی گردید. محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (دیونیزه) الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت (Bassam et al., 1991) و تصویر ژل‌ها تهیه گردید و با استفاده از نرم افزار Uvitec بررسی شد.

آنالیز آماری شامل فراوانی اللی (Allel frequency)، تعداد اللی (Na) و تعداد الل‌های موثر (Ne) در جایگاه‌های میکروستلایتی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده

میکروستلایت برای ارزیابی هر چه بهتر ساختار جمعیتی این گونه در مناطق انزلی و گلستان که از مناطق مهم پراکنش این ماهی هستند استفاده شد.

از مطالعات انجام شده با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت بر روی ماهی کپور معمولی می‌توان به Lior و همکاران (۲۰۰۳)، Hanfeling و همکاران (۲۰۰۵)، Kohlman و همکاران (۲۰۰۵)، Mondo و همکاران (۲۰۰۶)، Thai و همکاران (۲۰۰۷)، Yousefian and Laloei (۲۰۱۱)، Yousefian (۲۰۱۱) اشاره شود.

مطالعه حاضر با استفاده از جایگاه‌های میکروستلایتی برای مطالعه ساختار جمعیت‌های این ماهی کپور معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر در تالاب انزلی و مصب گرگانرود انجام گردید. با این فرض که ماهی کپور معمولی دارای جمعیت‌های مختلف در این دو منطقه است و فراوانی ژنوتیپی و اللی هر یک از جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت است، بنابراین نمونه برداری از این دو منطقه انجام شد تا وجود جمعیت‌های احتمالی و تمایز ژنتیکی بین دو منطقه با استفاده از جایگاه‌های میکروستلایت شناسایی شود و ضرورت اعمال مدیریتی متفاوت بر ذخایر این گونه در دریای خزر بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

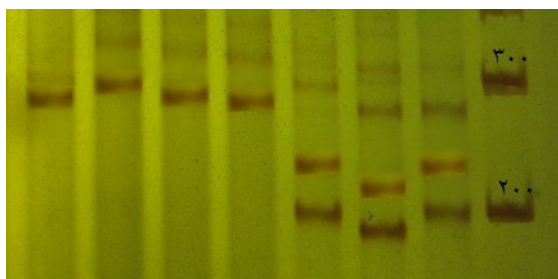
از هر منطقه (تالاب انزلی و مصب گرگانرود) ۳۰ نمونه ماهی بالغ کپور وحشی در پاییز ۱۳۹۰، از قسمت باله‌ی دمی انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶٪ تثبیت گردید و در نهایت به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انتقال یافت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد، تا شروع مرحله‌ی استخراج DNA

شده (Ho)، مقادیر F_{st} ، R_{st} و F_{is} ماتریس شباهت (Genetic identity) و فاصله ژنتیکی (Genetic distance) بر اساس Nei (1972) و تعادل هاردی وینبرگ براساس مربع کای، تمایز ژنتیکی بر اساس تست AMOVA

(Analysis of Molecular Variance) در سطح احتمال ۰/۰۱ با استفاده از نرم افزار GeneAlex (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه گردید.

جدول ۱: لوکوس، توالی هر یک از پرایمرها

شماره	لوکوس	توالی پرایمرها	رفرنس
۱	MFW6	F-ACCTGATCAATCCCTGGCTC R-GTTTGGGACTTTTAAATCACGTTG	Thai <i>et al.</i> , 2007
۲	MFW7	F-TACTTTGCTCAGGACGGATGC R-GTTTATCACCTGCACATCGCCACTC	
۳	MFW9	F-GATCTGCAAGCATATCTGTCG R-GTTTATCTGAACCTGCAGCTCCTC	
۴	SyP4	F-CACACCGGGCTACTGCAGAG R-GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	Crooijmans <i>et al.</i> , 1997
۵	Loc5	F-TTACACAGCCAAGACTATGT R-CAAGTGATTTTGCTTACTGC	Turner <i>et al.</i> , 2004
۶	Z9/10	F-CGTCTGACAGCCTGCATG R-CTCGGCGCAGTAGGGAAC	
۷	Ca3/4	F-GGACAGTGAGGGACGCAGAC R-TCYAGCCCCAAATTTTACGG	Dimoski <i>et al.</i> , 2000

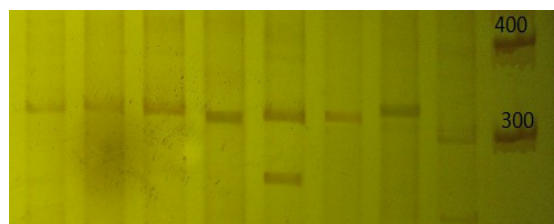


شکل ۲: محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی کپور معمولی با استفاده از پرایمر MFW7

در این بررسی، در کل ۵۶ ال شناسایی شد. ۴۶ ال، در نمونه‌های تالاب انزلی شناسایی شد که ۲۶ ال آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند و ۴۹ ال، در نمونه‌های مصب گرگانود شناسایی شد که ۱۸ ال آن در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر هستند (جدول ۲). بیشترین فراوانی الی (۰/۳۰۰) را جایگاه‌های SyP4 و MFW9 به ترتیب در تالاب انزلی و مصب گرگانود نشان دادند. بیشترین تعداد الی را جایگاه MFW6 با ۱۳ ال نشان داد (جدول ۲).

نتایج

به منظور بررسی ژنتیک جمعیت نمونه‌های ماهی کپور معمولی در تالاب انزلی و مصب گرگانود از ۷ جفت پرایمر میکروستلایت استفاده گردید که پس از تکثیر و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید، ۵ جفت پرایمر، تولید باندهای پلی مورفیک نمودند (MFW6، MFW7، MFW9، Ca3/4 و SyP4). در هنگام شمارش الگوی باندهای در تمامی جایگاه‌ها یک باند و در برخی موارد دو باند دیده شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی کپور معمولی با استفاده از پرایمر Ca3/4

جدول ۲: مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل های مؤثر (Ne)، الهای اختصاصی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی قابل انتظار (He)، انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ (معنی دار نیست، ns؛ $P < 0.001$ ***؛ $P < 0.01$ **؛ $P < 0.05$ *) در ۵ جایگاه میکروستلایت

مناطق نمونه برداری	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	اندازه باند (جفت باز)
جایگاه	مصب گرگانرود	تالاب انزلی
MFW6	۶۳	۱۳۰-۲۱۹
Na(Ne)	۱۱(۹/۲۳)	۱۰(۵/۵۷)
Ho(He)	۱(۰/۸۹۲)***	۱(۰/۸۲۱)*
MFW7	۶۳	۱۹۲-۲۶۲
Na(Ne)	۱۱(۸/۴)	۱۲(۹/۸)
Ho(He)	۰/۷۶۷ (۰/۸۸۲)**	۰/۷۰۰ (۰/۸۹۸)***
MFW9	۶۱	۹۲-۱۴۴
Na(Ne)	۸(۵/۶)	۷(۵/۲)
Ho(He)	۱(۰/۸۲۲)*	۱(۰/۸۰۸)***
Syp4	۵۹	۴۶۴-۱۲۴
Na(Ne)	۱۱(۷/۵۹۵)	۸(۵/۲)
Ho(He)	۱(۰/۸۶۸)***	۱(۰/۸۱۱) ns
Ca3/4	۵۸	۱۲۴-۴۶۴
Na(Ne)	۸(۵/۸)	۹(۶/۹۵)
Ho(He)	۰/۲۶۷ (۰/۸۲۸)**	۰/۳۶۷ (۰/۸۵۶)***
میانگین Na(Ne)	۹/۸(۷/۳)	۹/۲(۶/۵)
میانگین Ho(He)	۰/۸۰۷(۰/۸۵۸)	۰/۸۱۳(۰/۸۳۹)
۹/۵(۶/۹)	۰/۸۱۰(۰/۸۴۹)	کل

میانگین تعداد کل الل واقعی و مؤثر به ترتیب ۹/۵ و ۶/۹ بود و دامنه اللی از ۷ تا ۱۲ الل به دست آمد. میانگین تعداد الل واقعی و مؤثر در تالاب انزلی به ترتیب ۹/۲ و ۶/۵ و مصب گرگانرود به ترتیب ۹/۸ و ۷/۳ به دست آمد (جدول ۲). تعداد زیادی الل در فراوانی ۰/۰۵ یا کمتر یافت شد. مجموعاً ۸ الل اختصاصی یافت شد. نمونه های تالاب انزلی و مصب گرگانرود به ترتیب دارای ۲ و ۶ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰/۰۵ بودند که در منطقه دیگر نمونه برداری مشاهده نشد. بیشترین الل اختصاصی را جایگاه Ca3/4 با ۳ الل اختصاصی (یک عدد در تالاب انزلی به فراوانی ۰/۱۰۰ و ۲ عدد در مصب گرگانرود

به ترتیب به فراوانی ۰/۲۰۰ و ۰/۰۸۳) نشان داد. جایگاه MFW6 با تعداد ۲ الل اختصاصی هر دو در مصب گرگانرود (به فراوانی ۰/۱۰۰ و ۰/۱۵۰) نشان داد. جایگاه MFW9 با تعداد ۲ الل اختصاصی هر دو در مصب گرگانرود (به فراوانی ۰/۰۸۳) نشان داد. جایگاه Syp4 با تعداد یک الل اختصاصی در مصب گرگانرود (به فراوانی ۰/۱۱۷) نشان داد. جایگاه MFW7 هیچ الل اختصاصی نشان نداد.

در این بررسی دامنه Ho بین دو فصل نمونه برداری در تمامی جایگاه ها ۰/۲۶۷ تا ۱ و متوسط ۰/۸۱ بود. میانگین Ho در تالاب انزلی و مصب گرگانرود به ترتیب ۰/۸۱۳ و ۰/۸۰۷ بود. دامنه He نیز بین ۰/۸۰۸ تا

۰/۸۹۲ و متوسط آن ۰/۸۴۹ است. میانگین He در تالاب انزلی و مصب گرگانرود به ترتیب ۰/۸۳۹ و ۰/۸۵۴ بود (جدول ۲). در بررسی تعادل هاردی وینبرگ (H-W) همه جایگاه‌ها خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$). فقط در جایگاه SyP4 در تالاب انزلی انحراف از تعادل دیده نشد (جدول ۲).

میزان Fst بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۲۹ به دست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد. میزان Fst و Rst بر اساس تست AMOVA، معنی دار بود ($P < 0.001$) و بر اساس Rst میزان جریان ژنی ۲/۷

محاسبه شد. میانگین ضریب آمیزش خویشاوندی (Fis) در تمامی جایگاه‌های میکروستلایتی ۰/۰۴۳ بود و دامنه آن از ۰/۶۲۴ در جایگاه Ca3/4 تا ۰/۲۲۷- در جایگاه MFW9 محاسبه گردید (جدول ۳). مقادیر مثبت Fis نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه MFW9 با کم‌ترین میزان Fis بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جایگاه‌ها نشان داد (جدول ۳). فاصله ژنتیکی بر اساس Nei، ۰/۳۹۹ و میزان شباهت ژنتیکی ۰/۶۷۱ به دست آمد.

جدول ۳: میزان شاخص تمایز (F_{ST}) و ضریب خویشاوندی (F_{IS}) در هر جایگاه

جایگاه						
	MFW6	MFW7	MFW9	Syp4	Ca3	(SE) میانگین
Fst	۰/۰۳۳	۰/۰۰۴	۰/۰۴۷	۰/۰۱۹	۰/۰۴۱	۰/۰۲۹ (۰/۰۰۸)
Fis	-۰/۱۶۸	۰/۱۷۶	-۰/۲۲۷	-۰/۱۹۱	۰/۶۲۴	۰/۰۴۳ (۰/۱۶۲)

بحث

بررسی اکولوژی و ژنتیک جمعیت ماهیان با ارزش اقتصادی، برای حفاظت از ذخایر آن‌ها و تداوم صید پایدار، بسیار ضروری است (Wang et al., 2011). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند. بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al., 1996) و اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع دریایی دارد و به عنوان اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می‌گردد (Diz and Presa, 2009). همچنین هر چه دانش ما از جمعیت‌ها و تنوع درون گونه‌ای گونه‌ها

بیشتر باشد تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت آمیزتر است. هم‌اکنون، کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا توجه محققان را به اعمال روش‌های دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب نموده است.

همچنین مقایسه ساختار ژنتیکی دو جمعیت کپور معمولی در مناطق قره‌سو و انزلی با استفاده از میکروستلایت توسط قلیچ پور و همکاران (۱۳۸۹) انجام شد. نتایج آن‌ها بیانگر این امر بود که جمعیت‌های مورد بررسی از غنای اللی و تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردارند. ضمن اینکه بر اساس نتایج آن‌ها، وجود هتروزیگوسیتی بالا در منطقه قره‌سو، گویای جریان ژنی بالا در این منطقه بوده‌است که تأثیرات منفی تکثیر

مصنوعی بر تنوع ژنتیکی را خنثی می‌کند. در مقایسه با تحقیقات سایرین در ماهی کپور معمولی با استفاده از میکروستلایت‌ها، Kohlmann و همکاران (۲۰۰۵) میانگین تعداد اللی به دست آمده (۸/۱۷) و دامنه اللی بین ۲/۵ تا ۱۴ ال در جایگاه‌ها به دست آورد، Mondo و همکاران (۲۰۰۶)، میانگین تعداد اللی در سویه‌های مختلف کپور معمولی را بین ۶ تا ۷/۴۰ ال به دست آوردند. Thai و همکاران (۲۰۰۷) دامنه اللی بین ۴/۲۵ تا ۱۱ ال در جایگاه‌ها اعلام کردند، Yousefian and Laloei (۲۰۱۱)، دامنه اللی بین ۶ تا ۱۰ ال به دست آوردند. Yousefian (۲۰۱۱)، دامنه اللی بین ۵/۵ تا ۱۳ ال به دست آورد. قلیچ پور و همکاران (۱۳۸۹) دامنه اللی را بین ۱۱ تا ۱۸ ال اعلام نمودند. در بررسی حاضر میانگین تعداد اللی ۶/۹ و دامنه اللی بین ۷ تا ۱۲ ال به دست آمد. در بررسی حاضر، اگرچه دو منطقه اختلاف معنی‌داری را در میزان تنوع ژنتیکی در جایگاه‌ها نشان ندادند، اما تفاوت معنی‌داری در تمایز ژنتیکی نشان دادند. در سال‌های اخیر به دلیل افزایش فعالیت صیادی مجاز و غیرقانونی، کاهش ضریب بازگشت بچه ماهیان رهاسازی شده ناشی از کاهش وزن رهاسازی و کاهش تکثیر طبیعی باعث شده است، میزان صید ماهیان استخوانی روند کاهشی پیدا کند (قربانی و همکاران، ۱۳۸۹). با وجود اینکه تعداد اللی به دست آمده در محدوده ماهیان آب شیرین و ماهی کپور معمولی می‌باشد. اما در این بررسی تعداد زیادی ال با فراوانی پایین به دست آمد. وجود ال‌های زیاد با فراوانی پایین نشان دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon *et al.*, 2004). کاهش تغییرپذیری ژنتیکی در ذخایر وحشی را به کاهش شدید ذخایر این ماهی در سالیان گذشته

می‌توان نسبت داد. متأسفانه، یکی از عواملی که در طی سال‌های اخیر باعث فشار بر ذخایر و بهره‌برداری بی‌رویه از ذخایر گردیده، سهم بسیار زیاد صید ماهیان غیراستاندارد و نابالغ است. کوچک بودن اندازه چشمه در قسمت کیسه پره‌های ساحلی باعث گردیده که سهم ماهیان غیراستاندارد در صید، در حد بسیار زیادی باشد (قربانی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین در تالاب انزلی مشکلاتی از قبیل صید بی‌رویه، آلودگی زیست محیطی، تخریب زیستگاه اصلی (تالاب انزلی) و پایین آمدن سطح آب دریای خزر طی چند دهه گذشته، منجر به کاهش ذخایر ماهیان در تالاب انزلی شده‌است. روند کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش می‌دهد (Shen and Gong, 2004) و در صورت تداوم وضع موجود باید شاهد کاهش شدید در اندازه جمعیت این گونه در آینده نزدیک بود.

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش‌پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است (Beardmore *et al.*, 1997). نتایج بررسی حاضر بر روی ماهی کپور معمولی نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی $(\pm 0/09)$ ۰/۸۱ است و بیشتر از مقدار اعلام شده $(\pm 0/25)$ ۰/۵۴ برای ماهیان آب شیرین است (DeWoody and Avis, 2000). در این بررسی در هر دو منطقه نمونه برداری میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود. در مقایسه با تحقیقات سایرین در ماهی کپور معمولی،

Kohlmann و همکاران (۲۰۰۵) دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۴۲۶ تا ۰/۸۸۷ به دست آورند، Mondo و همکاران (۲۰۰۶)، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۵۱ تا ۰/۷۶ و هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۷۵ تا ۰/۸۲ به دست آورند. Thai و همکاران (۲۰۰۷) دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴ تا ۰/۸۳ اعلام نمودند. Yousefian and Laloei (۲۰۱۱)، دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۶۴۹ تا ۰/۸۵۶ به دست آورند. Yousefian (۲۰۱۱)، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴۱۲ تا یک و هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۶۹۶ تا ۰/۸۵۶ به دست آورند. قلیچ پور و همکاران (۱۳۸۹) میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را یک و هتروزیگوسیتی قابل انتظار را ۰/۹ به دست آوردند و آنرا دلیلی بر تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های کپور معمولی در مناطق مورد بررسی دانستند. در بررسی حاضر، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۳۶۷ تا یک و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۸۰۸ تا ۰/۸۹۸ به دست آمد. به نظر McQuown و همکاران (۲۰۰۳) افزایش هتروزیگوسیتی در برخی جایگاه‌ها احتمالاً به خاطر وجود اللهای نول می‌باشد که به اشتباه رتبه دهی شده‌اند. علاوه بر ال‌هایی با فراوانی پایین، ضریب خویشاوندی مثبت دلیلی دیگر بر کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش آمیزش خویشاوندی است که تحت تاثیر عواملی همچون صید بی‌رویه، کاهش تکثیر طبیعی و شیوه‌های نادرست تکثیر مصنوعی است.

در بررسی حاضر بر روی ماهی کپور معمولی، در هر دو منطقه نمونه برداری تقریباً تمامی لوکوس‌ها خارج از تعادل هاردی-وینبرگ بودند ($P \leq 0.001$). Kohlmann و همکاران (۲۰۰۷)، Mondo و همکاران (۲۰۰۶)، Thai و همکاران (۲۰۰۷)، Yousefian and

Laloei (۲۰۱۱)، Yousefian (۲۰۱۱)، انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ را در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی کپور معمولی به وسیله میکروستلایت‌ها گزارش کردند. Mondo و همکاران (۲۰۰۶)، Thai و همکاران (۲۰۰۷)، انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ را در جایگاه‌ها ناشی از اندازه کوچک جمعیت موثر و تنگنای ژنتیکی (در جمعیت‌های هجری) بیان کردند. به نظر می‌رسد، در بررسی حاضر افزایش هتروزیگوسیتی، اختلاط جمعیت‌ها و یا جفتگیری غیرتصادفی عامل انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ باشد.

Rst و Fst به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند (Balloux and Lugan, 2002). برای تفسیر Fst پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Wright, 1978). در این بررسی میزان Fst بر اساس فراوانی الی ۰/۰۲۹ به دست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (Balloux and Lugan-Moulin, 2002). بر اساس تست AMOVA میزان Fst و Rst بین دو منطقه نمونه برداری معنی دار بود ($P < 0.001$). بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از یکدیگر جداست و حداقل دو جمعیت مختلف ژنتیکی در بندر انزلی و مصب گرگانرود وجود داشته باشد. کم بودن مقدار Fst به علت پلی مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در میکروستلایت‌ها و مهاجرت در این ماهی است که به طور موثری میزان Fst را کاهش می‌دهند (Balloux and Lugan-Moulin, 2002).

ماهیان استخوانی در استان گلستان در سال بهره برداری ۱۳۸۵-۱۳۸۴. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر. سال چهارم، شماره سوم. ۳۹-۴۷ ص.
 ۳. قلیچ پور، م.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب.، ۱۳۸۹. مقایسه ساختار ژنتیکی دو جمعیت کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مناطق قره سو و انزلی با استفاده از هشت نشانگر میکروستلایت. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، شماره پنجم، سال دوم، صفحه های ۴۱-۴۸.

4. Alarcon, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M. C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Aquaculture, Vol. 230, pp. 65-80.
5. Balloux, F., Lugon-Moulin, N., 2002. The estimate of population diffraction with microsatellite markers. Molecular Ecology, Vol.11, pp.155-165.
6. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gressoff, G.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry, Vol.84, pp.680-683.
7. Bataillon, T. M., David J. L., Schoen, D. J., 1996. Neutral genetic markers and conservation: simulated germplasm collections. Genetics, Vol. 144, pp. 409-417.
8. Beardmore, J. A., Mair, G. C. Lewis, R. I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture Research, Vol.28, pp. 829- 839.
9. Chen, L., Li, Q., Yang, J., 2008. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the Sea Cucumber (*Apostichopus Japonicus selenka*) from northern China. Aquaculture Research, Vol. 39, pp.1541-1549.
10. Crooijmans, R. P. M., Bierbooms, V., Komeh, J., Vanderpoe, J. J., Groenen, M., 1997. Microsatellite markers in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Animal Genetics, Vol. 28, pp. 129-134.
11. DeWoody, J. A., Avise, J. C., 2000. Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, Vol. 56, pp. 461-473.
12. Dimsoski, P., Toth, G. P., Bagley, M. J., 2000. Microsatellite chaeacterization in (Cyprinidae). Molecular Ecology, Vol.9, pp. 2187-2189.
13. Diz, P. A., Presa, P., 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in

Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thorpe and Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei) برای جدایی جمعیت ها را به طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۳ تا ۰/۶۱) ذکر کرده اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/۳۹۹) و نشان دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت های مشاهده شده است.

نتایج این مطالعه، دلایل اولیه برای وجود جمعیت های متمایز ماهی کپور معمولی در تالاب انزلی و مصب گرگانرود را نشان می دهد. نگرانی اصلی در تکثیر مصنوعی این ماهی در حفاظت از تنوع ژنتیکی آن است. بنابراین، برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آنها ضروری است، محل های تخم ریزی طبیعی این گونه احیاء گردد، همچنین از تورهای با اندازه چشمه مناسب برای صید این ماهیان استفاده گردد تا سهم ماهیان غیر استاندارد و نابالغ به حداقل برسد.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام پذیرفت. از تمامی همکاران گرامی در آزمایشگاه ژنتیک از جمله آقایان مهندس اسکندری، سمیعی و بهروز تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. عبدلی، الف.، نادری، م.، ۱۳۷۸. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبریان، ۲۴۲ صفحه.
۲. قربانی، ر.، یلقی، س.، عقیلی، م.، ۱۳۸۹. بررسی و تحلیل وضعیت صید شرکت های تعاونی صید پره

- Oceanology and Limnology Science, Vol. 35, pp. 332-341.
23. Thai, B.T., Burrridge, C. P., Pham, T. A., Austin, C. M., 2007. Genetic diversity of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. Aquaculture, Vol. 269, pp. 174-186.
 24. Thorpe, J.P., Sole-Cava, A. M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zoologica Scripta, Vol. 23, pp. 3-18.
 25. Turner, F., T. E., Dowling, R. E., Broughton, Gold, J.R., 2004. Variable microsatellite marker amplify across divergent lineages of Cyprinidae fish. Conservation Genetic, Vol. 5, pp. 279-281.
 26. Wang J., Chenghui W., Long, Q., Yuqing, M., Xinxin, Y., Zsigmond, J., Sifa, L., 2011. Genetic characterization of 18 novel microsatellite loci in northern pike (*Esox lucius*). Genetic and Molecular Biology, Vol.34, pp.169-172.
 27. Wright, S., 1978. Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago. 590P.
 28. Yousefian, M., 2011. Genetic variations of common cap (*Cyprinus carpio*) in South-Eastern of Caspian Sea using five microsatellite loci. World Journal of Zoology. Vol.6, pp. 56-80.
 29. Yousefian, M., Laloei, F., 2011. Genetic Variations and Structure of Common Carp, (*Cyprinus carpio*) Populations by Use of Biochemical, Mitochondrial and Microsatellite Markers. Middle-East Journal of Scientific Research, Vol. 7, pp. 339-345.
 30. Zhang, Y. P., Wang, X. X., Ryder, O. A., Li, H. P., Zhang, H. M., Yong, Y., Wang P. Y., 2002. Genetic diversity and conservation in endangered animal species. Pure Applied Chemistry, Vol. 74, pp. 575-584.
 31. Zhao, N., Ai, W., Shao, Z., Zhu, B., Brosse S., Chang, J., 2005. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. Journal Applied Ichthyology, Vol. 21, pp. 7-13.
 - Galician Rias (NW Iberian estuaries). Aquaculture, Vol. 287, pp. 278-285.
 14. Hanfeling, B., Bolton, P., Harley, M., Carvalho, G., 2005. A molecular approach detects hybridization between Crucian Carp (*Crassius crassius*) and non-indigenous Carp species (*Crassius* spp. and *Cyprinus carpio*). Freshwater Biology, Vol.50, pp. 403-417.
 15. Kohlmann, K., Kersten, P., Flajshans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral Common Carp (*Cyprinus carpio*) populations. Aquaculture, Vol.247, pp. 253-266.
 16. Lior, D., Shula, B., Marcus, F., Uri, L., Jossi, H., 2003. Recent duplication of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) genome as revealed by analysis of microsatellite loci. Molecular Biology Evolution, Vol.20, pp. 1425-1434.
 17. McQuown, E., Krueger, C. C., Kincaid, H. L., Gall, G. A. B and MAY, M., 2003. Genetic comparison of Lake Sturgeon population: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci. Journal of Great Lakes Research, Vol. 29, pp. 3-13.
 18. Mondol, K.R., Islam Sh., Alam, S., 2006. Characterization of different strain of common carp (*Cyprinus carpio* L) (Cyprinidae, Cypriniformes) in Bangladesh using microsatellite DNA markers. Genetics and Molecular Biology, Vol. 29, pp. 626-633.
 19. Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, Vol.106, pp. 283-292.
 20. Peakall, R., Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, Vol. 6, pp.288-295.
 21. Shaklee, J. B., Tamaru, C. S., Waples, R. S., 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science, Vol.36, pp.141-157.
 22. Shen, X.Y., Gong, Q. L., 2004. Population genetic structure analysis of the imported Turbot Seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique.