فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال اول/ پیش‌شماره دوم / تابستان ۹۲/ صفحات۸۸-۷۹

بررسی توزیع و فراوانی هاپلوتیپهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR در کپور معمولی (*Cyprinus carprio*) سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز

محمد لاریجانی*[۱]، مهرنوش نوروزی[۲]، طیبه عنایت غلامپور[۳]، صفورا صداقت[۴]

چکیده:

کپورماهیان بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین هستند و در ناحیه مصبی و آب‌های لب شور نیز دیده می‌شوند. ماهی کپور معمولی در دریای خزر رشد و نمو کرده و به طور طبیعی به دریای سیاه و آرال مهاجرت نموده است. جمعیتهای ماهی کپور در بخش‌های جنوب شرقی، جنوب غربی و غرب دریای خزر متفاوت است. در این مطالعه به بررسی توزیع و فراوانی هاپلوتیپهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR در ژن سیتوکروم اکسیداز کپور معمولی در سه ناحیه از سواحل جنوبی دریای خزر(استان گلستان، مازندران، گیلان) در سال ۱۳۹۰پرداخته شده است. نمونه برداری در فصل صید در نوار ساحلی دریای خزر به تعداد ۱۰ عدد کپور از هر استان انتخاب واز قسمت باله دمی به اندازه سه سانتیمتر نمونه برداری شد. نمونه‌ها را وارد میکرو تیوب که محتوی الکل ۹۶ درصد می‌باشد نموده و نمونه‌ها را جهت انجام کارهای ژنتیکی به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد. در مجموع از ۲۱ هاپلوتیپ، استان گلستان و مازندران با ۸ هاپلوتیپ (۳۸.۰۹۵درصد)از هر استان از بیشترین مقدار و استان گیلان با ۵ هاپلوتیپ(۲۳.۸۰۹درصد) از کمترین مقدار هاپلوتیپ برخوردار بودند. این نتایج نشان داد که بین نمونه های کپور دریایی استان گلستان و مازندران از نظر فراوانی هاپلوتیپها هیچ گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد($p>0.05$) ولی با نمونه‌های استان گیلان از اختلاف معنی‌داری بر خوردار برخوردار بود($p<0.05$).

کلید واژه: هاپلوتیپ، PCR، *Cyprinus carpio*، دریای خزر.

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران mohamadlarijani@gmail.com

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

۳- کارشناس ارشد شیلات، دانشگاه علمی کاربردی پیگیر، واحد گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

کپورماهیان بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین هستند و در ناحیه مصبی و آب‌های لب شور نیز دیده می‌شوند. از لحاظ پراکنش طبیعی، این تیره بجز در آمریکای جنوبی، ماداگاسکار و استرالیا به حد وفور در همه جا منتشر گردیده‌اند. در این تیره ۲۰۰ جنس و ۱۶۰۰ گونه وجود دارد و در تکثیر و پرورش آبزیان نقش مهمی بازی می‌کنند. از لحاظ پرورش جزء ماهیان گرمابی بوده‌اند و در مناطق نیمه گرم و گرمسیری که دارای حرارتی بین ۲۰-۱۵الی ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد باشد پرورش می‌یابند تنها در دریای خزر ۲۰ گونه از خانواده کپور ماهیان وجود دارد مانند ماهی سفید، ماهی کلمه، ماش ماهی، سیم و... که مهمترین آن گونه کپور معمولی است که بومی دریای خزر و وحشی می‌باشد و کارهای علمی بسیاری جهت اصلاح نژاد این ماهی برای مقاوم نمودن آن در برابر بیماریها، سرما و پرگوشت شدن آن صورت گرفته است، بطوری که حتی بر روی کاهش استخوان آن از طریق به گزینی در مؤسسه ماکس بلانک آلمان کار شده است و نژادهای مختلفی از آن بوجود آمده است که کپور فلس‌دار، آینه‌ای، کپور خطی و کپور چرمی یا برهنه و کپورهای دارای بدنی کشیده یا برآمده مانند کپورگانیس یا کپور فرانک از آن جمله‌اند(Mesk *et al*., 1968).

اطلاعات ژنتیکی مولکولی به عنوان یکی از شاخص‌های وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی به کار می‌رود و برای مناطق مختلف درجهت کاربرد علمی و مدیریتی به عنوان یک ابزار منحصر به فرد و توانمند جهت ارزیابی وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی به کار می‌رود. یکی از مسائلی که تاکسونومیستها در رابطه با شناسائی و تشخیص هویت گونه‌های گیاهی و جانوری با آن همیشه مواجه بوده‌اند درستی و دقت آن است.

در این تحقیق به بررسی مقایسه تنوع هاپلوتیپی و اختلاف هاپلوتیپی برای کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بین سه استان حوزه جنوبی دریای خزرپرداخته شده است.

۲ - مواد و روش‌ها

در این بررسی در فصل صید با سرکشی به تعاونیهای صیادی مستفر در نوار ساحلی و به طور کاملاً تصادفی از هر شرکت به تعداد۲ قطعه و مجموعاً ۱۰ قطعه از هر استان انتخاب نموده و منطقه نمونه برداری شامل بندر کیاشهردر استان گیلان، منطقه تجن در استان مازندران ومنطقه گمیشان در استان گلستان بود. از قسمت باله دمی به فاصله ۳ سانتیمتر قطعه باله دمی را جدا نموده و در الکل ۹۶ درصد فیکس نموده و جهت آزمایشات ژنتیکی به پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال یافت تا کارهای مربوط به بارکدینگ انجام شود. از هر کدام نمونه باله‌ها به اندازه ۱ گرم جدا نموده و در داخل تیوب خورد نموده و مراحل استخراج DNA را طی و پس از مرحله استخراج، DNA استخراج شده

Archive of SID

www.SID.ir

را با استفاده از ژل آگاروز از نظر کمی و کیفی بررسی شده و کلیه نمونه‌ها نشان دادند که از کمیت و کیفیت خوبی بر خوردار می‌باشند و سپس مراحل PCR انجام شد و محصول PCR از نظر کمی و کیفی با استفاده از ژل آگاروز بررسی شد. پس از بررسی کمی و کیفی محصول PCR مرحله سکانس کردن یا (تعیین توالی)می‌باشد که توسط شرکت تکاپو زیست برای تعیین توالی به کشور فرانسه فرستاده شد.

۲-۱- استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی با کمیت وکیفیت مطلوب ازنیازهای اساسی زیست‌شناسی مولکولی است. به منظور استخراج DNA ازماهیان به روش استات آمونیوم و مراحل زیر یه ترتیب انجام گردید (Infante *et al*., 2006):

۱- حدود ۵۰ میلی گرم از نمونه باله ماهی کاملاً خشک گردید و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل وله شد.

۲- سپس برای هضم بافت مورد نظر بویژه پروتئین‌ها بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتراز بافر STE، ۵۰ میکرولیتر SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید.

۳- جهت فعال نمودن کامل آنزیم تیوپ حاوی نمونه به مدت ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت در شیکر قرار داده و پس از آن به مدت یک شب در بن ماری ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد، در طی این مدت نمونه به طور کامل هضم شده و بصورت امولسیونی غلیظ درآمد.

۴- پس از یک شب قرار گرفتن نمونه‌ها در بن ماری نمونه‌ها خارج شده و به هر تیوپ ۱۶۰ میکرولیتر استات آمونیوم اضافه شد و برای مدت حداقل یک ساعت با استفاده از شیکر بهم زده و بلافاصله در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۵- به آرامی۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی را توسط یک نمونه‌بردار جدا کرده و در داخل تیوپ جدیدی ریخته و برای حذف بقایای استات آمونیوم بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه نموده، لوله‌ها بوسیله دست به آرامی چندین مرتبه سر و ته شدند و در دور۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و فاز بالایی محلول دور ریخته شد

۶- جهت خارج نمودن کامل ایزوپروپانول، ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به لوله‌ها اضافه شد و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۷- پس از عمل سانتریفیوژ فاز الکل جدا شد وتیوپ ها در دمای اتاق قرار داده شد تا تمام الکل آن خشک و تبخیر شود.

۸- پس از خشک شدن برروی رسوب DNA ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطراستریل اضافه شد ودر بن

Archive of SID

www.SID.ir

ماری در دمای ۴۰ درج سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. تا DNA بطور کامل در آب حل و قطعات ناخواسته هضم گردد سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۲- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز

دستگاه الکترفورز حاوی محلول بافر الکترود(TBE 1X) بوده و تنها مسیر عبور جریان الکترکی ژل الکتروفورز می‌باشد. اساس کار الکتروفورز برپایه قرار گرفتن ذرات باردار در مسیر جریان الکتریکی باشد. DNA به دلیل دارابودن گروه‌های فسفات در ساختمان خود و همچنین اتصال SDS به این رشته ها دارای بار منفی می‌باشد، پس انتظار می‌رود که پس از قرار گرفتن نمونه‌ها درداخل ژل و برقراری جریان الکتریکی نمونه‌های DNA به سمت قطب مثبت حرکت کرده و بسته به بار الکتریکی و وزن مولکولی در قسمتهای متفاوتی از ژل نسبت به مبدا حرکت قرار می‌گیرند.

که هم زمان با جریان، جابجایی DNA که دارای بار منفی است انجام می‌گیرد که در پایان با استفاده از دستگاه ژل داکیومنشن واشعه UV وخاصیت فلوئورسانس ایجاد شده، باندهای DNA مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

۲-۲-۱- محلول‌های لازم جهت الکترفورز روی ژل آگارز

بافر TBE در غلظت‌های ۱X تهیه می‌گردد و در زمان استفاده، با آب مقطر رقیق می‌شود و از غلظت ۱۰ برابر آن استفاده می‌شود (۱۰X)می‌شود.

لودینگ بافر به دو منظور استفاده می‌شود: اول اینکه به دلیل داشتن گلیسرول، چگالی نمونه را افزایش داده تا DNA سریع‌تر به ته چاهک برود. دوم به دلیل آنکه محلول بهینه آن دارای دو رنگ بروموفنل بلو و زایلن سیانول است، میزان حرکت نمونه‌ها به سمت آند را قابل پیش‌بینی می‌کند. این بافر معمولا به صورت محلولی باغلظت ۶ برابر(۶X) ساخته می‌شود و دارای Tris-HCl ۱۰ میلی مولار(pH=۷/۶)، ۰/۰۳٪ بروموفنل بلو، ۰/۰۳٪ زایلن سیانول، ۶۰٪ گلیسرول و ۶۰EDTA میلی مولار می‌باشد. EDTA موجود در محلول به یون‌های فلزی دو ظرفیتی (Divalent) متصل ونوکلئازهای وابسته به فلزات را مهار می‌کند. مناسب‌ترین روش برای مشاهده DNA در ژل آگارز، رنگ آمیزی آن با رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید است. این رنگ حاوی گروه‌های سطحی (Planar) است که بین جفت بازهای DNA قرار گرفته وباعث می‌شود تا فلئورسانت تشدید شده‌ای را نسبت به رنگ آزاد در محلول، در زیر نور ماوراء بنفش نشان دهد.

۲-۳- واکنشPCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از یک جفت پرایمر برگرفته شده از Ivanova و همکاران

Archive of SID

www.SID.ir

(۲۰۰۷) که جهت تکثیر توالی، ژنوم میتوکندری کپور معمولی به کار برده بود، از طریق شبکه اینترنتی بدست آمد(Ivanova et al., 2007). ترادف ژنی پرایمر مورد نظر عبارتست از :پرایمرجلوبر 5′

3′ – TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA

پرایمر معکوس: 5′ 3′ – ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA′

اندازه محصول PCR ناحیه ژنوم میتوکندری ماهی کپور می‌باید حدود ۷۵۰ جفت باز می‌بود. برای انجام PCR وتکثیر قطعه ژن هدف، ۱ تا ۲ میکرولیتر DNA استخراجی(جهت کپی‌برداری)، ۵ میکرولیتر بافر PCR (محیط را برای انجام واکنش PCR آماده می‌کند)، ۱/۶ میکرولیتر $MgCl_2$ (اتصال Taq و DNA الگو) ،۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر Taq استفاده شد که درنهایت حجم آن با آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

XPCR Buffer۱۰	۱ « ۵
MgCl2(1/5-1/6mM	۱ « ۱/۶
dNTP(10mM)	۱ « ۰/۵
Primer f(10 « M)	۱ « ۲
Primer R(10 « M)	۱ « ۲
Taq DNA Polymerase (u/ml۵)	۱ « ۰/۵
DDW	۳۵.۴
DNA Template	۱ « ۲-۱
Total Volume	۱ « ۵۰

۲-۳- ۱- بهینه کردن PCR وپروفیل‌های حرارتی آن

درمرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال آغازگر بر روی نمونه‌ها بدست آمد از اینرو دستگاه در یک دامنه حرارتی ۶۵-۵۵ درجه ساتی گراد قرار داده شد. نحوه چیدن نمونه های در داخل به صورت عمودی بود چون در لاین‌های افقی حرارت یکسان بود ولی در لاین عمودی دما از بالا به پائین کاهش یافت. دمای مورد استفاده برای انجام واکنش که در دامنه حرارتی بهترین نتیجه را داد، دمای ۶۴ بود. در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده تا برای آزمایش‌های بعدی که شامل انتقال بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای سنجش کیفیت محصول PCR در

Archive of SID

www.SID.ir

دسترس باشد. پس از آزمایش فوق ، محصولات PCR به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد.

جدول ۱- برنامه‌های داده شده به دستگاه PCR

مراحل	درجه حرارت(سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	تعداد چرخه(سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳	۱
واسرشته سازی	۹۵	۰/۷۵	
الحاق	۵۷- ۵۶	۰/۷۵	۳۲
بسط	۶۴	۰/۷۵	
بسط نهایی	۶۴	۵	۱

۲-۳- ۲- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت وقطعات تکثیر شده از نظر کیفیت و مناسب بودن باند حاصله بررسی شد. محصول PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۱/۵٪ طی مراحل زیر الکترفورز گردید.

۲-۳-۳- تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR

عمل تعیین توالی خاتمه دی داکسی (ddNTP) که بوسیله Sanger ، درسال ۱۹۷۷ میلادی ابداع شد(McPherson, 1997) انجام شد. در این راستا محصولات بدست آمده از واکنش PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست به کشور فرانسه فرستاده شد. در نهایت داده‌های بدست آمده از تعیین توالی قطعه ۶۵۰ bp با استفاده از نرم افزارهای Bio Edit وMEGA4 مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز از نظر کمی و کیفی بررسی شد و کلیه نمونه‌ها نشان دادند که از کمیت و کیفیت خوبی بر خوردار می‌باشند و محصول PCR از نظر کمی وکیفی با استفاده از ژل آگاروز بررسی شد.

۳-۱- اختلاف هاپلوتیپی

در بررسی اختلاف هاپلوتیپی، نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد از میان مناطق نمونه برداری بیشترین اختلاف هاپلوتیپی در منطقه گمیشان با مقدار۱۰/۷۵۰۰۰ و کمترین اختلاف هاپلوتیپی در منطقه تجن به میزان ۲/۴۸۸۹ است. و این احتمالاً به دلیل بالا بودن جریان ژنی در این منطقه می‌باشد و گونه‌ها به دلیل بالا بودن تنوع هاپلوتیپی با انجام آمیزش اختلاف نوکلئوتیدی مختلفی ایجاد

Archive of SID

www.SID.ir

می‌کنند.

جدو ل ۲- اختلاف هاپلوتیپی(درصد) بین نمونه‌های کپور معمولی حوضه جنوبی دریای خزر در مناطق مختلف نمونه‌برداری

منا طق نمو نه برداری	کیا شهر	تجن	گمیشان
اختلا ف هاپلوتیپی (در صد)	۳/۲۰۰۰	۲/۴۸۸۸۹	۱۰/۷۵۰۰۰

۳-۲- تنوع هاپلوتیپی

مطابق جدول ۳ بیشترین میزان تنوع هاپلوتیپی در مناطق تجن-گمیشان با ۰/۱۱۷۸ و کمترین میزان تنوع هاپلوتیپی در مناطق کیاشهر-تجن با ۰/۰۰۹۹۵ و در گمیشان – کیاشهر از ۰/۰۱۹۷۸ مقدار می‌باشد. از نظر میانگین اختلاف هاپلوتیپی بیشترین میزان بین گمیشان – کیاشهر ۱۲/۱۸۷ و کمترین میزان بین مناطق کیاشهر – تجن به میزان ۶/۵۸۳ بود.

جدول ۳- مقایسه تنوع‌هاپلوتیپی و اختلاف هاپلوتیپی ماهی کپور معمولی به تفکیک مناطق نمو نه برداری

منا طق نمونه برداری	کیاشهر - تجن	تجن-گمیشان	کیاشهر-گمیشا ن
تنوع هاپلوتیپ	۰/۰۰۹۹۵	۰/۱۱۷۸	۰/۰۱۹۷۸
میانگین اختلا ف هاپلوتیپ	۶/۵۸۳	۸/۵۶۳	۱۲/۱۸۷

۴- بحث و نتیجه‌گیری

ماهی کپور معمولی یکی از گونه‌های تجاری مهم در کشور است و بیش از ۷۰ درصد صید استان گلستان را به خود اختصاص می‌دهد.

اطلاعات ژنتیکی مولکولی با استفاده از روش‌های مختلف از جمله DNA میتوکندری برای روشن‌شدن حد و مرز گونه‌ها بسیار سودمند می‌باشد. بنابراین از توان قابل ملاحظه‌ای جهت حل دشواریهای رده بندی کپور معمولی بر خوردار است(Zhou et al., 2003 ,Avise, 1986).

در مطالعات دیگری جمعیت‌های کپور معمولی اروپا . آسیای مرکزی و آسیای شرقی و جنوب شرقی با استفاده از روش میکروساتلیت‌ها و mtDNA مورد بررسی قرار گرفت(Kolman *et al.*, 1996).

Ludanny و همکاران در سال ۲۰۰۶ تنوع ژنتیکی و اختلافا ت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را در ۸۷ نمونه ماهی در مناطق Leningrad oblast و Krasnoder krai و Altai krai و Amur oblast و stavopol را با روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند. آنان با استفاده از ۴

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمر تنوع ژنتیکی را در ۱۲ جمعیت کپور معمولی به دست آوردند (Zhou *et al.*, 2003). بالاترین تنوع پلی مورفیسم مربوط به کپور Angelinskii و کپور Astai و کپور وحشی آمور بود. ضمن اینکه پایین‌ترین تنوع مربوط به کپور(Ropsha) بوده است. مطالعات متعدد دیگری در خصوص تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی در مناطق مختلف انجام شده است که نتایج تقریباً مشابهی به دست آمده است(Lupica and Turner Jr, 2010 ,Zhou *et al.*, 2003). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که کپور اروپایی منشاء آسیایی داشته است(Hebert *et al.*, 2003). توضیح دیگر در مورد عدم تنوع در کپور اروپایی اینست که کپور صید شده از آبگیرهای دانوب در حقیقت نسل فراری یا کپور بومی ذخیره شده‌ای است که تنوع DNA میتوکندری آنها در نتیجه تکثیر مصنوعی در مزارع پرورشی کاهش یافته است(Kolman *et al.*, 1996). با استفاده از نرخ کالیبراسیون متاسیون mtDNA کپور می‌توان گفت که فاصله تکاملی بین گروههای هاپلوتیپ کپور اروپایی– آسیای مرکزی و آسیای شرقی (۰/۳۷۶درصد در داده های انتشار یافته) حدود ۵۰۰۰۰۰ سا ل می‌باشد. مقایسه نتایج حاصل از مطالعه حاضر با سایر تحقیقا ت در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴- مقایسه نتایج حاصل از تحقیق ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی

ردیف	ژن	منطقه نمونه برداری	تنوع هاپلوتیپ
۱	ND-3/4,ND5/6	رودخانه‌های دانوب.راین.آمور	۰/۴۹۸_۰/۰۰۰
۳	D-Loop,mtAT pase8/mtAT Pase6	چین–هند–ژاپن–ویتنا م–مجارستا ن	۰/۸۰–۰/۰۰۰
۴	ND-3/4,ND-5/6	حوضه جنوبی دریای خزرورودخانه تجن گرگان رود .تالاب گمیشان وخلیج گرگان	۰/۶۹۰_۰/۰۰۰
۵	ND-3/4,ND-5/6	حوضه جنوبی دریای خزر و رودخانه تجن. گرگان رود خلیج گرگان وتالاب انزلی	۰/۵۸۷۳و۰/۴۸۲۵
۶	COI	کیاشهر–تجن	۰/۰۰۹۹۵
۷	COI	تجن–گمیشان	۰/۱۱۷۸
۸	COI	کیاشهر–گمیشا ن	۰/۰۱۹۷۸

۴-۱- مقایسه نتایج حاصل از تحقیق ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی

همانگونه که داده‌های جدول ۴ نشان می‌دهد نتایج حاصل از این بررسی توسط ژن COI تقریباً مشابه سایر تحقیقات می‌باشد. منتها هاپلوتیپ در مقایسه با سایر تحقیقات بیشتر می‌باشد. البته چون نمونه برداریها در زمانها وتوسط دوژن مختلف ومحلهای جغرافیائی متفاوتی انجام شده و در همه بررسیها روشها یکسان نبوده لذا نمی‌توان داده‌ها را به طور دقیق با هم مقایسه نمود . بالا بودن تنوع

Archive of SID

www.SID.ir

ژنتیکی به دلیل بالابودن جریان ژنی در آنهاست و در مجموع مقایسه الگوی هاپلوتیپی در مناطق مختلف بیانگر این است که توزیع نمونه‌ها در نواحی مختلف تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیکی و اکولوژیک می‌باشد که احتمالا تنوع نژادی در جمعیتهای گوناگون را تحت تأثیر قرار داده و نژادهای حساس به تغییرات اکوسیستم از بین رفته‌اند. مطالعا ت و آنالیزهای ژنتیکی نشان داده که در برخی موارد میان جمعیت‌هایی که از لحاظ خصوصیات ظاهری. تولید مثلی و زیستگاهی مجزا هستند فاصله تکاملی اندکی وجود دارد. این امر احتمالاً مبین این مطلب است که ایجاد فاصله تکاملی بسیار اندک برای تمایز هاپلوتیپها از یکدیگر کفایت می‌نماید یا احتمالاً این روش برای بررسی فاصله تکاملی میان این جمعیت چندان مناسب نبوده است. از سوی دیگر گاهی اوقات ملاحظه می‌گردد فاصله تکاملی میان هاپلوتیپها قابل توجه می‌باشد که احتمالا بیانگر پویایی جمعیت بوده و نشان می‌دهد جمعیت مورد مطالعه در حال تغییر و تبدیل می‌باشد ولی هنوز به یکنواختی و ثبا ت ژنتیکی نرسیده است (Zhou *et al.*, 2003). بالابودن تنوع هاپلوتیپ در نمونه‌های گمیشان به دلیل تبادل ژنی وداشتن جریان ژنی در سطح آبهای خزر به خصوص تالاب گمیشان می‌باشد و جریان ژنی و آمیزش آنها با یکدیگر باعث تنوع هاپلوتیپ می‌شود. در تحقیق حاضر، میان مناطق نمونه برداری بیشترین درصد اختلاف هاپلوتیپی در نمونه‌های منطقه گمیشان با مقدار۱۰/۷۵۰۰۰و کمترین درصد اختلاف هاپلوتیپی در نمونه‌های منطقه تجن با ۲/۴۸۸۸۹دیده شد. مقدار و درصد اختلاف هاپلوتیپی در نمونه‌های کیاشهر ۳/۲۰۰۰ بود و مطابق با مطالعات(لالوئی وهمکاران، ۱۳۸۵؛ قلیچ‌پور و همکاران، ۱۳۸۹) بالابودن اختلاف هاپلوتیپی به دلیل بالابودن جریان ژن در این مناطق می‌باشد و گونه‌ها به دلیل بالابودن تنوع هاپلوتیپی باانجام آمیزش اختلافات هاپلوتیپی مختلفی ایجاد می‌کنند. بیشترین میزان تنوع هاپلوتیپی بین مناطق تجن-گمیشان با۰/۱۱۷۸ و کمترین میزان تنوع هاپلوتیپی بین مناطق کیاشهر-تجن با ۰/۰۰۹۹۵ و بین مناطق گمیشان – کیاشهر ۰/۰۱۹۷۸ می‌باشد. از نظر میانگین اختلاف هاپلوتیپی بیشترین میزان بین مناطق گمیشان– کیاشهر ۱۲/۱۸۷ و کمترین میزان بین مناطق کیاشهر- تجن می‌باشد و بیشترین اختلاف هاپلوتیپی بین مناطق گمیشان-کیاشهرمی‌باشد. بالابودن اختلاف هاپلوتیپی مطابق با مطالعات لالوئی و همکاران(۱۳۸۵) و قلیچ‌پور و همکاران (۱۳۸۹) از یک طرف به دلیل بالا بودن جریان ژنی و از طرف دیگر به دلیل این است که زیستگاه اصلی گونه کپور در سواحل شرق استان گلستان می‌باشد که از بیشترین میزان صید برخوردار می‌باشد بنابراین تبادل جریان ژنی و آمیزش در این مناطق زیاد می‌باشد و این امر باعث تنوع و اختلافات هاپلوتیپی زیادی می‌گردد. با توجه به موارد فوق و وجود تفاوت ژنتیکی معنی‌دار بین نمونه‌های مورد بررسی به طور کلی ۳ گروه از ماهیان کپور معمولی شناسایی گردیدند. بهتر است که این تحقیق به صورت گسترده‌ای با جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر و با سایر روش‌های مولکولی انجام شود تا بتوان بر اساس نتایج به دست آمده و شناسایی جمعیتهای احتمالی بیشتر مدیریت اصولی را

Archive of SID

www.SID.ir

برای ذخایر این ماهیان اعمال نمود. علاوه بر این نیاز است رفتارهای تولید مثلی، تغذیه‌ای ومهاجرتی این جمعیتها مورد مطالعه و تحقیق قرار گیرد.

منابع

۱. قلیچ‌پور م.، شعبانی ع.، شعبان‌پور ب.، ۱۳۸۹. اکسونومی و بیوسیستماتیک(مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان)زمستان; ۲(۵):۳۹-۴۸. مقایسه ساختار ژنتیکی دو جمعیت کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مناطق قره‌سو و انزلی با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک (مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان؛ صص ۲(۵):۳۹-۴۸.

۲. لالویی ف.، رضوانی گیل کلایی س.، فاطمی م.، تقوی م. ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده ازPCR-RFLP) (mtDNA. مجله علمی شیلات ایران . فارسی; ص ۱۷(۲).

3- **Avise, J.1986.** Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312**,** 325–342.

4- **Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & Dewaard, J. R. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270**,** 313-321.

5- **Infante, C., Crespo, A., Zuasti, E., Ponce, M., Pérez, L., Funes, V., Catanese, G. & Manchado, M. 2006.** PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel Scomber scombrus in commercial canned products. *Food Research International*, 39**,** 1023-1028.

6. **Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. 2007**. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7**,** 544-548.

7. **Kolman, C. J., Sambuughin, N. & Bermingham, E. 1996.** Mitochondrial DNA Analysis of Mongolian Populations and Implications for the Origin of New World Founders *Genetics Society of America*, 142**,** 1321-1334.

8. **Ludanny, R. I., Chrisanfova, G. G., Prizenko, V. K., Bogeruk, A. K. &**

9. **Lupica, S. J. & Turner Jr, J. W. 2010.** Noninvasive assessment of nitrate-induced stress in koi Cyprinus carpio L. by faecal cortisol measurement. *Aquaculture Research*, 41**,** 1622-1629.

10. **Mcpherson, J. D. 1997.** Sequence ready—or not? *Genome Res.*, 7**,** 1111–

11. **Mesk, C., Woynärovichs, E., Kauschs Barbara Lühr, H. U. & Szablewski, W. 1968.** Hypophyseal Injections for Aquarium Carp and Artificial Spawning as a Method for Breeding new Races of Car. *Theoretical and Applied Genetics*, 38**,** 47—51.

Archive of SID

www.SID.ir