Archive of SID

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان‌های گیلان ومازندران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

- **بیژن اندرز***: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **ابوالقاسم کمالی**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مهران آوخ‌کیسمی**: گروه شیلات و آبزیان، واحد بهدان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران، رشت، ایران
- **هومن رجبی‌اسلامی**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

در ایـران تامیـن بچـه‌ماهـی کپور معمولی از طریق تکثیر مصنوعی صورت می گیرد که می‌تواند تنوع ژنتیکی این ماهی را دستخوش تغییراتی کند. هدف از این تحقیق، بررسی ساختار ژنتیکی مولدین ماهی کپورمعمولی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره بود. بدین‌منظور تعداد ۶۰ نمونه ماهی مولد کپورمعمولی از مناطق گیـلان و مازنـدران (۳۰ نمونه از هر منطقـه) جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌ها به‌روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۱۱جایگاه ژنی ریزماهواره‌ای بررسی شد. طبق نتایج حاصل محدوده تعداد آلل، متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به‌ترتیب ۱۸-۱۱ ، ۰/۳۷ و ۰/۸۶ به‌دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۳ درصد) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد و شاخص‌های تمایز Fst و Rst تفاوت معنی‌داری بین مناطق گیلان و مازندران نشان دادند. میزان شاخص Fst ۰/۰۱۳ به‌دست آمد که نشان‌دهنده وجود تمایز ژنتیکی پایین بین مناطق گیلان و مازندران بود که علت آن را می‌توان جابجایی ماهیان مولد توسط پرورش دهندگان عنوان کرد. تمامی جایگاه‌های مورد بررسی، انحراف معنی‌داری (P≤۰/۰۰۵) از تعادل هاردی -واینبرگ نشان دادند که علت عمده آن را می‌توان به افزایش هتروزیگوسیتی نسبت داد. میزان شاخص تمایز و جریان ژنی بر اساس فراوانی آللی به‌ترتیب ۰/۰۱۷۲ و ۲/۱۱ محاسبه گردید. هم‌چنین نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام بیانگر تمایز ژنتیکی دو جمعیت مورد بررسی است. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان بیان داشت که جمعیت‌های مورد بررسی از غنای آللی و تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردارند.

کلمات کلیدی: ماهی کپور معمولی، گیلان، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، مازندران، تعادل هاردی- واینبرگ

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: b_andarz2003@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ماهیان قادر است سطوح بالایی از پلی‌مورفیسم را نشان دهد که متأثر از شاخص‌های محیطی نیز نیست. یکی از نشانگرهای مولکولی نشانگرهای ریزماهواره هستند (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵). طبیعت چندآللی ریزماهواره‌ها توارث هم بارز پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث‌پذیری موجب شده که ریزماهواره‌ها کاربرد وسیعی در زمینه‌های مختلف علمی داشته باشند (Chen و همکاران، ۲۰۰۸). پراکنش و فراوانی جمعیت بسیاری از گونه‌ها در طول قرن گذشته به‌شدت تحت تأثیر فعالیت‌های انسانی قرارداشته‌است (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵). تکثیر مصنوعی و جابجایی مولدین به محل‌های دیگر باعث پراکنش افراد و تنوع ژنتیکی در یک جمعیت و حتی گاهی افزایش تکثیر مصنوعی می‌تواند موجب یکسان سازی ساختار ژنتیکی جمعیت شود. کپورماهیان یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش یافته‌اند (Kirpichnikov، ۱۹۷۲) ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) از خانواده Cyprinidae بومی آسیای مرکزی است که طی قرن‌های متمادی در نواحی مختلف جهان گسترش پیدا کرده است (Kohlmann، ۲۰۰۳). ماهی کپو معمولی از گونه‌های اقتصادی دریای خزر است و به‌عنوان گونه قالب در کشت توأم ماهیان گرمابی محسوب می‌شود. هرچند این گونه به‌صورت بومی و طبیعی در تمام سواحل دریای خزر وجود دارد و برای تولیدمثل وارد مصب رودخانه‌ها می‌شود، اما در سال‌های اخیر به‌علت صید بیش از حد و از بین رفتن محل‌های تولیدمثل، نسل آن کاهش پیداکرده، به‌طوری‌که جزو گونه‌های نیازمند به حفاظت در منطقه به‌شمار می‌رود (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). در عین‌حال ماهی کپورمعمولی یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی به‌حساب می‌آید. لیکن مولدین پرورشی کشور وارداتی بودند که اخیراً با گونه‌های بومی اختلاط نژادی پیدا کرده و لذا در حال حاضر مولدین پرورشی کشور شاخص‌های تولیدمثلی یکسانی برخوردار نبوده و پیدا کردن مولدین با کیفیت‌تر و حفاظت از اختلاط آن‌ها با گونه‌های وحشی می‌تواند برای صنعت تکثیر و پرورش این گونه مفید باشد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۳). هم اکنون حفاظت و بازسازی ذخایر ماهی کپورمعمولی وحشی در ایران از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان تولیدی در آب‌های طبیعی صورت می‌پذیرد اما حفاظت از گونه‌های پرورشی وارداتی با شاخص‌های کیفی پرورشی مدنظر قرار ندارد و از آن‌جاکه در طبیعت این دوگروه با هم در تماسند اختلاط نژادی این دوگونه گرچه منجر به تغییر آللی و تنوع ژنتیکی هردو گونه می‌شود اما برای مولدین پرورشی که در شاخص‌های کیفی پرورش خلوص بیش‌تری دارند چندان مناسب به‌نظر نمی‌رسد (Chen و همکاران، ۲۰۰۸). از طرف‌دیگر بررسی انجام شده‌توسط Blanchet و همکاران (۲۰۰۸) بر روی آزاد ماهی اقیانوس اطلس نشان داد که با وجود فواید بالقوه در این شیوه تکثیر، تغییرات مورفولوژیک و ژنتیکی بارزی در میان نمونه‌های تکثیر مصنوعی و وحشی دیده می‌شود و این روش در طولانی‌مدت می‌تواند به کاهش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ذخایر ژنی بومی منجر نیز گردد (Machado و همکاران، ۲۰۰۷). تنوع ژنتیکی منابع دریایی اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از آن‌ها داشته، به‌عنوان اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی درحال تغییر محسوب می‌گردد (Diz و Persa، ۲۰۰۹). لذا اطلاعات دربارهٔ 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 و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، با توجه به این‌که اثر روش‌های تکثیر مصنوعی بر ذخایر ژنتیکی آبزیان اثبات شده و هم اکنون نیز بخشی از ذخایر این گونه از تکثیر مصنوعی حاصل می‌گردد، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه بسیارضروری است. بدین‌منظور نشانگرهای مختلفی در بررسی‌های ژنتیک جمعیت استفاده می‌شوند، اما در میان این نشانگرها، نشانگرهای ریزماهواره به‌علت فراوانی و گستردگی بالا در ژنوم، هم‌بارز بودن، توارث مندلی، کوچک بودن اندازه جایگاه ژنی و در نتیجه، سهولت تعیین ژنوتیپ از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هم‌چنین پلی‌مورفیسم بالاکاربردگسترده تری دارند(Chen و همکاران، ۲۰۰۸). ریزماهواره‌ها به‌علت بالا بودن تعداد آلل‌هایشان در میان تمام نشانگرها بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند(Liu، ۲۰۰۵). این پلی‌مورفیسم بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (Dunham، ۲۰۰۴). علی‌رغم اهمیت اقتصادی ماهی کپورمعمولی و هم‌چنین اهمیت آن در بحث بازسازی ذخایر و انتخاب مولدین، اطلاعات گسترده‌ای در زمینه ساختار جمعیتی این گونه در مناطق مختلف موجود نیست. اطلاعات موجود، محدود به بررسی صورت گرفته توسط لالوئی و همکاران (۱۳۸۷) روی ژنتیک جمعیت ماهی کپورمعمولی و وحشی در برخی از نواحی حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش (PCR-RFLP) mtDNA است. هم‌چنین در تحقیق قلیچ‌پور و همکاران (۱۳۸۹) از نشانگرهای ریزماهواره برای ارزیابی ساختار جمعیتی وحشی این گونه در مناطق گیلان و مازندران استفاده نمودند و جهت ارزیابی ساختار جمعیتی کپور ماهیان پرورشی تنها سلیمانی و همکاران (۱۳۹۳) از این نشانگرها جهت ارزیابی ساختار جمعیتی کپورماهیان پرورشی استان خوزستان، استفاده نمودند. در این تحقیق از نشانگر ریزماهواره برای ارزیابی ساختار جمعیتی مولدین کپور ماهیان پرورشی

www.SID.ir

Archive of SID

گیلان و مازندران و مقایسه آن‌ها در استان‌های گیلان و مازندران استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA: نمونه‌گیری از ۶۰ نمونه ماهی مولد ماده کپورمعمولی از گیلان و مازندران، از هر منطقه ۳۰ نمونه از قسمت باله دمی صورت گرفت. هریک از نمونه‌ها جداگانه درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۶ درصد قرار گرفت و برای نگه‌داری نمونه‌ها تا شروع مرحله استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از روش فنل- کلروفرم، انجام پذیرفت (Hillis و همکاران، ۱۹۹۶) DNAهای استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش‌های مربوط در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کیفیت و کمیت DNAهای استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد (Sambrook، ۱۹۸۹).

آنالیز مولکولی: برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی از ۱۱ جفت نشانگر ریزماهواره استفاده گردید، نشانگرهای مورد استفاده برای این آزمایش از ۱۱ جایگاه ژنی ریزماهواره MFW2، MFW7، MFW13، MFW16، MFW17، MFW20، CypG24، MFW26، Syp4، HLJ809، LOC5 (Grooijmansو همکاران، ۱۹۹۷؛ Baerwald و May، ۲۰۰۴) مطالعات انتشار یافته انتخاب شدند (جدول ۱). واکنش‌های زنجیری پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر DNA، ۱۰۰ نانوگرم HotStarTaq™ DNA polymerase، ۰/۳ واحد PCR بافر ۱x، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به‌حجم مورد نظر در PH ۷/۸ برای هر یک از آغازگرها انجام گرفت و بهترین دمای الحاق برای هریک از آن‌ها به‌دست آمد. شرایط سیکل‌دمایی و مشخصات داده‌شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در جدول ۲ آورده شده است. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز و جداسازی و ژل‌ها به‌روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Bassam و همکاران، ۱۹۹۱) پس از تهیه تصویر ژل‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل، (Gel Doc XR, BIO-RAD)، از نرم‌افزار Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده شد.

جدول ۱: توالی و ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز ریزماهواره ماهی کپور معمولی

جایگاه ژنی	تعداد آلل	اندازه آلل	توالی	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
MFW2	۲۲	۲۰۰-۲۸۸	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	MFW2
MFW7	۲۲	۱۶۰-۲۷۲	F: TACTTTGCTCAGGACGGATGC R: ATCACCTGCACATGGCCACTC	MFW7
MFW13	۱۷	۱۸۸-۲۷۲	F: ATGATGAGAACATTGTTTACAG R: TGAGAGAACAATGTGGATGAC	MFW13
MFW16	۱۸	۱۲۸-۲۰۴	F: GTCCATTGTGTCAAGATAGAG R: TCTTCATTTCAGGCTGCAAAG	MFW16
MFW17	۲۵	۲۰۸-۳۱۶	F: CTCAACTACAGAGAAATTTCA R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	MFW17
MFW20	۱۹	۲۰۸-۳۰۴	F: CAGTGAGACGATTACCTTGG R: GTGAGCAGCCCACATTGAAC	MFW20
MFW26	۱۶	۱۰۸-۱۷۴	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGGATGCAAAAG	MFW26
CypG24	۱۴	۱۶۸-۱۱۲	F: CTGCCGCATCAGAGATAAACACT R: TGGCGGTAAGGGTAGACCAC	CypG24
Syp4	۱۳	۲۷۴-۱۹۶	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	Syp4
HLJ809	۱۲	۲۷۴-۱۶۹	F: ATCATCACAGCCAAAGAAGT R: TACGGACATAGTGCAGACAA	HLJ809
LOC5	۱۴	۱۶۸-۱۰۱	F-TTACACAGCCAAGACTATGT R-CAAGTGATTTTGCTTACTGC	LOC5

آنالیز آماری: پس از رتبه‌دهی به آلل‌ها ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل‌های موثر (N_e) و فراوانی آللی در هر جایگاه ژنی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o)، ضریب درون‌آمیزی (FIS) درون جمعیت و ضریب درون‌آمیزی کل (FIT)، تعادل هاردی واینبرگ بر اساس χ^2، تست تمایز بر اساس فراوانی آللی، فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۸) با نرم‌افزار GeneAlex محاسبه گردید (Peakall و Smouse، ۲۰۰۶). هم‌چنین مقادیر شاخص تمایز Rst و Fst براساس تست AMOVA در سطح اطمینان ۹۹ درصد و غنی‌سازی آللی (A_R) با استفاده از نرم‌افزار (Excoffier و Schneider Arlequin، ۲۰۰۵) با استفاده از ۱۰۰۰۰ شبیه‌سازی در

www.SID.ir

Archive of SID

هرموردنیزمحاسبه گردید(Zar، ۱۹۹۹). برای تنظیم سطح معنی‌داری آزمون‌های تکرارشونده نیز ضریب تصحیح بونفرونی استفاده شد (Rice، ۱۹۸۹). مقادیر فاصله (D) و شباهت ژنتیکی Nei (I) (۱۹۷۸) و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA نیز با استفاده از نرم‌افزار (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) Pop Gen صورت گرفت.

جدول ۲: چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
۱ چرخه	واسرشت	۵ دقیقه	۹۴
۵ چرخه	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
	اتصال	۳۰ ثانیه	۵ درجه بالاتر از دمای اتصال
	تکثیر	۳۰ ثانیه	۷۲
۳۲ چرخه	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
	اتصال	۳۰ ثانیه	دمای مشخص شده (۶۴-۵۶)
	تکثیر	۳۰ ثانیه	۷۲
۱ چرخه	تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

نتایج

در مجموع ۱۱ جایگاه ژنی در این تحقیق استفاده شد که در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شدند و منومورفی و پلی‌مورفی از خودنشان‌دادند.باتوجه به غلظت DNA به‌دست آمده ۱۵۹-۸۰ نانوگرم نتایج الکتروفورز ژل از کیفیت مناسبی برخوردار بود. در جایگاه ژنی LOC5 مولدین گیلان مونومورف و در جایگاه‌های دیگر نمونه‌های گیلان و مازندران پلی‌مورف بودند. تعداد آلل‌های مربوط به تمامی جایگاه‌های پلی‌مورف در جدول ۱ نشان داده شده است. متوسط تعداد آلل‌ها در مناطق گیلان و مازندران به‌ترتیب ۱۱ و ۱۸ به‌دست آمد. هم‌چنین، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آلل‌ها به‌ترتیب در جایگاه‌های LOC5(۲ آلل)در جمعیت مرکز گیلان و MFW2(۲۲ آلل)در جمعیت مرکز مازندران مشاهده شد. حداکثر فراوانی آللی درمنطقه‌مازندران ۰/۷۱ و حداقل آن ۰/۰۱۱ در گیلان بود. هم‌چنین میانگین فراوانی آلل‌ها در گیلان ۱۱±۰/۱و درمازندران ۱۸±۰/۳بود تعدادآلل‌های واقعی و آلل‌های مؤثر در گیلان ۴ و ۱/۷۵ و در منطقه مازندران ۱۴ و ۱۲/۲۳ بود در همه مناطق نمونه‌برداری و در همه جایگاه‌ها مقدار N_e از N_a کم‌تر بود. دامنه ناخالصی مشاهده شده در جایگاه‌های یازده‌گانه بین ۰/۰۹ تا ۰/۴۲ بود بیش‌ترین مقدار ناخاصی مشاهده شده در منطقه مازندران و کم‌ترین مقدار در نمونه منطقه گیلان بود. آلل‌های موثر نیز در محدوده ۱/۳۵-۱۳/۳۳ به‌دست آمد که در این میان پایین‌ترین میزان در جایگاه MFW17 (۱/۷۵) و بالاترین آن در جایگاه MFW20 (۱۴/۳۳) قرار داشت. در سطح مناطق مورد بررسی، تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر و هم‌چنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی

جایگاه ژنی		MFW2	MFW7	Syp4	MFW13	MFW16	HLJ809	MFW17	MFW20	LOC_5	MFW26	GyPG24
منطقه	پارامتر											
مازندران	N_a	۱۴	۱۰	۱۲	۱۳	۱۳	۱۷	۲۰	۱۶	۱۳	۱۲	۱۳
	N_e	۱۲/۲۳	۸/۰۷	۹/۲۱	۹/۲۶	۱۱/۱۷	۱۱/۱۵	۱۱/۲۲	۱۲/۳۳	۱۱/۲۲	۱۱/۰۸	۶/۱۱
	H_o	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶
	H_e	۰/۷۲	۰/۶۶	۰/۶۳	۰/۶۵	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۶۹	۰/۷۲	۰/۶۹	۰/۶۹	۰/۶۵
گیلان	N_a	۱۱	۱۴	۱۱	۱۴	۱۱	۱۳	۱۲	۱۳	۱۲	۱۱	۷
	N_e	۱۰/۲۱	۱۰/۲۲	۱۰/۲۶	۹/۱۶	۵/۲۲	۸/۶۳	۷/۱	۱۱/۲۱	۷/۲۳	۷/۲۳	۶/۲۴
	H_o	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶
	H_e	۰/۳۹	۰/۳۳	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۲۸	۰/۳۳	۰/۲۷	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۳۴	۰/۳۸

N_a: تعداد آلل های مشاهده شده: N_e تعداد آلل های مؤثر: H_o هتروزیگوسیتی مشاهده شده: H_e هتروزیگوسیتی مورد انتظار

دامنه هتروزیگوسیتی‌مشاهده‌شده بین دو منطقه‌درجایگاه‌های یازده‌گانه ۰/۸۶ -۰ بود میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) ۰/۸۶ به‌دست آمد. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) نیز ۰/۳۷ به‌دست آمدکه بالاترین(۰/۵۵)و پایین‌ترین(۰/۳۷) میزان آن به‌ترتیب درجایگاه‌های MFW۲۰ (منطقه مازندران) وMFW17 (منطقه گیلان) مشاهده شد. هم‌چنین از نظر تعداد آلل‌ها و میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۰۵$). انحراف از تعادل هاردی واینبرگ برای تمام ترکیبات لکوس جمعیت محاسبه شد. انحراف از تعادل‌بالایی در اکثرجایگاه‌های ژنی مشاهده شد، هرچندپس از ضریب

www.SID.ir

Archive of SID

تصحیح بونفرونی، ۲ جمعیت در ۱۱ جایگاه ژنی تنها در چهارآزمون در تعادل بودند. متوسط شاخص درون آمیزی (FIS) ۰/۱۷- به‌دست آمد ، متوسط میزان FST بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی براساس فراوانی آلل‌ها ۰/۰۱۸ به‌دست آمد. در سطح جایگاه‌های ژنی نیز میزان تمایز (FST) محاسبه شد (جدول ۴)، کم‌ترین میزان تمایز مشاهده شده (۰/۰۰۶) MFW20 و بیش‌ترین میزان آن (۰/۰۴۶) در جایگاه ژنی MFW17 به‌دست آمد. هم‌چنین، جریان ژنی بالایی (میانگین ۱۵/۲۳) در سطح جایگاه ژنی مشاهده گردید.

جدول ۴: میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز FST) در سطح ده جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	MFW2	MFW7	Syp4	MFW13	MFW16	HLJ809	MFW17	MFW20	LOC5	MFW26	GyPG24
Nm	۲۲/۱۷	۱۵/۱۱		۱۶/۴۳	۱۷/۳۷	۱۷/۱۶	۷/۱۲	۲۹/۱۴	۱۷/۱۱	۲۶/۶۳	۱۰/۱۵
F_{ST}	۰/۰۱۸	۰/۰۱۵	۰/۰۲۵	۰/۰۱۱	۰/۰۱۶	۰/۰۱۷	۰/۰۴۶	۰/۰۰۶	۰/۰۱۷	۰/۰۱۵	۰/۰۲۷

با توجه به نتایج آنالیز واریانس مولکولی نتایج FST حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹٪ نشان‌داد که تنوع ژنتیکی پایینی ۳۷٪ درون جمعیت‌های گیلان و تنوع بالایی ۶۸٪ بین جمعیت‌های مازندران وجود دارد. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز به‌ترتیب ۳۷٪ و ۶۸٪ به‌دست آمد. دندروگرام UPGMA براساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند.

جدول ۵: ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی (عدد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی است)

منطقه	مازندران	گیلان
مازندران		۰/۶۳
گیلان	۰/۳۷	

بحث

در این تحقیق به‌منظوربررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گونه‌های پرورشی گیلان و مازندران از نشانگرهای ژنتیکی ریزماهواره‌ها استفاده شد که ریزماهواره‌ها به‌صورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu و همکاران، ۲۰۰۹). نشانگرهای ژنتیکی مختلفی برای بررسی ساختار جمعیت وجود دارد اما در بین آن‌ها ریزماهواره‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی برخوردار باشند استفاده نمود (Cui و همکاران، ۲۰۰۵).

هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌ها جزو پارامترهای مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از لحاظ رو به رو شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankharn، ۲۰۰۸). و ویژگی‌هایی هم‌چون قابلیت رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیست‌گاه‌های طبیعی را تعیین می‌سازد اما در مقابل برای مولدین پرورشی که در طول سالیان به گزینی شده است تنوع ژنتیکی مورد نظر است Hakansson and Jensen (۲۰۰۵).

دربررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای آللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. در واقع بالا بودن غنای آللی نشان‌دهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت و استفاده از غنای آللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های به گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (Diz و Persa، ۲۰۰۹) در این بررسی، میانگین مقادیر به‌دست‌آمده برای تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار پایین‌تر از مقادیر گزارش شده توسط Crooijmans و همکاران (۱۹۹۷) برای کپورمعمولی در اروپا با استفاده از پرایمرهای مشابه و پایین‌تر از مقادیر به‌دست آمده توسط سلیمانی و همکاران (۱۳۹۳)، لالویی و همکاران (۱۳۹۴) و قلیچ‌پور و همکاران (۱۳۸۹) بود. این اختلاف ممکن است در نتیجه تفاوت در نوع (پرورشی و وحشی) و تعداد نمونه‌های استفاده شده باشد که در این تحقیق از نمونه‌های پرورشی استفاده گردید. البته تفاوت در تعداد آلل و عوامل متعددی به تعداد نمونه، تعداد جایگاه‌های مورد بررسی و دقت در اندازه‌گیری باند و غیره نیز دارد، هم‌چنین ممکن است علت این امر درون‌آمیزی بالا در جمعیت مولدین پرورشی که منجر به از دست رفتن تعداد آلل‌ها می‌گردد باز گردد. به‌طورکلی تعداد کم آلل نشانه‌ای از تنگناهای ژنتیک است که ممکن است ناشی از کاهش شدید آلل مؤثر ایجاد شود (H_a و همکاران، ۲۰۰۹) اما می‌تواند حاکی از تنوع ژنتیکی بالاتر در جمعیت‌های کپورمعمولی وحشی با مولدین پرورشی در مناطق مورد بررسی باشد. هم‌چنین آن‌ها بیان کردند که تعداد آلل و هتروزیگوسیتی می‌تواند تحت تأثیر تعداد نمونه و منطقه هدف باشد. از طرف دیگر در مجموع، تفاوت معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) از لحاظ تعداد آلل وهتروزیگوسیتی بین مناطق گیلان و مازندران موردبررسی مشاهده شد. این احتمال وجود دارد کاهش هترویگوسیتی در مولدین پرورش نسبت به مولدین وحشی تحقیقات مذکور در بالا به این علت باشد که

www.SID.ir

Archive of SID

کپورماهیان پرورشی در گیلان ضریب درون‌آمیزی بالاتری نسبت به کپورماهیان پرورشی مازندران دارند و در مازندران ضریب‌درون‌آمیزی بالاتربودو این می‌تواند ناشی از اختلاط از مولدین وحشی و پرورشی باشد.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، در ۱۱جایگاه ژنی (جایگاه ژنی×منطقه)پس‌از اعمال‌ضریب تصحیح بونفرونی انحراف معنی‌داری (P<۰/۰۰۵) از تعادل نشان‌دادند. باتوجه‌به نتایج حاصل در این تحقیق، می‌توان اذعان نمود که اغلب جایگاه‌های ژنی انحراف از تعادل هاردی واینبرگ را نشان می‌دهند که در اکثر موارد، این انحراف می‌تواند به‌علت افزایش هتروزیگوسیتی ناشی از اختلاط ماهیان مولد وحشی و پرورشی در مناطق مورد بررسی باشد است اما شاید علت در این امر برای‌پایین‌بودن‌تعداد الل و هتروزیگوسیتی گیلان نسبت به مازندران شاید ناشی از وجود آلل‌های خنثی در این مولدین خویشاوند باشد گرچه شاید علتی برای این کاهش هتروزیگوسیتی گیلان اشتباه در خواندن آلل و انحراف تصادفی هم باشد (قدسی و همکاران ۱۳۹۰). در واقع مقایسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در میان جمعیت‌هاو تمام‌جایگاه‌های ژنی مورد بررسی در این تحقیق، مشاهده می‌شود که هنوز میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظاردر نمونه‌های گیلان نیز بیش‌تر بوده، که این همان افزایش هتروزیگوسیتی است (Liu و همکاران، ۲۰۰۵).

سدهای محیطی، فرآیندهای تاریخی و پیشینهٔ زندگی، همانند روش جفت‌گیری از عواملی هستند که هر کدام تا حدودی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را شکل می‌دهند (Tiedemann و همکاران، ۲۰۰۰) آنالیز واریانس مولکولی به‌عنوان یک آنالیز آماری، وسیله مناسبی برای مشخص‌کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Grassi و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۸۹ درصد تنوع در بین جمعیت‌ها و تنها ۱۱ درصددرون‌جمعیت‌ها وجود دارد مقدار به دست آمده FST (۰/۰۱۷) نیز تمایز اندکی‌را درون جمعیت‌ها نشان داد. بر اساس معیار Wright (۱۹۷۸) میزان FST بین ۰ تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز اندک است. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو منطقه نیز به‌ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۶۳ به‌دست آمد که براساس مقادیر شباهت ژنتیکی گزارش شده برای جمعیت‌های هم گونه (۰/۹-۰/۸) و هم جنس (۰/۸۵-۰/۰) بود (Thorpe، ۱۹۸۲). اما هنوز می‌توان بیان نمود که جمعیت‌های‌مورد‌بررسی‌از‌نظر‌شباهت ژنتیکی‌در‌محدوده‌جمعیت‌های هم‌جنس قرار می‌گیرند. نتایج این بررسی نیز حاکی از وجود جریان ژنی بالا بین مناطق مورد بررسی است (Wright، ۱۹۷۸). در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز فاصله ژنتیکی نسبتاً پایینی بین مناطق مورد بررسی مشاهده شد. در صورت عدم جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها انتظار می‌رفت تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها ایجاد گردد. جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی ماهی و هم‌چنین روش رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر باشد که در این روش لاروهای به‌دست آمده را بدون توجه به محل صید مولدین در مکان‌های مختلف رهاسازی می‌کنند.

تنوع ژنتیکی پایین مولدین پرورشی گیلان نسبت به مازندران میتواند ناشی از درون آمیزی بالای مولدین گیلان باشد که نشان از وجود تنگناه‌های ژنتیکی در منطقه نمونه‌برداری گیلان نسبت به منطقه نمونه‌برداری مازندران است. که این امر برای مولدین پرورشی ضروری و مورد نیاز است (Chen و همکاران، ۲۰۰۸).

تقدیر وتشکر

این تحقیق بخشی از رساله دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات می‌باشد که بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان و سایر دست‌اندرکاران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **سلیمانی، ن. و محمدی، غ.، ۱۳۹۳.** بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در استان خوزستان با استفاده از ریزماهواره. مجله علمی بیوتکنولوژی. دوره ۴، شماره ۱۴، صفحات ۹۳ تا ۹۸.

۲. **عبدلی، ا. و نادری، م.، ۱۳۷۴.** تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان، تهران.

۳. **قدسی، ز.؛ شعبانی، ع. و شعبانپور، ب.،** ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata* (Risso,1810 در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال ۳، شماره ۶، صفحات ۳۵ تا ۴۲.

۴. **قلیچ‌پورشعبانی، ذ.ع. و شعبانپور، ب.، ۱۳۸۹.** مقایسه ساختار ژنتیکی دو جمعیت کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مناطق گیلان و مازندران با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال ۲، شماره ۵، صفحات ۴۱ تا ۵۰.

۵. **لالوئی، ف.؛ رضوانی‌گیل‌کلائی، س.؛ فاطمی، س.م.ر. و تقوی، م.ج.، ۱۳۸۷.** بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از PCR-RFLP) mtDNA). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۷، شماره ۲، صفحات ۸۹ تا ۹۸.

۶. **Baerwald, M.R. and May, B., 2004.** Characterization of microsatellite loci for five members of theminnow family

www.SID.ir

Archive of SID

۱۸. **Hakansson, J. and Jensen, P., 2005.** Behavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation. Vol. 122, pp: 431-439.

۱۹. **Hillis, D.M.; Mable, B.K.; Larson, A.; Davis, S.K. and Zimmer, E.A., 1996.** Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular systematics (eds. Hillis, D.M.; Moritz, C. and Mable, B.K.). Sinauer Associates, Sunderland. pp: 321-384.

۲۰. **Kirpichnikov, V.S., 1972.** Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Communication I. breeding aims, original forms and cross system. Russian Journal of Genetics. Vol. 8, pp: 65-72.

۲۱. **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.

۲۲. **Liu, F.; Xia, J.H.; Bai, Z.H.; Fu, J.J.; Li, J.L. and Yue, G.H., 2009.** Highgenetic diversitand substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. Aquaculture. Vol. 297, pp: 51-56.

۲۳. **Liu, Y.; Chen, S.; Li, J., and Li, B., 2005.** Assessing the Genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. Aquaculture. Vol. 243, pp: 103-111.

۲۴. **Machado-Schiaffino, G.; Depico, E. and Garcia Vazquez, E., 2007.** Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supporitive breeding. Aquaculture. Vol. 264, pp: 59-65.

۲۵. **Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics. Vol. 89, pp: 583-590.

۲۶. **Peakall, R. and 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.

۲۷. **Rice, W.R., 1989.** Analyzing tables of statistical tests. Evolution. Vol. 43, pp: 223-225.

۲۸. **Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular cloning: A laboratory manual. (eds. Ford, N.; Nolan, C. and Fregusen, M.,). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp: 743-745.

۲۹. **Thorpe, J.P., 1982.** The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics. Vol. 13, pp: 139-168.

Cyprinidae found in the Sacramento-San Joaquin Delta and its tributaries. Molecular Ecology. Vol. 4, pp: 385-390.

۷. **Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, G.M., 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry. Vol. 84, pp: 680-683.

۸. **Blanchet, S.; Paez, D.; Bernatchez, L. and Dodson, J., 2008.** An integrated comparison of captive-bred and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*): Implications for supportive breeding programs. Biological Conservation. Vol. 141, pp: 1989-1999.

۹. **Chen, L.; Li, Q. and 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.

۱۰. **Crooijmans, R.P.M.A.; Bierbooms, V.A.F.; Komen, J.; Van der poal, J.J. and Groenen, M.A.M., 1997.** Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal genetics.Vol. 28.

۱۱. **Cui, J.Z.; Shen, X.Y.; Yang, G.P.; Gong, Q.L. and Gu, Q.Q., 2005.** Characterizatio of microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. Aquaculture. Vol. 250, pp: 129-137.

۱۲. **Diz, P.A. and Presa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincial*is in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture.Voll. 287, pp: 278-285.

۱۳. **Dunham, R.A., 2004.** Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches. Commonwealth Agricultural Bureax International (CABI) Publishing, Oxfordshire.

۱۴. **Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S.,** 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population geneticsdata analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. Vol 1. pp: 47-50.

۱۵. **Frankham, R., 2008.** Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecula Ecology. Vol. 17, pp: 325-333.

۱۶. **Grassi, F.; Imazio, S.; Gomarasca, S.; Citterio, S.; Aina, R.; Sgorbati, S.; Sala, F.; Patrignani, G. and Labra, M., 2004.** Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii Kreyer* in relation to different ecological locations. Plant Science. Vol. 166, pp: 1437-1441.

۱۷. **Ha, H.P.; Nguyen, T.T.; Poompuang, S. and Na-Nakorn, U., 2009.** Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage1878) in Vietnam. Aquaculture. Vol. 291, pp: 154-160.

www.SID.ir

Archive of SID

۳۰. **Tiedemann, R.; Hardy, O.; Vekemans, X. and Milinkovitch, M.C., 2000.** Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. Molecular Ecology. Vol. 9, pp: 1159-1163.

۳۱. **Wright, S., 1978.** Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural.

۳۲. **Yeh, F.C.; Yang, R.C. and Boyle, T., 1999.** POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-basesFreeware for population Genetic Analysis. Retrieved from http://www.uallberta.ca/fyeh. On: 11September 2008.

۳۳. **Zar, J.H., 1999.** Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jwesey.

۳۴. **Zhang, Y.P.; Wang, X.X.; Ryder, O.A.; Li, H.P.; Zhang, H.M.; Yong, Y. and Wang, P.Y., 2002.** Genetic diversity and conservation in endangered animal species. Pure Applied Chemistry.Vol. 74, pp: 575-584.

۳۵. **Zhao, N.; Ai, W.; Shao, Z.l.; Zhu, B.; Brosse, S. and Chang, J., 2005.** Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipensersinensis Gray*) genetic variability. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 21., pp: 13.

www.SID.ir