

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان‌های گیلان و مازندران با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

- 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 آوخ کیسمی: 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 رجبی اسلامی: 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 ایران تامین بچه ماهی کپور معمولی از طریق تکثیر مصنوعی صورت می گیرد که می تواند تنوع ژنتیکی این ماهی را دستخوش تغییراتی کند. هدف از این تحقیق، بررسی ساختار ژنتیکی مولدین ماهی کپور معمولی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهور بود. بدین منظور تعداد ۶۰ نمونه ماهی مولد کپور معمولی از مناطق گیلان و مازندران (۳۰ نمونه از هر منطقه) جمع آوری شد. DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۱۱ جایگاه ژنی ریزماهورهای بررسی شد. طبق نتایج حاصل محدوده تعداد آلل، متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۱۱-۱۸، ۰/۳۷، ۰/۸۶ به دست 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 معنی داری بین مناطق گیلان و مازندران نشان دادند. میزان شاخص *Fst* ۰/۱۳ به دست آمد که نشان دهنده وجود تمایز ژنتیکی پایین بین مناطق گیلان و مازندران بود که علت آن را می توان جابجایی ماهیان مولد توسط پرورش دهندگان عنوان کرد. تمامی جایگاه‌های مورد بررسی، انحراف معنی داری ($P \leq 0.05$) از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند که علت عمده آن را می توان به افزایش هتروزیگوسیتی نسبت داد. میزان شاخص تمایز و جریان ژنی بر اساس فراوانی آللی به ترتیب ۰/۱۷۲ و ۲/۱۱ محاسبه گردید. همچنین نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام بیانگر تمایز ژنتیکی دو جمعیت مورد بررسی است. با توجه به نتایج حاصل، می توان بیان داشت که جمعیت‌های مورد بررسی از غنای آللی و تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردارند.

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



مقدمه

استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ماهیان قادر است سطوح بالایی از پلی مورفیسم را نشان دهد که متأثر از شاخص‌های محیطی نیز نیست. یکی از نشانگرهای مولکولی نشانگرهای ریزماهوره هستند (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵). طبیعت چندآلی ریزماهوره‌ها توارث هم بارز پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث‌پذیری موجب شده که ریزماهوره‌ها کاربرد وسیعی در زمینه‌های مختلف علمی داشته باشند (Chen و همکاران، ۲۰۰۸). پراکنش و فراوانی جمعیت بسیاری از گونه‌ها در طول قرن گذشته به شدت تحت تأثیر فعالیت‌های انسانی قرار داشته است (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵). تکثیر مصنوعی و جایابی 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 کپور معمولی (*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 پیدا کرده، به‌طوری‌که جزو گونه‌های نیازمند به حفاظت در منطقه به‌شمار می‌رود (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). در عین حال ماهی کپور معمولی 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). هم‌اکنون حفاظت و بازسازی ذخایر ماهی کپور معمولی 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 آلی 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 طرف دیگر بررسی انجام شده توسط 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 طولانی مدت 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 در حال تغییر محسوب می‌گردد (Diz و Persa، ۲۰۰۹). 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 و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، با توجه به این‌که اثر روش‌های تکثیر مصنوعی بر ذخایر ژنتیکی آبریان اثبات شده و هم‌اکنون نیز بخشی از ذخایر این گونه از تکثیر مصنوعی حاصل می‌گردد، اطلاع از وضعیت ژنتیکی این گونه بسیار ضروری است. بدین‌منظور نشانگرهای مختلفی در بررسی‌های ژنتیک جمعیت استفاده می‌شوند، اما در میان این نشانگرها، نشانگرهای ریزماهوره 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 بالا کاربرد گسترده تری دارند (Chen و همکاران، ۲۰۰۸). ریزماهوره‌ها 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 ریزماهوره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (Dunham، ۲۰۰۴). علی‌رغم اهمیت اقتصادی ماهی کپور معمولی 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 کپور معمولی و وحشی در برخی از نواحی حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش (PCR-RFLP) از mtDNA است. هم‌چنین در تحقیق قلیچ‌پور و همکاران (۱۳۸۹) از نشانگرهای ریزماهوره برای ارزیابی ساختار جمعیتی وحشی این‌گونه 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 ریزماهوره برای ارزیابی ساختار جمعیتی مولدین کپور ماهیان پرورشی

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

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA: نمونه‌گیری از ۶۰ نمونه ماهی مولد ماده کپور معمولی 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) DNA های استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش‌های مربوط در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت و کمیت DNA های 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، MFW24، CypG24، MFW26، Syp4، HLJ809، LOC5، Grooijmans و همکاران، ۱۹۹۷؛ Baerwald و May (۲۰۰۴) مطالعات انتشار یافته انتخاب شدند (جدول ۱). واکنش‌های زنجیری پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر DNA، ۱۰۰ نانوگرم DNA polymerase HotStarTaq™، ۰/۳ واحد PCR بافر ۱x، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در ۷/۸ PH برای هر یک از آغازگرها انجام گرفت و بهترین دمای الحاق برای هریک از آن‌ها به دست آمد. شرایط سیکل دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در جدول ۲ آورده شده است. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد (دیونیزه) الکتروفورز و جداسازی و ژل‌ها به روش نیرتات 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 سانتی‌گراد)
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: TCTTCATTTTCAGGCTGCAAAG	MFW16
MFW17	۲۵	۲۰۸-۳۱۶	F: CTCAACTACAGAGAAAATTCA R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	MFW17
MFW20	۱۹	۲۰۴-۲۰۸	F: CAGTGAGACGATTACCTTGG R: GTGAGCAGCCACATTGAAC	MFW20
MFW26	۱۶	۱۷۴-۱۰۸	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGGATGCAAAAAG	MFW26
CypG24	۱۴	۱۱۲-۱۶۸	F: CTGCCGATCAGAGATAAACACT R: TGGCGGTAAGGGTAGACCAC	CypG24
Syp4	۱۳	۱۹۶-۲۷۴	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	Syp4
HLJ809	۱۲	۱۶۹-۲۷۴	F: ATCATCACAGCCAAAGAAGT R: TACGGACATAGTGCAGACAA	HLJ809
LOC5	۱۴	۱۰۱-۱۶۸	F-TTACACAGCCAAGACTATGT R-CAAGTGATTTTGTCTACTGC	LOC5

اساس فراوانی آللی، فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۸) با نرم‌افزار GeneAlex محاسبه گردید (Peakall و Smouse، ۲۰۰۶). هم‌چنین مقادیر شاخص تمایز Fst و Rst براساس تست AMOVA در سطح اطمینان ۹۹ درصد و غنی‌سازی آللی (AR) با استفاده از نرم‌افزار Excoffier و Schneider Arlequin (۲۰۰۵) با استفاده از ۱۰۰۰۰ شبیه‌سازی در

آنالیز آماری: پس از رتبه‌دهی به آلل‌ها از زیبایی تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_s)، 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



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 به ترتیب ۱۱ و ۱۸ به دست آمد. هم‌چنین، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آلل‌ها به ترتیب در جایگاه‌های LOC5 (۲ آلل) در جمعیت مرکز گیلان و MF2 (۲۲ آلل) در جمعیت مرکز مازندران مشاهده شد. حداکثر فراوانی آللی در منطقه مازندران ۰/۷۱ و حداقل آن ۰/۱۱ در گیلان بود. هم‌چنین میانگین فراوانی آلل‌ها در گیلان 1 ± 0.11 و در مازندران 3 ± 0.18 بود تعداد آلل‌های واقعی و آلل‌های مؤثر در گیلان ۴ و $1/75$ و در منطقه مازندران ۱۴ و $12/23$ 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 ناخالصی مشاهده شده در منطقه مازندران و کم‌ترین مقدار در نمونه منطقه گیلان بود. آلل‌های مؤثر نیز در محدوده $1/35 - 13/33$ به دست آمد که در این میان پایین‌ترین میزان در جایگاه MF17 ($1/75$) و بالاترین آن در جایگاه MF20 ($14/33$) 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.

هر مورد نیز محاسبه گردید (Zar, ۱۹۹۹). برای تنظیم سطح معنی‌داری آزمون‌های تکرار شونده 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 سانتی‌گراد)
۱ چرخه	واسرشت	۵ دقیقه	۹۴
	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
۵ چرخه	اتصال	۳۰ ثانیه	۵ درجه بالاتر از دمای اتصال
	تکثیر	۳۰ ثانیه	۷۲
	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
۳۲ چرخه	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 خود نشان دادند. با توجه به غلظت DNA به دست آمده ۱۵۹-۸۰ نانوگرم

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

جایگاه ژنی	پارامتر											
	N_a	N_e	H_o	H_e	N_a	N_e	H_o	H_e	N_a	N_e	H_o	H_e
مازندران	۱۴	۱۰	۰/۸۶	۰/۶۶	۱۲	۱۳	۰/۸۶	۰/۶۳	۱۳	۱۳	۰/۸۶	۰/۶۵
	$12/23$	$8/07$	$0/86$	$0/66$	$9/21$	$9/26$	$0/86$	$0/63$	$11/15$	$11/17$	$0/86$	$0/68$
گیلان	۱۱	۱۴	۰/۸۶	۰/۳۹	۱۱	۱۴	۰/۸۶	۰/۳۷	۱۱	۱۴	۰/۸۶	۰/۳۳
	$10/21$	$10/22$	$0/86$	$0/39$	$10/26$	$9/16$	$0/86$	$0/37$	$8/63$	$5/22$	$0/86$	$0/33$

N_e : تعداد آلل‌های مشاهده شده؛ N_e : تعداد آلل‌های مؤثر؛ H_o : هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e : هتروزیگوسیتی مورد انتظار

مشاهده شد. هم‌چنین از نظر تعداد آلل‌ها و میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P \leq 0/005$). انحراف از تعادل هاردی واینبرگ برای تمام ترکیبات لکوس جمعیت محاسبه شد. انحراف از تعادل بالایی در اکثر جایگاه‌های ژنی مشاهده شد، هر چند پس از ضریب

دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین دو منطقه در جایگاه‌های یازده‌گانه $0/86 - 0$ بود میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) $0/86$ به دست آمد. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) نیز $0/37$ به دست آمد که بالاترین ($0/55$) و پایین‌ترین ($0/37$) میزان آن به ترتیب در جایگاه‌های MF20 (منطقه مازندران) و MF17 (منطقه گیلان)



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.

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

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

(Frankham, 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 به‌گزینی شده است تنوع ژنتیکی مورد نظر است Hakansson and Jensen (۲۰۰۵).

در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای آلی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. در واقع بالا بودن غنای آلی نشان‌دهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت و استفاده از غنای آلی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (Diz و Persa, ۲۰۰۹). در این بررسی، میانگین مقادیر به‌دست آمده برای تعداد آلل‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار پایین‌تر از مقادیر گزارش شده توسط Crooijmans و همکاران (۱۹۹۷) برای کپور معمولی 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. به‌طور کلی تعداد کم آلل نشانه‌ای از تنگنای 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 کپور معمولی 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 ≤ ۰/۰۵) از لحاظ تعداد آلل و هتروزیگوسیتی بین مناطق گیلان و مازندران مورد بررسی مشاهده شد. این احتمال وجود دارد کاهش هتروزیگوسیتی در مولدین پرورش نسبت به مولدین وحشی تحقیقات مذکور در بالا به این علت باشد که

با توجه به نتایج آنالیز واریانس مولکولی نتایج FST حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹٪ نشان داد 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
گیلان		۰/۶۳
مازندران	۰/۳۷	

بحث

در این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گونه‌های پرورشی گیلان و مازندران از نشانگرهای ژنتیکی ریزماهورها استفاده شد که ریزماهورها 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 ریزماهورها 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



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 تنگناهای 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 و تشکر

این تحقیق بخشی از رساله دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات 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 کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در استان خوزستان با استفاده از ریزماهوره. 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 آریان، 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 ریزماهوره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال ۳، شماره ۶، صفحات ۳۵ تا ۴۲.
۴. قلیچ‌پور شعبانی، 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 ریزماهوره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال ۲، شماره ۵، صفحات ۴۱ تا ۵۰.
۵. لالویی، 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 mtDNA (PCR-RFLP). 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 the minnow family

کپور ماهیان پرورشی در گیلان ضریب درون آمیزی بالاتری نسبت به کپور ماهیان پرورشی مازندران دارند و در مازندران ضریب درون آمیزی بالاتر بود و این می‌تواند ناشی از اختلاط از مولدین وحشی و پرورشی باشد.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، در ۱۱ جایگاه ژنی (جایگاه ژنی × منطقه) پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی انحراف معنی داری ($P < 0.05$) از تعادل نشان دادند. با توجه به 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 به علت افزایش هتروزیگوسیتی ناشی از اختلاط ماهیان مولد وحشی و پرورشی در مناطق مورد بررسی باشد اما شاید علت در این امر برای پایین بودن تعداد آلل 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 جمعیت‌ها و تمام جایگاه‌های ژنی مورد بررسی در این تحقیق، مشاهده می‌شود که هنوز میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در نمونه‌های گیلان نیز بیش تر بوده، که این همان افزایش هتروزیگوسیتی است (Liu و همکاران، ۲۰۰۵).

سدهای محیطی، فرآیندهای تاریخی و پیشینه 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 مشخص کردن 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 درصد درون جمعیت‌ها وجود دارد مقدار به دست آمده FST (۰/۰۱۷) نیز تمایز اندکی را 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 به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۶۳ به دست آمد که بر اساس مقادیر شباهت ژنتیکی گزارش شده برای جمعیت‌های هم‌گونه (۰/۸-۰/۹) و هم‌جنس (۰/۳۵-۰/۸۵) بود (Thorpe، ۱۹۸۲). اما هنوز می‌توان بیان نمود که جمعیت‌های مورد بررسی از نظر شباهت ژنتیکی در محدوده جمعیت‌های 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



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.** High genetic diversity and 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 supportive 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.** Characterization 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 alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*. Vol. 287, pp: 278-285.
۱۳. **Dunham, R.A., 2004.** *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) Publishing, Oxfordshire.
۱۴. **Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S., 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. Vol. 1, pp: 47-50.
۱۵. **Frankham, R., 2008.** Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*. Vol. 17, pp: 325-333.
۱۶. **Grassi, F.; Imazio, S.; Gomasasca, 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.; Poopuang, S. and Na-Nakorn, U., 2009.** Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) in Vietnam. *Aquaculture*. Vol. 291, pp: 154-160.



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-bases Freeware for population Genetic Analysis. Retrieved from <http://www.uallberta.ca/fyeh>. On: 11 September 2008.
۳۳. **Zar, J.H., 1999.** Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
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 (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*. Vol. 21., pp: 13.

