بررسی تنوع نوکلئوتیدی ماهی کور غار ایرانی (*Iranocypris typhlops*) با استفاده از توالی‌یابی ژن 12S rRNA

- **سیامک یوسفی‌سیاهکلرودی***: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **صابر خدرزاده**: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **امیرمحمد علمی**: سازمان حفاظت محیط زیست، تهران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

ماهی کور غار ایرانی (*Iranocypris typhlops*) یک گونه منحصر به‌فرد است که تنها در غاری در استان لرستان زندگی می‌کند و به‌علت عدم توجه کافی جزو گونه‌های در معرض انقراض به‌شمار رفته و از نظر ذخیره ژنتیکی یک ماهی بسیار با ارزش می‌باشد. به‌منظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی ماهی کور غار ایرانی (*Iranocypris typhlops*)، پس از صید، نمونه‌برداری از باله شکمی 5 ماهی و استخراج DNA، از ناحیه 12S rRNA میتوکندری استفاده گردید. پس از تکثیر جایگاه ۷۹۹ جفت‌بازی به‌وسیلهٔ PCR، کلیه نمونه‌ها مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش حاکی از این بود که کلیه الگوهای توالی‌یابی ژن 12S rRNA در بین نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بودند که به‌دلیل عدم مشاهده الگوهای متفاوت می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که جایگاه مورد بررسی در گونه تحت مطالعه دارای یک هاپلوتیپ بوده و نتایج حکایت از عدم تفاوت در جمعیت مذکور و شباهت ژنتیکی نمونه‌ها با یکدیگر دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کور غار، تنوع نوکلئوتیدی، ژن 12S rRNA

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Siamak_Yousefi1@yahoo.com

مقدمه

به‌دلیل گسترش روند تخریب محیط‌زیست از سوی انسان در دهه‌های اخیر، حفظ ذخایر ژنتیکی بیش از پیش مورد توجه و اهمیت قرار گرفته است. ایران از نظر تنوع زیستی بسیار غنی است و گونه‌های جانوری و گیاهی متنوعی دارد که شاید بتوان گفت بیش از نیمی از آن‌ها هنوز کشف و شناسایی نشده‌اند. این سرزمین به‌دلیل قرارگیری در فلات ایران و هم‌جواری با اقلیم‌های مختلف آسیایی دارای پراکندگی جانوری منحصر به فردی است به‌طوری‌که آخرین حد پراکنش گونه‌های جانوری مختلف از اروپا گرفته تا هند و عربستان در ایران قرار دارد (۱۱). ماهی کور غار ایرانی با نام علمی *Iranocypris typhlops* یک گونه منحصر به فرد و کمیاب ایران بوده که به‌علت عدم توجه کافی جزو گونه‌های در معرض انقراض به‌شمار رفته و از نظر ژنتیکی یک ماهی بسیار با ارزش است. یگانه زیستگاه این گونه در استان لرستان، در کای رود در شمال روستای لون بخش پاپی می‌باشد(۳۳°۰۴′۳۸/۶″ N, ۴۸°۳۵′۳۳/۱″ E). از بارزترین ویژگی‌های این گونه کور بودن آن است که به‌همین دلیل در نام محلی به ماهی کور معروف است. این نوع از ماهیان برای تهیه غذا و فرار از خطرات از خطوط جانبی و شاخک‌های حسی اطراف لب استفاده می‌کنند (۵ و ۱۱). ماهی کور از نادرترین گونه ماهیان جهان است که از لحاظ شیلاتی فاقد ارزش اقتصادی بوده اما به‌عنوان یکی از نادرترین ذخایر ژنتیکی در بسیاری از پژوهشکده‌ها مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته‌اند و یا به‌عنوان ماهیان زینتی خارق العاده قاره آسیا پر تعدادترین گونه‌های کور آب شیرین دنیا یعنی در حدود بیست گونه و قاره‌های آمریکا و آفریقا پس از آن جای دارند. چین و تایلند بیش‌ترین گونه‌های کور را به‌خود اختصاص داده‌اند (۳ و ۱۰). در این میان، کشور ایران نیز با دارا بودن انحصاری (Endemic) گونه *Iranocypris typhlops*، در زمره کشورهای دارنده این گونه با ارزش قرار گرفته است. با توجه به این‌که اغلب گونه‌های ماهیان کور در لیست در معرض انقراض اتحادیه جهانی حفاظت از گونه‌ها (IUCN Red list) قرار دارند لزوم توجه همه جانبه کشورهای صاحب این میراث‌های طبیعی بیش از پیش مورد نیاز می‌باشد. ماهی کور غار به‌علت داشتن قلمرو کوچک و زیستگاه خاص که فقط شامل یک غار است به شدت در معرض خطر است و در حال حاضر جمعیت بسیار اندکی دارد (۸). این گونه نادر تحت حفاظت سازمان محیط است ولی با این حال نیاز به حمایت‌های جدی در سطح ملی و بین‌المللی دارد. با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و در معرض خطر انقراض قرارگرفتن تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های مولکولی در بررسی‌های فیلوژنیک و جمعیتی آبزیان به‌عنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است، برای مثال مطالعه ماهی (*Lepomis machruchirus*) Bluegill توسط Avise و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتیدهای mtDNA در کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) به‌وسیله Chang و همکارانش (۱۹۹۴) و در ارتباط با همین ماهی بررسی ژن‌های ND ۳/۴ و ND۵/۶ با روش PCR-RFLP در دو منطقه اروپا و شرق آسیا توسط Gross و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد . در مورد کاد اقیانوس اطلس نیز توالی نوکلئوتیدهای mtDNA به‌وسیله Johansen و همکاران (۱۹۹۴) منتشر شد. در ایران بررسی ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف جانوران در سالیان اخیر آغاز شده ولی تاکنون هیچ مطالعه مدونی در راستای تعیین ساختار ژنتیکی برخی از گونه‌های جانوری دارای اهمیت هم‌چون ماهی کور غار انجام نپذیرفته است و تمام تحقیقات در حد معرفی ظاهری و برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی گونه بوده است. لذا در این پژوهش با توجه به عدم وجود اطلاعات از میزان تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی ماهی کور غار ایران (*Iranocypris typhlops*)، میزان تنوع نوکلئوتیدی موجود با استفاده از توالی‌یابی ژن 12S rRNA میتوکندری بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۵ نمونه ماهی کور غار از بخش پاپی استان لرستان صید و نمونه‌برداری از باله شکمی ماهی انجام پذیرفت. نمونه بافت‌های به‌دست‌آمده به آزمایشگاه ژنتیک منتقل و DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp® DNA Investigator ساخت شرکت کیاژن استخراج گردید. در این پژوهش، به‌منظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی ماهی کور غار ایران، آغازگرهای ژن 12S rRNA میتوکندری به‌کار برده شد (جدول ۱). در این پژوهش، حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، بافر PCR ۱X، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۱واحد آنزیم Taq DNApolymerase و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر جایگاه از لحاظ چرخه‌های حرارتی (جدول ۲)، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ آمیزی با

GelRed و حصول اطمینان از خلوص باندی، نمونه‌ها توسط شرکت بایونیر کره‌جنوبی توالی‌یابی گردیدند و کلیه توالی‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 5.0 آنالیز شدند.

جدول۱: آغازگرهای ناحیه 12S rRNA

F	TTA CAC ATG CAA GTC TCC GC
R	GTG TGT ACG CGT CTC AGA GC

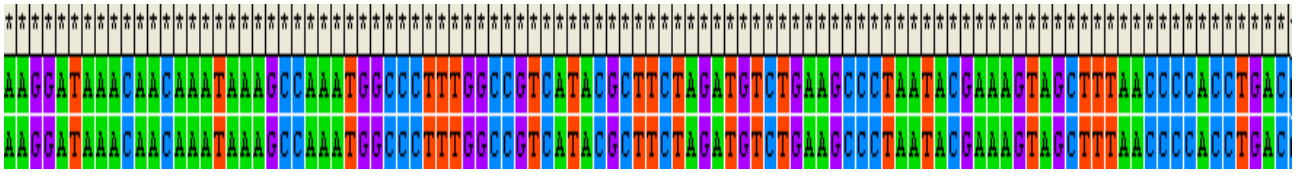
جدول ۲: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

ردیف	مراحل PCR	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹۴	۳۵ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۶۵	۳۵ ثانیه
۴	بسط آغازگر	۷۲	۶۰ ثانیه
۵	تکرار مرحلهٔ ۲ الی ۴ (۳۵ مرتبه)	-	-
۶	بسط نهایی آغازگر	۷۲	۵ دقیقه

نتایج

ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله با استفاده از دستگاه نانودراپ نشان داد که OD نمونه‌های DNA در هر بین ۲-۱/۸ و غلظت آن به‌طور میانگین در حدود ۲۰۰-۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. هم‌چنین ارزیابی‌های کیفی DNA حکایت از عدم آلودگی پروتئینی نمونه‌ها دارد. هم‌چنین جایگاه مورد مطالعه به‌خوبی تکثیر گردید که الگوی باندی مربوط به تکثیر قطعه ۷۹۹ جفت بازی ناحیه 12S rRNA موید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی‌شده برای آن می‌باشد (شکل ۱) و کلیه نمونه‌ها با قدرت خوانش بالا توالی‌یابی گردیدند (شکل ۲).

شکل ۱: الگوی باندی ناحیه 12S rRNA



شکل ۲: الگوی هم‌ترازی نمونه‌ها

نتایج این پژوهش حاکی از این بود که کلیه الگوهای توالی‌یابی ناحیه 12S rRNA در بین نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بودند (شکل ۲).

بحث

منابع ژنتیکی دست مایهٔ اصلی پژوهشگران برای تولید فرآورده‌های زیستی هستند که بدون وجود آن‌ها فرآورده‌های زیستی تولید نخواهد شد. به موازات گسترش فنون بیوتکنولوژی، حفاظت از ذخایر ژنتیکی را نیز باید به‌عنوان سرمایه و ثروتی که روز به روز ارزش بیش‌تری پیدا می‌کند مورد توجه قرار داد، چرا که تنوع ژنتیکی موجودات طی هزاره‌ها و اعصار متوالی و از تأثیر متقابل موجود زنده و محیط پدید آمده و در زمان حاضر از آن دوران به ارث رسیده است و اگر چه زیست فن‌آوری جدید می‌تواند در اصلاح نژاد گونه‌ها مؤثر باشد امّا به هیچ وجه قادر به جایگزین کردن آن‌ها و ایجاد تنوع از دست رفته نیست.

نتایج این پژوهش نشان داد که کلیه الگوهای توالی‌یابی ناحیه 12S rRNA در بین نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بودند. علت پایین بودن تنوع ژنتیکی در ماهیان به‌علت خونسرد بودن آن‌هاست. در موجودات خونسرد به‌دلیل متابولیسم پایین، سرعت تکاملی و تغییر نوکلئوتیدی mtDNA کم می باشد، ضمن آن‌که تنوع mtDNA فقط بر اساس جهش (موتاسیون) است و نوترکیبی در آن دخالتی ندارد (۱۴).

Stabile و همکاران (۱۹۹۶) پنج جمعیت متفاوت از تاس‌ماهی *A. oxyrinchus desotei* را در منطقه آمریکای شمالی تا خلیج مکزیک گزارش و عامل ایجاد آن را فاصله زیاد جغرافیایی این مناطق عنوان کردند. Hassanien و همکاران (۲۰۰۴) تنوع ژنتیکی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* در رودخانه نیل مصر را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که تنوع ژنتیکی ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی موجود در مناطق مورد مطالعه بوده است. بنابراین فاصله جغرافیایی مهم‌ترین عامل در شکل‌گیری ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. عدم مشاهدهٔ اختلاف در نمونه‌های این تحقیق به‌دلیل این بود که نمونه‌ها از یک منطقه (درون یک غار) که تنها محل زیست آن در ایران می‌باشد، جمع‌آوری شده بودند.

در تحقیق دیگری، یعش‌بچاری و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گل‌خورک (*Periophthalmus waltoni*) با استفاده از نشانگرهای RAPD در خلیج فارس پرداختند. نتایج تنوع ژنتیکی این ماهی در مناطق مختلف نمونه‌برداری را نشان داد. این محققین علاوه بر فاصله جغرافیایی، آلودگی آب، ورود آب شیرسن به آب شور در برخی از مناطق و به طورکلی وضعیت شرایط زیست محیطی را از عوامل تنوع به‌دست آمده اعلام کردند. آن‌ها هم‌چنین اظهار داشتند که بهتر بودن شرایط زیست‌محیطی باعث می‌گردد تا تولیدمثل در بین ماهیان گل‌خورک بیش‌تر شود که در نتیجه آن، تنوع ژنتیکی هم افزایش می‌یابد.

در مورد ماهی کور غار باید گفت که با توجه به وجود تنها یک زیستگاه در ایران، که آن‌هم دست‌خوش تغییرات طبیعی و انسانی است، باعث شده تا جمعیت آن‌ها کاهش چشمگیری یابند. شرایط تغذیه‌ای نامناسب، گرم شدن دمای هوا و آب، صید بی‌رویه برای انجام کارهای تحقیقاتی، عدم تکثیر و بازسازی ذخایر آن‌ها موجب تاثیر در کاهش تولیدمثل و جمعیت آن‌ها شده است و همه این مسائل باعث شده تا نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مشابه بوده و تنوعی در آن‌ها دیده نشود. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که نمونه‌ها همگی متعلق به یک جمعیت می‌باشد و در واقع نتایج به‌دست آمده از میزان Gst و جریان ژنی تایید کننده میزان شباهت به‌دست آمده در این جمعیت براساس معیار ژنتیکی Nei (۱۹۷۲) می‌باشد.

در خاتمه باید اذعان نمود که غنای گونه‌ای جانوری ایران نباید موجب غرور شود چرا که امروزه از گونه‌هایی هم‌چون شیر ایرانی و ببر مازندران جز نامی باقی نمانده است و اگر برنامه مدون و جامعی برای حفظ و صیانت از گونه‌های ارزشمند دیگر وجود نداشته باشد، در آینده نزدیک، این گونه‌های نادر و ذخایر ژنتیکی ارزشمند کشور نابود خواهند شد. اگرچه بسیاری از گونه‌های در معرض خطر تحت حمایت هستند اما متأسفانه ابزار و امکانات کافی برای حفاظت از آن‌ها وجود ندارد. از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها هم‌زمان با یک تعادل و توازن بین رانش و جریان ژنی شروع شده و هر جمعیت متحمل نرخ جهش و رانش ژنتیکی خود خواهد شد که تمایل به متمایزکردن جمعیت‌ها از یکدیگر دارد. همان‌طوری که اشاره گردید جایگاه مورد بررسی در گونه تحت مطالعه دارای یک الگو بوده و ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت افراد جمعیت ماهی کور غار و شباهت ژنتیکی بالای آن‌ها به یکدیگر داشته که با توجه به نتایج حاصله از تعداد

نمونه موجود و فرض بر نمونه‌گیری تصادفی از افراد مختلف و با توجه به این‌که کریدورهایی در بین ماهیان تحت مطالعه وجود دارد، این امر قابل توجیه است. ماهی کور غار یکی از گونه‌های ارزشمند کشور است که نتایج این تحقیق حکایت از عدم وجود تنوع ژنتیکی (وجود یک هاپلوتیپ) در این گونه داشته اما حفاظت و مدیریت جمعیت موجود، می‌تواند آن‌را از فرسایش ژنتیکی بیش‌تر و نابودی در زیستگاه‌های موجود حفظ نماید. با استناد به نتایج حاصله مبنی بر وجود شباهت ژنتیکی در بین افراد و خلوص بالای ژنتیکی، امکان وجود هم‌خونی و اثرات نامطلوب آن از جمله کاهش شایستگی (Fitness)، کاهش قدرت زنده‌مانی (Viability)، کاهش تولیدمثل، بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی و غیره امری محتمل به‌نظر رسیده و بروز این عوامل مخرب در این گونه که یکی از گونه‌های آسیب‌پذیر و حمایت‌شده محسوب می‌شوند، تداوم و بقاء این گونه را به مخاطره انداخته و به‌شدت آن‌ها را در خطر انقراض قرار خواهد داد. بنابراین برای حفاظت از گونه مذکور، لزوم کاهش هم‌خونی و تبعات آن امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

۱. **یعش‌بچاری، س.؛ قاسمی، س.ا.؛ ذوالقرنین، ح.؛ سالاری علی‌آبادی، م.ع. و محمدی، م.، ۱۳۹۱.** بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گل‌خورک (*Periophthalmus waltoni*) با استفاده از نشانگرهای RAPD در خلیج فارس. مجله علوم و فنون دریایی خرمشهر. دوره ۱۱، شماره ۴، صفحات ۶۲ تا ۶۹.

2. **Avise, J.C.; Bermingham, E.; Kessler, G. and Saunders, N.C. 1984.** Characterization of mitochondrial DNA Variability in a hybrid swara between subspecies of bluegill sunfish (*lepomis macrochirus*). Evaluation. 38:931-941.
3. **Bruun, A.F. and Kaiser, E.W., 1948.** *Iranocypris typhlops* n. g., n. sp., the first true cave fish from Asia. Danish Scientific Investigations in Iran, Copenhagen. 4:1–8.
4. **Chang, Y.S.; Huang, F.L. and Lo, T.B., 1994.** The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome". J. Mol. Evol. Vol. 38, No. 2, pp. 138-155.
5. **Coad, B.W., 1996.** Threatened fishes of the world: *Iranocypris typhlops* Bruun and Kaiser, 1944 (Cyprinidae). Environmental Biology of Fishes. 46: 374.
6. **Gross, R.; Kohlmann, K. and kersten, P., 2002.** PCR-RFLP analysis of mitochondrial ND 3/4 and ND5/6 gene polymorphism in the European and East Asian subspecies of common carp (*cyprinus carpio*); Aquaculture. 204: 507-516.
7. **Hassanien, H.A.; Einady, M.; Obeida, A. and Itriby, H., 2004.** Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Aquac. Res. 35: 587-593.
8. **IUCN. 2007.** 2007 IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.
9. **Johansen, S.; Berg, T. and Moum, T., 1994.** Variability and evolution of mitochondrial DNA sequences from marine animals. In: Third International marine Biotechnology, Tromso, Norway. 83 p.
10. **Marshall, N.B. and Thines, G.L., 1958.** Studies on the brain, sense organs and light sensibility of a blind cave fish (*Typhlogarra widdowsoni*) from Iraq. Proceedings of the Zoological Society of London. 131: 441–456.
11. **Movaghar, S., 1973.** *Iranocypris typhlops* Kaiser the blind cave fish from Iran [in Farsi]. Journal of the Veterinary Faculty of the University of Tehran 29: 43–50. (*Ctenopharyngdon idella*). Fish Science. 2:1-5.
12. **Nei, M., 1978.** Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, Mew York, NY.
13. **Stabile, J.; Waldman, J.R.; Parauka, F. and Wirgin, J., 1996.** Stocks structure and homing fidelity in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser Oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment Length polymorphism and sequence analyses of mitochondrial. DNA Genetics. 144: 467-475.
14. **Triantafyllidis, A.; Abatzopoulos, T.J. and Ecoenomidis, P.S., 1999.** Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) Populatioms, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. The Genetical society of Great Britain. Heredity. 82:503-509.

The Nucleotide Variation of the Iranian Cave Fish (*Iranocypris Typhlops*) Using 12S rRNA Gene Sequencing

- **Siamak Yousefi Siahkalroodi*:** Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University Varamin-Pishva Branch, Pishva, Iran
- **Saber Khederzadeh:** Department of Genetic and Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University Varamin-Pishva Branch, Pishva, Iran
- **Amir Mohammad Elmi:** Department Of Environment expert, Tehran, Iran

Received: February 2014 Accepted: March 2014

Keywords: Cave Fish, Genetic variation, 12S rRNA Region

Abstract

The Iranian Cave Fish (*Iranocypris typhlops*) is one of at risk species and important genetic resource that only habitat of this species is a cave in Lorestan province. In order to Genetic Determination of Iranian Cave Fish, after sampling and DNA extraction from ventral fins of 2 fish, the 12S rRNA region was used. After loci amplifying in PCR, the all samples were sequenced. The results revealed that all sequence pattern of 12S rRNA region were similar that it can be concluded that The 12S rRNA region in the two Iranian Cave Fish were a one haplotype and there weren't any variation and it would appear that the high genetic similarities and no differences are in the two Iranian Cave Fish of this population.

*Corresponding Author's email: Siamak_Yousefi1@yahoo.com