

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

- **سیامک یوسفی سیاهکلرودی***: 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 پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲

چکیده

ماهی کور غار ایرانی (*Iranocypris typhlops*) یک گونه منحصر به فرد است که تنها در غاری در استان لرستان زندگی می‌کند و به علت عدم توجه کافی جزو گونه‌های در معرض انقراض به‌شمار رفته و از نظر ذخیره ژنتیکی یک ماهی بسیار با ارزش می‌باشد. به منظور 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 به وسیله 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 به دلیل 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



مقدمه

بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های مولکولی در بررسی‌های فیلوژنیک و جمعیتی آریزان به‌عنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است، برای مثال مطالعه ماهی *Bluegill (Lepomis machruchirus)* توسط Avise و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتیدهای mtDNA در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌وسیله Chang و همکارانش (۱۹۹۴) و در ارتباط با همین ماهی بررسی ژن‌های ND ۳/۴ و ND ۵/۶ 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 کیزان 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، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase 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

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 (E ۴۸°۳۵'۳۳/۱" N, ۳۳°۰۴'۳۸/۶"). 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 پژوهش‌ها مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته‌اند و یا به‌عنوان ماهیان زینتی خارق‌العاده 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،



