

تنوع ژنتیکی درون و بین نژادهای ایرانی، فرانسوی و دانمارکی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنالیز

PCR-RFLP قطعات DNA میتوکندری

ربیع شکلی^۱، حسین رحمانی^{۲*}، قدرت رحیمی^۳، محسن قلیزاده^۴

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۳۰

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین و درون نژادهای قزل آلاهی رنگین کمان ایرانی، فرانسوی و دانمارکی بود. DNA میتوکندریایی ۱۳۵ نمونه (۴۵ نمونه از هر نژاد)، به روش فنل کلروفوم استخراج شده و با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چند شکلی طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) مورد مطالعه قرار گرفت. قطعات شامل ۹۸۶ جفت باز از D-loop و ۹۷۴ جفت باز از سیتوکروم *b* تکثیر و با آنزیم‌های هضم مختلف مطالعه شدند. هیچ کدام از نمونه‌ها برای آنزیم‌های هضم در D-loop تنوع ژنتیکی را نشان ندادند. با استفاده از آنزیم‌های هضم، ۴ هاپلوتیپ مختلف روی ژل آگارز برای سیتوکروم *b* شناسایی شد که در میان آن‌ها دو هاپلوتیپ مخصوص نژادی برای نژاد دانمارکی مشاهده شد. بیشترین فراوانی هاپلوتیپ‌ها برای هاپلوتیپ AABBB با ۶۱ مشاهده بود. دندروگرام UPGMA بر اساس سیتوکروم *b* نشان داد که نژاد ایرانی با فرانسوی در یک کلاستر و از نژاد دانمارکی جدا شد. فاصله ژنتیکی بین نژاد ایرانی و فرانسوی ۰/۰۰۸ و بین نژادهای ایرانی و دانمارکی و همچنین فرانسوی و دانمارکی ۰/۱۹۸ بود.

واژگان کلیدی: قزل آلاهی رنگین کمان، تنوع ژنتیکی، PCR-RFLP، mtDNA

۱. مقدمه

شناسایی انشقاق جمعیتی در اثر تغییر جغرافیای زیستی بوده است. DNA میتوکندریایی (mtDNA) خصوصیات متعددی دارد که آن را مبدل به یک نشانگر مولکولی با ارزش برای مطالعات ساختار ژنتیکی و تکاملی جمعیت‌ها ساخته است (Zhang and Hewitt, 2003). DNA میتوکندریایی توارث مادری بدون رخداد نوترکیبی دارد و از نرخ جهش بالایی برخوردار است (Avisé, 2000) که یکی از دلایل کاربرد آن در مطالعات فیلوژنی است (Kohout et al., 2013; Bernatchez, 2001).

هدف از این پژوهش شناسایی میزان تنوع ژنتیکی در داخل هر یک از نژادهای قزل‌آلای رنگین-کمان ایرانی، فرانسوی، دانمارکی و تعیین میزان اختلاف و تشابه ژنتیکی بین نژادی آنها است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه‌برداری

در این تحقیق ۴۵ نمونه از هر سه نژاد ایرانی (از کارگاهی در دو هزار تنکابن)، فرانسوی (از کارگاهی در شهرستان ساری) و دانمارکی (از کارگاهی در روستای سیاه‌روبار استان گلستان تهیه شدند. قطعات دو الی سه سانتی‌متر مربع به کمک قیچی استریل از باله‌ی دمی ماهیان بریده و در تیوپ‌هایی با الکل اتیلیک تثبیت و بر اساس نژاد و محل جمع‌آوری کدگذاری شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

۲.۲. استخراج DNA

استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم بهینه شده (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. برای تعیین مقدار و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

۳.۲. طراحی و مشخصات آغازگرها

برای تکثیر دو جایگاه سیتوکروم *b* و *D-loop* از دو جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). آغازگرهای مورد استفاده با توجه به توالی ژنوم میتوکندریایی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجود در بانک ژن (NCBI) به‌وسیله نرم‌افزار الیگو-۷ (Rychlik,

روند رو به رشد جمعیت جهان و افزایش نیازهای پروتئینی، اهمیت پرورش و مصرف آبزیان از جمله ماهیان را افزوده است. علاوه بر این، کاهش ذخایر آبزیان، بشر را بر آن داشته تا برای پرورش گسترده آبزیان در محیط‌های آبی کوچک و محدود نیز اقدام کند. امروزه تقاضا برای مصرف ماهی در کلیه نقاط دنیا در حال افزایش است. به همین دلیل بهبود در برنامه‌های تحقیقاتی به خصوص در زمینه تکثیر، پرورش، تغذیه، ژنتیک و مدیریت سیستم‌های پرورشی مورد نیاز خواهد بود.

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مهمترین گونه آزاد ماهیان پرورشی در آب شیرین است که سهم بالایی در سبد غذایی انسانی دارد. عقیده بر این است که منشا و خاستگاه اکثر نژادهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از یک هجری در کالیفرنیا که در سال ۱۸۷۹ تاسیس شده است، می‌باشد (Gall and Crandell, 1992). از آن به بعد نژادهای زیادی از این ماهی توسط متخصصین اصلاح نژاد با هدف بهبود ویژگی‌های مهم اقتصادی مثل میزان رشد، مقاومت در برابر بیماری، قدرت بقا، زمان تخم‌ریزی و کیفیت گوشت توسعه یافتند (Gjedrem, 2000). در ایران، تاریخچه تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان به سال ۱۹۶۶ در کرج بر می‌گردد، اما امروزه از کشورهایی مثل دانمارک، انگلیس، ایتالیا، اسکاتلند و استرالیا تخم‌های چشم زده با هدف پرورش وارد ایران می‌شود (Sajedi et al., 2003).

کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا سبب شده که توجه محققین به روش‌های زیست‌شناسی از جمله روش‌های مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب شود. تمایز جمعیت‌های متفاوت آبزیان به سه روش متداول ریخت‌شناسی، تنوع آلوزایم‌ها و تفاوت در توالی DNA انجام می‌شود. روش استفاده از تفاوت در توالی‌های DNA از جمله دقیق‌ترین روش‌ها در طبقه‌بندی موجودات بوده و دارای دقت قابل توجه‌ای می‌باشد. بررسی DNA میتوکندریایی در مطالعات جمعیتی و تنوع ژنتیکی ماهیان به وفور مورد استفاده قرار گرفته است. در بسیاری از این موارد هدف این قبیل مطالعات تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و

جایگاه	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)
سیتوکروم <i>b</i>	رفت: 3' actagtgcacctcccagcac 5' برگشت: 3' gtatgcctccgattcaggtg 5'	۹۷۴
D-loop	رفت: 3' ttaccatataaactgcttgtgag 5' برگشت: 3' ttgtgctagcgggactttct 5'	۹۸۶

(2007) طراحی شدند.

میکرولیترازیم (10 u/μl) و ۷/۷ میکرولیترا آب بود. نمونه‌ها ابتدا ورتکس و بعد از سانتریفوژ به مدت ۱۲ تا ۱۵ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۶۵ درجه سانتی‌گراد در مورد *MspAII*) مورد انکوباسیون قرار گرفت. به منظور غیرفعال کردن آنزیم و توقف واکنش، مخلوط را ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۸۰ درجه سانتی‌گراد در مورد *MspAII*) تیمار شدند. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر، مقدار ۳ تا ۴ میکرولیترا محلول لودینگ به هر یک از نمونه‌ها اضافه و بر روی ژل ۳ درصد الکتروفورز شدند. باندهای به دست آمده بعد از انجام عمل الکتروفورز روی ژل مورد نظر در زیر اشعه UV بررسی شدند.

۴.۲. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیترا شامل ۲/۵ میکرولیترا بافر (10x) PCR، ۰/۵ میکرولیترا dNTPs (10mM)، ۰/۲ میکرولیترا آنزیم پلی‌مراز (1 U)، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ میکرولیترا $MgCl_2$ (1.6 mM) و یک میکرولیترا از هر یک از پرایمرها (10 pM) انجام شد. سپس چرخه‌های حرارتی PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت یک دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تایید اندازه قطعه تکثیر شده و هم‌چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M100 از شرکت فرمنتاز (Fermentase) استفاده شد.

۶.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

هتروزیگوسیتی درون جمعیتی طبق فرمول زیر محاسبه شد (Nei, 1987):

$$\hat{d}_{xy} = \sum_{i=1}^L \delta_{xy}(i)$$

که در آن $\delta_{xy}(i)$ تابع کرومکس است که در صورت مشابه بودن ال‌ها در لوکوس Δm هر دو هاپلوتایپ برابر یک و در غیر این‌صورت برابر صفر است. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه با فرمول ارائه شده زیر محاسبه شد (Nei and Tajima, 1981):

$$\hat{d}_{xy} = 1/L \sum_{i=1}^L \delta_{xy}(i)$$

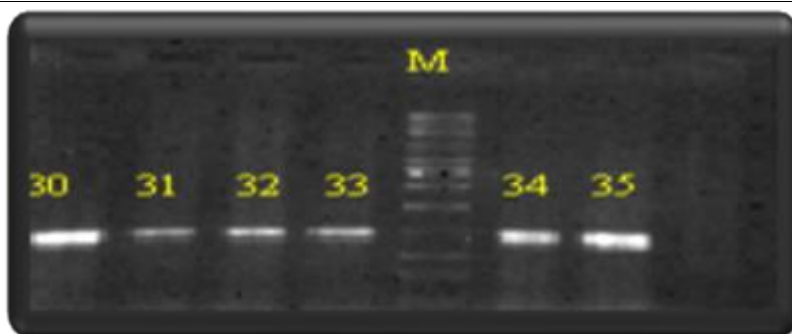
که در آن $\delta_{xy}(i)$ تابع کرومکس است که در صورت مشابه بودن ال‌ها در لوکوس Δm برابر یک و در غیر این‌صورت برابر صفر است. همچنین تنوع ژنی و واریانس نمونه‌گیری با استفاده از فرمول ارائه شده توسط نی (Nei, 1987) محاسبه شد.

۷.۲. شاخص‌های مولکولی

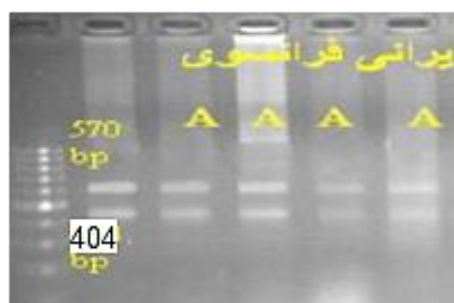
۵.۲. هضم محصولات PCR با آنزیم‌های

محدودکننده

جهت بررسی چند شکلی در ناحیه تکثیر شده سیتوکروم *b* از ۶ آنزیم برشی به نام‌های *MspAII*، *PpuMI* و *BgIII*، *AciI*، *HhaI*، *NarI* تکثیر شده D-loop از ۴ آنزیم برشی *BsII*، *ApoI*، *BstUI* و *MspAI* براساس توالی ژن‌ها در بانک ژن استفاده شد. برای انتخاب آنزیم‌های مورد استفاده از نرم‌افزار NEBcutter (Vincze et al., 2003) استفاده شد. حجم واکنش مورد استفاده جهت هضم آنزیمی ۱۵ میکرولیترا شامل ۶ میکرولیترا محصول PCR، یک میکرولیترا بافر آنزیم (10X)، ۰/۳



شکل ۱- محصول PCR ژن سیتوکروم *b* ماهی قزل آلابی رنگین کمان نژاد ایرانی (شماره های ۳۰ تا ۳۵، نمونه هایی از قطعه تکثیر و M مارکر وزنی می باشد).



شکل ۲- تیمار آنزیمی (*MspAII*) برای جایگاه سیتوکروم *b* در نژادهای دانمارکی، ایرانی و فرانسوی.

۳. نتایج

۱.۱.۳ استخراج

در این تحقیق DNA به روش فنل-کلروفوم از ۱۳۵ نمونه ماهی قزل آلابی رنگین کمان از سه نژاد مختلف ایرانی، فرانسوی و دانمارکی از بافت باله استخراج شد. بررسی کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که کیفیت DNA برای انجام واکنش های زنجیره ای پلیمرز مطلوب بود.

۲.۲.۳ جایگاه سیتوکروم *b*

بررسی محصول PCR ژن سیتوکروم *b* میتوکندری با طول ۹۷۴ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که این محصولات کاملا واضح و مشخص و برای مطالعات RFLP مناسب بودند (شکل ۱).

۱.۲.۳ نتایج حاصل از هضم آنزیمی

نتایج هضم آنزیمی، با استفاده از ۶ آنزیم برش-دهنده که دارای جایگاه های اختصاصی روی محصولات PCR بودند در جدول ۲ آمده است.

همانطور که ملاحظه می شود آنزیم های *HhaI* و *PpuMI* در هیچ کدام از سه نژاد مورد مطالعه

۱.۷.۲ میانگین تعداد اختلافات جفتی

میانگین تعداد اختلافات بین تمام جفت هاپلوتیپ ها را در نمونه نشان می دهد و به صورت زیر محاسبه می شود (Tajima, 1993).

$$\bar{\pi} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k p_i p_j \bar{d}_{ij}$$

که در آن \bar{d}_{ij} تخمینی از تعداد جهش های بوقوع یافته از زمان انشقاق هاپلوتیپ *i* و *j*، تعداد هاپلوتیپ ها و P_i فراوانی آمین هاپلوتیپ است.

۲.۷.۲ تنوع نوکلئوتیدی یا میانگین تنوع ژنی در

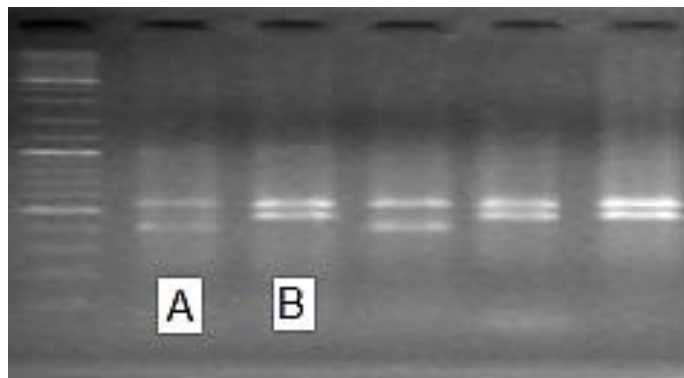
L لوکوس

این معیار احتمال متفاوت بودن نوکلئوتیدهای همولوگ یک جایگاه در دو فرد را نشان می دهد که معادل تنوع ژنی در سطح نوکلئوتید است. تنوع نوکلئوتیدی مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Nei and Tajima, 1981):

برای محاسبه شاخص های فوق از نرم افزار Excoffier and Lischer,) Alrequin V 3.5 (2010 استفاده شد. تجزیه خوشه ای جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار Popgene V1.32 (Yeh et al., 2000) انجام شد.

جدول ۲- ژنوتیپ و اندازه قطعات حاصل از هضم محصول PCR ژن سیتوکروم *b* (اندازه تمامی قطعات براساس هضم محصول PCR، 974 جفت باز محاسبه شده است).

آنزیم	شروع محل برش	ژنوتیپ		طول قطعه	
		ایرانی و فرانسوی	دانمارکی	ایرانی و فرانسوی	دانمارکی
<i>MspAII</i>	۴۰۴	A	B	۴۰۴ و ۵۷۰	۹۷۴ (بدون برش)
<i>NarI</i>	۴۲۳	A	B	۴۲۳ و ۵۵۱	۹۷۴ (بدون برش)
<i>HhaI</i>	۴۲۵	B	B	۹۷۴ (بدون برش)	۹۷۴ (بدون برش)
<i>AciI</i>	۵۲۲	A, B	A, B	۴۰۰، ۴۵۲ و ۵۲	۴۵۲، ۴۰۰ و ۵۲
<i>BglIII</i>	۶۳۱	A	A	۶۳۱ و ۳۴۳	۶۳۱ و ۳۴۳
<i>PpuMI</i>	۷۰۳	B	B	۹۷۴ (بدون برش)	۹۷۴ (بدون برش)



شکل ۳- تیمار آنزیمی (*AciI*) برای جایگاه سیتوکروم *b* در برخی نمونه‌های مورد مطالعه. هر دو ژنوتیپ در تمام افراد داخل و بین نژادها دیده شدند.

دانمارکی و فرانسوی-دانمارکی اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد. در حالی که بین نژادهای فرانسوی و ایرانی این اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

نزدیک بودن تعداد آلل موثر به تعداد آلل واقعی دلیل بر تاثیر موثر آلل‌ها در چند شکلی و برآورد تنوع ژنتیکی است. لازم به ذکر است که تعداد آلل‌های موثر در هر لوکوس با چند شکلی رابطه مستقیم دارد. تعداد الل‌های موثر یکی از معیارهای چندشکلی و هتروزیگوسیتی است. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی براساس باندهای چندشکل و تک‌شکل که عبارتند از تعداد الل مشاهده شده (Na)، تنوع ژنی (H) و شاخص اطلاعات شاننی (I) نژادهای مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۴ آمده است.

۳.۲.۳. تشابه بین جمعیتی و فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله تفاوت قابل توجه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آن‌ها است. به عبارت دیگر این شاخص بیانگر میزان تفاوت-های آلی بین جمعیت‌ها و یا گونه‌هاست که با استفاده از بعضی از کمیت‌ها قابل اندازه‌گیری است.

قادر به برش محصولات PCR نشدند. همچنین الگوی برشی آنزیم *BglIII* در تمامی نمونه‌های هر سه نژاد یک شکل بود. نتایج نشان داد که الگوی برشی آنزیم-های *MspAII* و *NarI* در نمونه‌های ایرانی و فرانسوی یک شکل بود (ژنوتیپ A) در حالی که نمونه‌های دانمارکی را برش نداد (ژنوتیپ B، شکل ۲).

آنزیم *AciI* چندشکلی را در درون و بین نژادهای مورد مطالعه نشان داد (ژنوتیپ A و B) (شکل ۳).

۲.۲.۳. مطالعه هاپلوتیپ‌ها

با توجه به الگوهای هضم آنزیمی، در مجموع ۴ هاپلوتیپ مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین فراوانی هاپلوتیپ‌ها در نژادهای ایرانی و فرانسوی مربوط به هاپلوتیپ AABBAB و در نژاد دانمارکی مربوط به هاپلوتیپ ABBBAB بود. هاپلوتیپ‌های ABBBAB و BBBBAB تنها در نژاد دانمارکی و هاپلوتیپ‌های ABBBAB و BABBAB هم در نژادهای ایرانی و هم فرانسوی مشاهده شد. نتایج آزمون مربع کای جهت تعیین اختلاف فراوانی هاپلوتیپ‌ها نشان داد که بین نژادهای ایرانی-

جدول ۳- وفور انواع هاپلوتایپ‌ها در نژادهای مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

جمع	نژاد دانمارکی	نژاد فرانسوی	نژاد ایرانی	هاپلوتایپ
۶۱	-	۳۲	۲۹	AABBAB
۲۹	-	۱۳	۱۶	BABBAB
۳۱	۳۱	-	-	ABBBAB
۱۴	۱۴	-	-	BBBBAB
	۰/۴۳	۰/۴۱	۰/۴۶	هتروزیگوسیتی

جدول ۴- نتایج بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس باندهای چندشکل و تک‌شکل نژادهای مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

فاکتور	نژاد ایرانی	نژاد فرانسوی	نژاد دانمارکی
Na	۱/۶۶	۱/۶۷	۱/۶۷
Ne	۱/۱۴	۱/۱۲	۱/۱۳
H	۰/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۷
I	۰/۱۱	۰/۱	۰/۱

جدول ۵- تشابه (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (پایین قطر) بین نژادهای مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

نژادها	ایرانی	فرانسوی	دانمارکی
ایرانی	۰/۹۹	۰/۸۲	
فرانسوی	۰/۰۰۰۸	۰/۸۲	
دانمارکی	۰/۱۹۸	۰/۱۹۸	

جدول ۶- شاخص‌های مولکولی و شاخص‌های تنوع استاندارد بین نژادهای مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

نژاد	تنوع ژنی	میانگین تعداد اختلافات جفتی	تنوع نوکلئوتیدی
ایرانی	۰/۴۷±۰/۴۴	۰/۴۶±۰/۴۱	۰/۰۷±۰/۰۷
فرانسوی	۰/۴۴±۰/۰۵۴	۰/۴۲±۰/۳۸	۰/۰۷±۰/۰۷
دانمارکی	۰/۴۲±۰/۰۵۸	۰/۴۳±۰/۳۹	۰/۰۷۳±۰/۰۷

نژادهای ایرانی و فرانسوی در یک کلاستر و جدا از نژاد دانمارکی قرار گرفتند.

۳.۳. جایگاه D-loop

محصول PCR مربوط به جایگاه D-loop به طول ۹۸۶ جفت باز در ۱۳۵ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تکثیر شد و با استفاده از مارکر وزنی شرکت فرمنتاز روی ژل آگارز یک درصد تأیید شد. باندهای ایجاد شده روی ژل آگارز واضح بوده و برای مطالعه بیشتر مناسب بودند.

۱.۳.۳. تجزیه کلاستر

جهت انجام مطالعات هضم آنزیمی از ۴ آنزیم برش‌دهنده که دارای جایگاه‌های اختصاصی روی محصولات PCR بوده، استفاده شد (جدول ۷). همانطور که مشاهده می‌شود از بین ۴ آنزیم مورد استفاده برای برش آنزیمی محصول PCR ناحیه D-loop، آنزیم‌های *MspAI* و *BstUI* محصولات هیچ

تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیتی با استفاده از نرم‌افزار Popgene محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین نژادهای ایرانی و فرانسوی بود.

۴.۲.۳. شاخص‌های مولکولی و تنوع استاندارد

شاخص‌های مولکولی و تنوع استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Alrequin نشان داده که از نظر تنوع ژنی نژاد ایران بیشترین تنوع و میانگین تعداد اختلافات جفتی را داشته است اما نژاد دانمارکی بیشترین تنوع نوکلئوتیدی را نشان داده است که البته در اکثر مواقع این اختلافات زیاد نبوده است (جدول ۶).

۵.۲.۳. تجزیه کلاستر

درخت فیلوژنی با کمک نرم‌افزار Popgene ترسیم شد (شکل ۴) همانطور که ملاحظه می‌شود سه نژاد به دو گروه جداگانه تعلق دارند و از هم جدا هستند.

جدول ۷- الگو و اندازه قطعات حاصل از هضم محصولات PCR ناحیه D-loop توسط آنزیم‌های برش‌دهنده در نژادهای مورد مطالعه.

آنزیم	شروع محل برش	ژنوتیپ	قطعات به دست آمده
<i>ApoI</i>	۵۹۷	A	۵۹۷ و ۳۸۹
<i>BsII</i>	۷۲۲	A	۷۲۲ و ۲۴۶
<i>MspAI</i>	۹۱۶	B	بدون برش (۹۸۶ جفت باز)
<i>BstUI</i>	۷۲۱	B	بدون برش (۹۸۶ جفت باز)



شکل ۴- درخت فیلوژنی حاصله برای سه نژاد مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

شده توسط Sajedi و همکاران (۲۰۰۳) در سه جمعیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۹ هاپلوتایپ) و Sah و همکاران (2011) در سه جمعیت *Barilius bendelisis* (۸ هاپلوتایپ) بود. همچنین میزان کل هتروزیگوسیتی در مطالعه Sajedi و همکاران (۲۰۰۳) به طور قابل توجهی بیش‌تر (۰/۶۶) از مطالعه حاضر بوده است. تعداد متفاوت هاپلوتایپ‌های مشاهده شده می‌تواند به دلیل آنزیم‌های مختلف مورد استفاده و طول قطعات مورد مطالعه باشد. مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های دیگر نیز هاپلوتایپ‌های بسیار زیادی مشاهده نمودند که Chunyan و همکاران (۲۰۱۰) تنوع زنتیکی یک نوع سگ‌ماهی را با توالی‌یابی کامل ژن سیتوکروم *b* بررسی کردند و ۹۷ هاپلوتایپ مجزا شناسایی کردند. Kotlik and Berrebi (۲۰۰۲) ۱۴ هاپلوتایپ را در اثر هضم آنزیمی قطعه ۵۹۴ جفت بازی سیتوکروم *b* باربوس ماهیان دانوب شناسایی نمودند. در مطالعه حاضر دو هاپلوتایپ منحصر به فرد برای نژاد دانمارکی معرفی شد که تایید آن با مطالعات بیشتر در نمونه‌های بزرگ‌تر می‌توان از آن‌ها در شناسایی و تمایز نژادی استفاده کرد.

در این مطالعه برخی آنزیم‌ها مانند *PpuMI*, *HhaI*, *NarI*, *BgIII* و *MspII* یا فاقد جایگاه برشی در قطعه سیتوکروم *b* بوده و یا دارای یک نوع الگوی برشی در نژادهای مختلف مورد مطالعه بودند. مشابه با نتایج مطالعه حاضر، Ghotb-Razmjoo و همکاران (۱۹۹۸) در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری با استفاده از سیتوکروم *b*، هیچ چند شکلی با ۱۲ آنزیم مورد استفاده مشاهده نکردند. همچنین Laloeei و همکاران (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی ماهیان

کدام از نمونه‌ها را برش ندادند (ژنوتیپ B).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی داخل یک جمعیت و یا بین افراد جمعیت‌های مختلف یکی از اهداف ارزشمند در مدیریت ذخایر ژنتیکی و طراحی برنامه‌های مناسب اصلاح نژادی می‌باشد. آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، اطلاعات مهمی برای حفاظت، مدیریت و استراتژی‌های تولید ماهی ارائه می‌کند. حفظ تنوع ژنتیکی یک نژاد برای آینده تجاری آن مهم خواهد بود. از دست دادن میزان تنوع ژنتیکی در درون یک نژاد می‌تواند موجب کاهش هم‌خونی و سپس کاهش محسوس عملکرد صفات تولیدمثلی و همچنین افزایش وقوع برخی از ناهنجاری‌های ژنتیکی خاص شود (Blott et al., 1999).

نرخ سریع تکامل میتوکندری همراه با توارث مادری، میتوکندری را به یک سیستم بسیار مفید ژنتیکی برای مطالعه جریان ژنی، ساختار جمعیتی و دیگر مطالعات جمعیتی تبدیل نموده است. حتی ژن-های کدکننده پروتئینی محافظتی مانند سیتوکروم *b* تمایل به تنوع داخل گونه‌ای به‌ویژه در موقعیت سوم کدون دارند که می‌تواند در شناسایی استوک‌ها به کار رود (Habib et al., 2011). ضمن این‌که Brioly و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که ژن سیتوکروم *b* حاوی اطلاعات مناسب برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی است که از نظر ریختی خیلی به هم نزدیک هستند.

در مطالعه حاضر بر اثر هضم آنزیمی ۴ هاپلوتایپ حاصل شد که کمتر از تعداد هاپلوتایپ‌های مشاهده

نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی درون جمعیتی تاس ماهی ایرانی سواحل جنوبی دریاچه خزر را به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۷۵ گزارش نمود. همچنین Li و همکاران (۲۰۱۱) بر خلاف نتایج تحقیق حاضر، با استفاده از D-loop میتوکندری، متوسط تنوع ژنتیکی را حدود ۰/۰۱۴ تا ۰/۰۰۴ برای تنوع نوکلئوتیدی و ۰/۶۸ تا ۰/۹۳ برای تنوع هاپلوتیپی گزارش کردند که می‌تواند بیان‌کننده جهش‌های نسبتاً زیاد در این گونه‌ها باشد.

در پژوهش حاضر که تنوع ژنتیکی بین سه نژاد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته، با توجه به نتایج بدست آمده دامنه تنوع ژنتیکی در بین نژادهای مختلف از ۰/۰۶۸ تا ۰/۰۷۶ متغیر بود. پایین بودن تعداد جمعیت اولیه و نیز انتخاب برای افراد با تولید برتر و نیز تعداد نسل‌های آمیزشی این جمعیت‌ها می‌تواند موجب کاهش تنوع و بالابودن تشابه ژنتیکی در درون جمعیت‌ها باشد. با توجه به این‌که در بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت ایرانی از قدمت کمتری برخوردار بوده و تعداد نسل‌های مورد انتخاب نیز کمتر می‌باشد بنابراین تنوع بیشتری در آن به چشم می‌خورد. ضمن این‌که نژاد ایرانی مرسوم در کشور از نژادهای وارداتی (احتمالاً از کشور فرانسه) بوده که مولدین آن‌ها در مزارع پرورشی ایران تکثیر یافته و هیچ‌گونه دستکاری ژنتیکی بر روی آن‌ها انجام نشده است.

نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که جمعیت ایرانی و فرانسوی دارای کمترین فاصله ژنتیکی هستند. از طرفی این دو جمعیت به لحاظ مقایسه تنوع ژنتیکی درون جمعیتی نیز تفاوت کمی با یکدیگر داشته‌اند، که شاید این فرضیه را -که جمعیت ایرانی از مولدین فرانسوی منشا گرفته باشد- تایید نماید و احتمالاً طی فعالیت چندین ساله این مزارع، ارتباط آن‌ها با مولدین فرانسوی قطع و خود این مزارع با انتخاب درون جمعیتی مولدین به طور مستقل ادامه کار داده‌اند. یکنواختی ژنتیکی بالاتر در جمعیت‌های دانمارکی و فرانسوی نسبت به جمعیت ایرانی احتمالاً به دلیل شدت انتخاب در این جمعیت‌ها در مراکز اصلاح نژاد این نژادها در کشورهای مبدا می‌باشد. اما وجود فاصله ژنتیکی بین دو نژاد دانمارکی و فرانسوی می‌تواند احتمالاً به دلیل متفاوت بودن استراتژی انتخاب و نرخ شدت انتخاب در مراکز اصلاح

باربوس را با استفاده از هضم آنزیمی قطعه ۱۰۶۲ جفت بازی سیتوکروم *b* با استفاده از ۱۰ آنزیم برش‌دهنده مطالعه کردند که هیچ‌گونه چند شکلی در بین نمونه‌ها گزارش نکردند.

Fayazi و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه تنوع ژنتیکی باربوس ماهیان سه رودخانه کرخه، کارون و جراحی در جنوب ایران تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در درون جمعیت‌ها به ترتیب از ۰/۳۷ تا ۰/۶۴ و ۰/۰۰۵ تا ۰/۱۲۵ گزارش کردند. Chunyan و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی یک نوع سگ‌ماهی را به وسیله توالی‌یابی کامل ژن سیتوکروم *b* مطالعه کردند و تنوع نوکلئوتیدی را از ۰/۱۶ درصد تا ۱/۲۳ درصد برای درون جمعیت‌ها و از ۰/۱۸ درصد تا ۲/۲۶ درصد بین جمعیت‌ها گزارش کردند. که در مقایسه با نژادهای مورد مطالعه تنوع بیش‌تری در درون و بین جمعیت‌های مشاهده کردند.

در تحقیق حاضر علاوه بر ژن سیتوکروم *b* از جایگاه D-loop میتوکندری نیز استفاده شد. ناحیه به عنوان مارکری در انتخاب، حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها و مطالعه افتراق گونه‌های پرورشی از جمعیت‌های وحشی استفاده می‌شود که تنوع ژنتیکی بالاتر در این ناحیه می‌تواند ناشی از نرخ بالای جهش باشد.

در پژوهش حاضر هیچ‌کدام از آنزیم‌های مورد استفاده برای هضم محصول PCR ژن D-loop میتوکندری، الگوی چند شکلی در بین نمونه‌ها نشان ندادند. Sajedi و همکاران (۲۰۰۳) تنوع ژنتیکی ۳ جمعیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دو هجری مختلف ایران را توسط قطعه D-loop میتوکندری بررسی کردند و الگوی برشی یکسان را با استفاده از ۱۲ آنزیم برشی گزارش دادند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین، Ghotb-Razmjoo و همکاران (۱۹۹۸) در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری با استفاده از ناحیه D-loop و ۱۲ آنزیم برشی، هیچ‌گونه چندشکلی مشاهده نکردند. بر خلاف نتایج این تحقیق، Laloeei و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریاچه خزر با استفاده از جایگاه D-loop و ۱۳ آنزیم برشی در مجموع ۹ هاپلوتیپ را شناسایی و معرفی کردند. Ataei و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه روی جایگاه D-loop میتوکندری میانگین تنوع

که ناحیه سیتوکروم *b* می‌تواند به‌عنوان جایگاهی مناسب برای مطالعه جمعیت‌ها به کار رود. در این تحقیق دو هاپلوتیپ منحصر به فرد برای نژاد دانمارکی شناسایی شد که با تایید نتایج در مطالعه با نمونه‌های بیشتر می‌تواند به‌عنوان نشانگر اختصاصی این نژاد به کار رود.

نژاد این ماهیان و یا به دلیل متفاوت بودن منشا ژنتیکی این نژادها دانست.

نتایج این تحقیق نشان داد که روش PCR-RFLP یک روش مناسب و با حساسیت بالا در مطالعه جمعیت‌های مختلف قزل‌آلا بوده و نتایج این تحقیق براساس چند شکلی‌های حاصل از هضم محصولات PCR در دو ناحیه سیتوکروم *b* و D-loop نشان داد

References

- Ataei, M., Pourkazemi, M., Hasanzadeh Kiabi, B., Sheydaei, M., 2004. Analysis of mtDNA control region polymorphism of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in Sefidrud River and south-east region of Caspian Sea. *Journal of Environmental Sciences* 2, 27-31. (In Persian).
- Avise, J.C., 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Bernatchez, L., 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55, 351-379.
- Blott, S., Williams, J., Haley, C., 1999. Genetics diversity among European cattle breeds. *Animal Genetics* 28, 43-45.
- Brioly, J., Galyiev, N., Brito, R.M., Bouvet, Y., 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 100-108.
- Chunyan, M., Qiqun, C., Qingyi, Z., Ping, Z., Yunlong, Z., 2010. Genetic variation of *Coilia ectenes* (Clupeiformes: Engraulidae) revealed by the complete cytochrome *b* sequences of mitochondrial DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 385, 14-19.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- Fayazi, J., Rahimi, G., Moradi Shahre-Babak, M., Gall-Dari, H., Miraei-Ashtiani, S.R., 2006. Genetic diversity investigation in *Barbus spp* of khozestan, using PCR-RFLP analysis of Mitochondrial DNA. University of Tehran, Iran. (In Persian)
- Gall, G.A.E., Crandell, P.A., 1992. The rainbow trout aquaculture. *Aquaculture*, 100, 1-10.
- Ghotb-Razmjoo, E., Rezvani, S., Ghavam-Mostafavi, P., Fatemi, M., Pourkazemi, M., 1998. The genetical structure of Caspian Sea *Neogobius caspius* Eichwald by PCR-RFLP. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 2, 21-26. (In Persian).
- Gjedrem, T., 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research* 31, 25-33.
- Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A.S., Singh, A., Lal, K.K., Punia, P., Khan, A.A., 2011. Evaluation of cytochrome *b* mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Molecular Biology Report* 38, 841-846.
- Kohout, J., Šedivá A., Apostolou, A., Stefanov, T., Marić, S., Gaffaroglu, M., Šlechtá, V., 2013. Genetic diversity and phylogenetic origin of brown trout (*Salmo trutta*) populations in eastern Balkans. *Biologia, Section Zoology* 68, 1229-1237.
- Kotlik, P., Berrebi, P., 2002. Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic Barb, *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 24, 10-18.
- Lalooei, F., Rezvani, S., Pourkazemi, M., 2002. The genetical structure of Caspian Sea common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) by PCR-RFLP. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 12, 117-130. (In Persian).
- Lalooei, F., Rezvani, S., Neirani, M., Taghavi, M., 2003. The genetical structure of Caspian Sea *Barbus Capito* by PCR-RFLP. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 2, 119-128. (In Persian).
- Li, S., Yang, Q., Cheng, H., 2011. Genetic diversity and variation of mitochondrial DNA in native and introduced Bighead Carp. *Transactions of the American Fisheries Society* 139, 937-946.
- Nei, M., Tajima, F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97, 145-63.
- Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA, 512 p.
- Rychlik, W., 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Molecular Biology* 402, 35-60.
- Sah, S., Barat, A., Pande, V., Sati, J., Goel, C., 2011. Population structure of Indian hill trout (*Barilius bendelisis*) inferred from variation in mitochondrial DNA sequences. *Advances in Biological Research* 5, 93-98.
- Sajedi, R.H., Aminzadeh, S., Naderi, H., Abdolahi, H., 2003. Genetic variation within and among rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, hatchery populations from Iran assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Food Science* 68, 870-873.

- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring Harbor laboratory press. Cold spring Harbor, New York, 2100 p.
- Tajima, F., 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: Takahata, N. and Clark, A.G., (Eds). Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology. Japan Scientific Societies Press, Sinauer associates. Inc., Tokyo, Sunderland, MA, p. 37-59.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.J., Ye, Z., Xiyang, J.M., 2000. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12, 563-584.

