جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تنوع ژنتیکی ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*, Berg 1905) درسواحل جنوب غربی دریای خزر(سواحل جمهوری آذربایجان) و دریاچه سد ارس (شمال غربی ایران) با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP

حسین خارا[۱]، امین کیوان[۲]، محمد پورکاظمی[۳]، غلامحسین وثوقی[۴]، سهراب رضوانی[۵]، شعبانعلی نظامی[۶]، سید احمد قاسمی[۷]، محمد حسن زاده[۸]، محدثه احمدنژاد[۹]، احمدقناعت پرست[۱۰]

۱و۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳، ۷ و۸. انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان ، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

۴. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

۵ و۶. موسسه تحقیقات شیلات ایران ، تهران ، ایران، صندوق پستی ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵۵

۹. پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندرانزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

۱۰. مرکزتکثیر ، پرورش و بازسازی ذخایرماهیان استخوانی شهیدانصاری رشت

h_ khara1974@yahoo.com

چکیده

ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) از جمله ماهیان استخوانی دریای خزر و دریاچه سد ارس می باشد. این ماهی متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است. در طی چند دهه اخیر به دلیل کاهش ذخایر ماهی سیم در سواحل ایرانی دریای خزر، در نتیجه کمبود مولدین و انجام تکثیر مصنوعی از یک جفت مولد سیم نر و ماده در سال ۱۳۶۵، تنوع ژنتیکی این ماهی در سواحل ایرانی دریای خزر به صفر رسیده است. بر این اساس تصمیم بر آن شد تا با وارد کردن ماهی سیم از سواحل جمهوری آذربایجان و دریاچه سد ارس میزان تنوع ژنتیکی ماهی سیم را افزایش دهند. به همین دلیل بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سیم سواحل جنوب غربی دریای خزر (جمهوری آذربایجان) و دریاچه سد ارس ضروری به نظر رسید. برای این منظور در سال ۱۳۸۱ تعداد ۳۰ عدد ماهی سیم از هر یک از دو زیستگاه، صید شده و مورد بررسی ژنتیک مولکولی قرار گرفتند. بدین منظور پس از استخراج DNA به روش فنل ـ کلروفرم از قطعه ای از باله ماهی سیم، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP روی قطعه ای از ژنوم میتوکندریایی به طول ۳۵۰۰bp شامل tRNA-lu ، tRNA-glu ، ND 5/6 و Cyt b مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۱۷ آنزیم مورد استفاده چهار آنزیم *DraI* ، *BCLI* ، *HaeIII*، *BanII* تنوع نشان دادند که در مجموع ۶ هاپلوتیپ مشخص گردید. نمونه های ماهی سیم جنوب غربی دریای خزر (سواحل جمهوری آذربایجان) دارای تنوع بیشتری (۰/۵۸ درصد) نسبت به نمونه‌های ماهی سیم دریاچه سد ارس (۰/۳۵ درصد) بودند. ضمن اینکه نمونه های سواحل جمهوری آذربایجان دارای تمامی ۶ هاپلوتیپ بودند در حالیکه ماهیان سیم دریاچه سد ارس دارای دو هاپلوتیپ بودند. همچنین آنالیز آماری با استفاده از آزمون Monte Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار اختلاف معنی داری را بین ماهیان سیم سواحل جمهوری آذربایجان با ماهیان سیم دریاچه سد ارس نشان می دهد ($P<$ ۰/۰۰۰۱).

کلمات کلیدی: ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*)، دریای خزر، دریاچه سد ارس، جمهوری آذربایجان، تنوع ژنتیکی، RFLP–PCR .

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ماهی سیم با نام علمی (*Abramis brama orientalis*, Berg 1905) متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) و جنس *Abramis* است. این ماهی از جمله ماهیان با ارزش دریای خزر می باشد که اهمیت ویژه ای از لحاظ بوم شناسی، زیست شناسی و اقتصادی دارد. مقدار صید این ماهی در سواحل ایرانی دریای خزر (جنوب دریای خزر) در سالهای صید ۵۹ – ۱۳۵۸ تا حد صفر کاهش یافت (۲). در پی این کاهش ذخایر، شیلات ایران در سال ۱۳۶۵ اقدام به تکثیر مصنوعی یک جفت مولد نر و ماده سیم صید شده از پره های صیادی نمود. سپس تکثیر مصنوعی از طریق نسل های بعدی همان ماهیان مولد حاصل از تکثیر اولیه توسط شیلات ایران ادامه یافت. بطوریکه از آن سال به بعد شیلات ایران هر ساله بیش از ۱۵ میلیون قطعه بچه ماهی سیم به تالاب انزلی رها سازی می نماید که این ماهیان در نهایت وارد دریای خزر می شوند. بطوریکه در سال ۱۳۷۹ میزان صید ماهی سیم در تالاب انزلی به ۵ تن و در دریای خزر به ۲۵ تن بالغ گردید (۶). با توجه به تاریخچه مذکور، بعدها معلوم شد که ماهیان سیم دریای خزر همگی از نسل همان یک جفت مولد ماهی سیم هستند که دارای هم خونی یکسانی می‌باشند (۹). به همین منظور شیلات ایران در سال ۱۳۷۸ تصمیم گرفت که با وارد کردن بیش از یکصد عدد ماهی سیم از سواحل جمهوری آذربایجان (جنوب غربی دریای خزر) اقدام به ایجاد تنوع ژنتیکی ماهی سیم در ایران بنماید. از طرفی در دریاچه سد ارس (شمال غربی ایران) ماهی سیم از فراوانترین ماهیان این دریاچه است (۴) که می تواند برای بهبود ذخایر ژنتیکی ماهی سیم در سواحل ایرانی دریای خزر استفاده نمود.

پس از وارد کردن ماهی سیم جمهوری آذربایجان به ایران، مطالعات اولیه بررسی ژنتیک مولکولی بر روی ۱۵ عدد ماهی سیم ایران (سواحل خزر) از ماهیان مولد موجود در کارگاه تکثیر و پرورش شهید انصاری رشت و ۱۵ عدد ماهی سیم جمهوری آذربایجان انجام گرفت که با استفاده از روش RFLP دو آنزیم *BanII* و *HaeIII* را به عنوان آنزیم های جدا کننده دو جمعیت معرفی شد (۱۱). این در حالی است که بررسی های ژنتیک مولکولی روی ماهی سیم (*A. brama*) در رودخانه مین و دانوب (۱۲) و رودخانه الب (۱۵) در آلمان وجود چند جمعیت درون گونه ای را در این ماهی تأیید کرده است. در ایران نیز از روش PCR-RFLP در آبزیان استفاده شده است. از جمله می توان به بررسی تنوع تاس ماهی روس (۱۴)، بررسی تنوع تاس ماهی روس و ازون برون (۱۳)، بررسی تنوع ژنتیکی سس ماهی(*Barbus capito*) (۱۰) ، بررسی تنوع ژنتیکی ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان (۳)، بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی(۱)، بررسی تنوع تاس ماهی ایرانی(۷) و بررسی تنوع ماهی شیپ (۸) اشاره کرد.

به همین دلیل بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سیم در سواحل جنوب غربی دریای خزر (جمهوری آذربایجان) و دریاچه سد ارس در سال ۱۳۸۱ ضروری بنظر رسید.

مواد و روش ها

جهت بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سیم در سواحل جنوب غربی دریای خزر و دریاچه سد ارس در سال ۱۳۸۱ تعداد ۳۰ عدد ماهی سیم از هر یک از دو منطقه مذکور انتخاب شدند. پس از صید، تکه ای از بافت نرم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

باله های ماهی سیم بریده و پس از فیکس در الکل مطلق به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA ژنومی (کل) با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از بافت باله به روش فنل-کلروفرم (۱۳) انجام و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روشهای اسپکتروفتومتری و الکترفورزی تعیین گردید.

واکنش زنجیره پلیمراز برای ناحیه ای از ژنوم میتوکندری شامل tRNA-lu, ND5/6 and Cyt b، tRNA-glu با استفاده از دو جفت آغازگر طراحی شده برای این ناحیه انجام گرفت.

آغازگر۱: ´۳- CAT CCG TTG GTC ´۵-TTA GGA ACC

۶۵/۵ درجه سانتی گراد = t_m ترمودینامیکی

۵۷/۹ درجه سانتی گراد = t_m

آغازگر۲: ´۳- GCT TTG TTT TCC ATT ´۵-CAC CC

۶۳/۹ درجه سانتی گراد = t_m ترمودینامیکی

۵۶/۳ درجه سانتی گراد = t_m

برای واکنش زنجیره ای پلیمراز هر یک از نمونه‌ها با غلظت موادی شامل ۲۰ نانوگرم DNA، ۲ U DNA پلیمراز (Cinnagen)، ۲/۵ mM MgCl2 (Cinnagen)، 200 µM dNTPs (Pharmasia)، ۲۰ پیکو مول از هر آغازگر(IBM)، در بافر PCR با غلظت 1X (Cinnagen)آماده گردید و برنامه ترموسایکلر به صورت ۹۴ درجه ۴ دقیقه، ۹۴درجه ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه ۱/۵ دقیقه و ۷۲ درجه ۱۲۰ثانیه، با سی سیکل انجام شد. سپس محصول PCR با اندازه ۳۵۰۰ جفت باز با استفاده از ۱۷ آنزیم برشگر(*BclI , DdeI , JaeIII , Hinf 61 , XhoI , SmaI , SalI , KpnI , BglI , Cfr13I , PstI , DraI , MspI , BanII (Ecoa241, FunDII (Bsh12361), TasI (TspeI) , TruII (Mse I)*) در محلول واکنش (۲میکرولیتر بافر ، ۱ میکرولیتر آنزیم و ۵ میکرولیتر محصول PCR) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (بجز برای آنزیم های *TaqI, BclI, TasI, Tru1I, TaiI,*) انکوباسیون گردید.

محصول هضم شده ژن tRNA-lu ، tRNA-glu، ND 5/6 و Cyt b در روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد الکتروفورز گردید. باندهای بوجود آمده پس از هضم آنزیمی با استفاده از نشانگر bp ۱۰۰ اندازه‌گیری شدند و بر اساس اینکه هر نمونه دارای چه ژنوتیپی بود با استفاده از حروف الفبای بزرگ A, B... و هاپلوتیپ هر نمونه بصورت توالی از این حروف معین گردید. آنالیز توسط نرم افزار رایانه‌ایReap انجام گرفت. در این برنامه میزان ارتباط هاپلوتیپ ها با استفاده از آزمون DSE و مقایسه پراکنش هاپلوتیپ ها با استفاده از آزمون Monte - Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام شد.

نتایج

بررسی محصول PCR مربوط به ۱۲۰ نمونه ماهی سیم با دو آغازگر مزبور، بر روی ژل اگارز ۱/۵٪ نشان دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول bp ۳۵۰۰ بود که ۲۵۰۰ جفت باز آن مربوط به ناحیه ND5/6 و ۱۰۰۰ جفت باز آن مربوط به ژن cytb بر روی mtDNA می باشد. از ۱۷ آنزیم برشگر استفاده شده، چهار آنزیم *HaeIII*، *BanII (Eco241)*، *BCL I* و *Dra I* در بین نمونه های سواحل جمهوری آذربایجان پلی مورفیسم را نشان دادند بدین ترتیب که

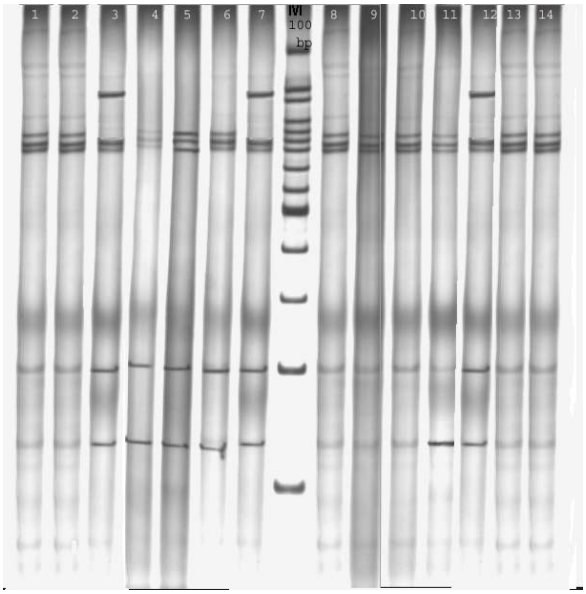
هر چهار آنزیم فوق دو ژنوتیپ متفاوت در ماهیان سیم سواحل جمهوری آذربایجان ایجاد کردند. در حالیکه در ماهیان دریاچه سد ارس تنها آنزیم *DraI* چنین تفاوتهایی را نشان داد و آنزیمهای دیگر فاقد تنوع بودند. تعداد ۵ آنزیم فاقد محل برش در این قطعه تکثیر شده ماهی سیم بودند. ۱۰ آنزیم دیگر در تمامی افراد الگوی منومورفیک را نشان دادند. در جدول ۱ تعداد و طول قطعات ایجاد شده توسط ۱۷ آنزیم برش‌دهنده آمده است.

جدول۱: تعداد و طول قطعات ایجاد شده توسط آنزیم های برشگر

آنزیم برشگر	محل برش	تعداد قطعه ایجاد شده	تعداد باز بررسی شده	طول قطعات بر حسب bp
BclI	TGATCA	۴	۱۸	۴۱۵-۵۴۰-۷۸۰-۱۷۵۰
HaeIII	GGCC	۶	۲۰	۱۳۰-۱۸۵-۷۶۰-۸۱۰-۸۹۰
MspI	CCGG	۷	۲۴	۱۰۷-۲۷۳-۴۴۸-۵۴۵*-۹۵۱
HinfI	GANTC	۲	۵	۶۲۰-۲۸۸۰
BanII(Eco24I)	GRGCYC	۴	۱۸	۶۰-۵۴۰-۷۶۰-۲۱۴۰
SmaI	CCCGGG	۱	۰	۳۵۰۰
KpnI	GGTACC	۱	۰	۳۵۰۰
BglI	GCCNNNNNGGC	۳	۱۲	۴۱۵-۵۷۵-۲۵۱۰
Cfr13I	GGNCC	۴	۱۵	۳۴۰-۷۸۰-۱۰۸۰-۱۳۰۰
PstI	CTGCAG	۲	۶	۱۹۰۰-۱۶۰۰
DraI	TTTAAA	۲	۶	۱۳۶۵-۱۱۳۵
XhoI	CTCGAG	۱	۰	۳۵۰۰
SalI	GTCGAC	۱	۰	۳۵۰۰
DdeI	CTNAG	۸	۳۵	۱۳۲-۱۵۶-۱۷۶-۲۵۵-*۳۸۵-۷۵۲-۱۳۲۶
FunDII(Bsh1236I)	CGCG	۱	۰	۳۵۰۰
TasI(TspEI)	AATT	۱۸	۶۸	-۲۰۳-۲۲۴-۲۴۹-۳۱۳-۳۲۸-۳۶۰-۵۵۰ -۱۱۰-۱۱۶-۱۵۲-۱۳۶-۱۵۲-۱۶۲-۱۸۷ ۳۵-۶۵-۸۰-۱۰۵
Tru1I(MseI)	TTAA	۱۲	۴۴	-۱۷۵-۱۸۵-۳۴۰-۳۹۰-۴۲۰-۴۵۰-۵۴۰* ۹۰-۱۱۰-۱۲۵-۱۲۵-۱۴۰

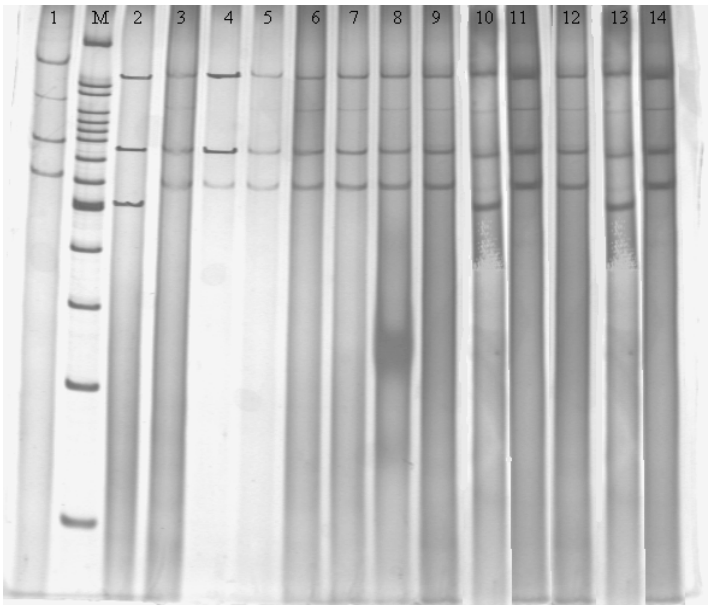
با بکار بردن ۱۷ آنزیم مذکور با توجه به تعداد باندهای ایجاد شده و مکان برشی هر آنزیم تعداد ۲۷۱ نوکلئوتید مورد بررسی قرار گرفت که ۸٪ از ژن مورد نظر و ۱/۷ درصد از کل ژنوم میتوکندریائی ماهی سیم می باشد.

نتایج حاصل از برش آنزیمی نشان می دهد که آنزیم *HaeIII* دو ژنوتیپ متفاوت را ایجاد می کند، که با حروف B و A مشخص گردیدند. ژنوتیپ A دارای الگوی مشابه و متداول در بین افراد می باشد. این ژنوتیپ دارای باندهای به طول های ۱۳۰-۱۸۵-۷۶۱-۸۱۰-۸۹۰ می باشد و ژنوتیپ B دارای باندهائی به طول ۱۳۰-۱۸۵-۷۶۱-۸۱۰-۱۶۶۰ که مجموع آنها bp ۳۵۰۰ می باشد. درژنوتیپ B یک ناحیه برشی برای آنزیم برشگر *HaeIII* (GGCC) از بین رفته است (شکل ۱).



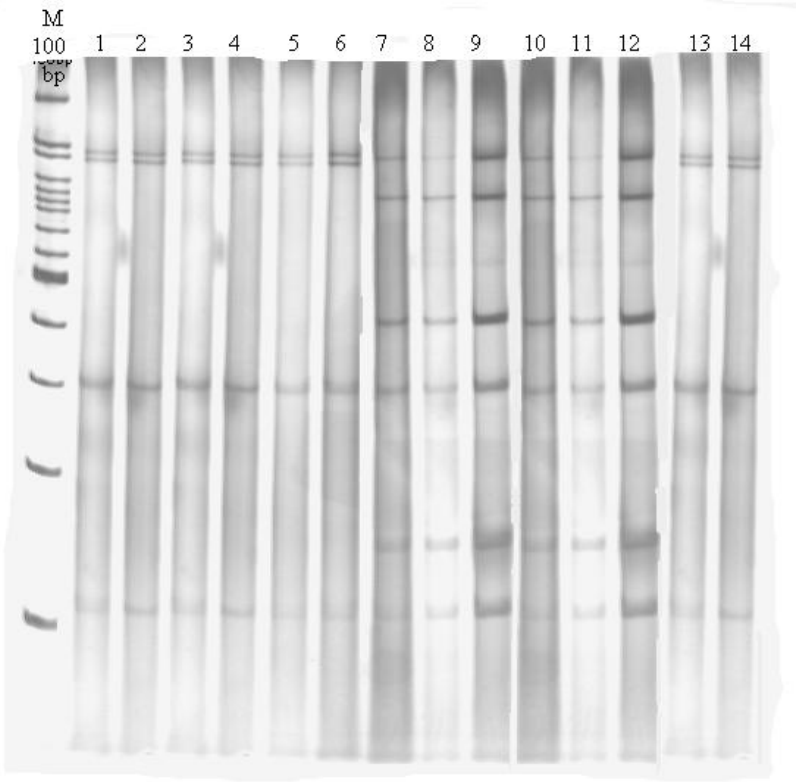
شکل۱: الگوی برشی محصول PCR توسط آنزیم *HaeIII* (شماره های ۳،۷ و ۱۲ ژنوتیپ B بقیه ژنوتیپ A)

آنـزیم برشـگر *Eco24I* دو ژنوتیـپ B و A را نشان داد. ژنوتیپ A دارای ۳ قطعه شـامل ۲۱۶۰-۷۶۰-۶۰۰ جفت باز ولی ژنوتیپ B دارای ۴ قطعـه اسـت کـه یک جایگاه جدید در قطعه ۶۰ ایجاد شد (شکل ۲).



شکل ۲: الگوی برشی محصول PCR توسط آنزیم *BanII (Eco24I)* (۲-۱۰-۱۳ ژنوتیپ B بقیه ژنوتیپ A)

آنـزیم برشـگر *DraI* دو ژنوتیـپ B, A را تولیـد کرد، ژنوتیپ A دارای۳ جایگاه برشـی بـر روی قطعـه مـورد نظـر بـود. در مقابـل ژنوتیـپ B دارای ۵ جایگـاه برش و ۶ قطعه مـی باشـد. ژنوتیـپ B داری دو جایگـاه بیشتر از ژنوتیپ A است، این آنزیم در نمونه های ارس تنوع را نشان می دهد (شکل ۳) .



شکل ۳- الگوی برشی محصول PCR توسط آنزیم *DraI* (۱۲-۷ ژنوتیپ B بقیه ژنوتیپA)

با توجه به الگوی بانـدهای بدسـت آمـده در روی ژل، الگوئی که فراوانی بیشتری داشت به عنوان ژنوتیپ A و بعد از آن ژنوتیپ B در نظر گرفته شد(جدول ۲). ترکیب هاپلوتیپ ها بوسیله ادغام ژنوتیپ های مختلـف هر آنزیم برشگر برای هر فرد بدست آمد. بـا اسـتفاده از آنالیز RFLP محصـول تکثیـر شـده میتوکنـدریایی در مجموع ۶ هاپلوتیپ مختلف در بین ۶۰ عدد ماهی سـیم از نــواحی ســواحل آذربایجــان و دریاچــه ســد ارس مشخص گردید (جـدول۳). هاپلوتیـپ هـای AAAA دارای ۸۰ درصـد فراوانـی رایـج تـرین هاپلوتیـپ هـا و هاپلوتیپ ABAA با فراوانی ۰/۸٪ به عنوان هاپلوتیـپ های نادر بودند. ماهیان سیم منطقـه آذربایجـان دارای ۶ نوع هاپلوتیپ بودند، در حالیکه ماهیان سیم دریاچه سد ارس دارای دو نـوع هاپلوتیـپ AAAA و AABA بودند.

جدول۲: الگو و اندازه قطعات هضم شده توسط پنج آنزیم برشگرپلی مرف (اندازه تمامی قطعات براساس هضم محصول PCR، ۳۵۰۰ bp محاسبه شده است)

Eco24I		*HaeIII*		*DraI*		*BclI*	
A	B	A	B	A	B	A	B
۲۱۴۰	۲۱۴۰	–	۱۶۶۰	۱۶۲۰	۱۶۲۰	۱۷۵۰	۱۷۵۰
۷۶۰	۷۶۰	۸۹۰	–	۱۴۹۰	–	۱۷۵۰	–
۶۰۰	–	۸۱۰	۸۱۰	–	۹۳۵	–	۷۸۰
–	۵۴۰	۷۶۰	۷۶۰	–	۴۰۹	–	۵۴۰
–	۶۰	۷۶۰	–	۲۸۵	۲۸۵	–	۴۱۵
		۱۸۵	۱۸۵	–	۱۴۶		
		۱۳۰	۱۳۰	۱۰۵	۱۰۵		

جدول ۳: الگوی هاپلوتیپ های بدست آمده توسط چهار آنزیم (حروف بیانگر ژنوتیپ حاصل از هر آنزیم می باشند)

آنزیم برشی	هاپلوتیپ ها					
	AAAA	BAAA	ABAA	AAAB	AABA	BBAA
Eco24I	A	B	A	A	A	B
HaeIII	A	A	B	A	A	B
DraI	A	A	A	A	B	A
BclI	A	A	A	B	A	A

آزمون DSE برای محاسبات مربوط به میزان ارتباطات بین ۶ هاپلوتیپ مختلف انجام گرفت. بر طبق این آزمون (DSE) بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیت های BBAA با AABA, AAAB به میزان ۲/۳۴ درصد و کمترین اختلاف نوکلئوتیدی در بین هاپلوتیپ AAAA با AABA , AAAB به میزان ۰/۸۱۵ می باشد. کمترین Sd.E به میزان ۰/۰۰۹۴ بین هاپلوتیپ های AAAA با AAAB و AABA و بیشترین Sd.E به میزان ۰/۰۲۲۹ در بین هاپلوتیپ BBAA با AAAB و AABA می باشد. در تمامی موارد میزان Sd.E کمتر از اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ ها می باشد. در جدول ۴ مقادیر مربوط به اختلاف نوکلئوتیدی و میزان .SdE آمده است. در این بررسی تعداد چهار آنزیمی که تنوع را نشان دادند، بطور متوسط در هر هاپلوتیپ ۱۲/۳۳ قطعه را ایجاد کردند و اختلاف ۰/۷۴ باز را مشخص می کنند.

جدول ۴: درصد اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ های مختلف حاصل از چهار آنزیم برشگر (مثلث پایین) و میزان SdE (مثلث بالا)

هاپلوتیپ	AAAA	BAAA	ABAA	AAAB	AABA	BBAA
AAAA		۰/۰۱۹۴	۰/۰۰۹۲	۰/۰۰۹۴	۰/۰۰۹۴	۰/۰۲۱۷
BAAA	۰/۷۹۲		۰/۰۲۱۷	۰/۰۲۰۹	۰/۰۲۰۹	۰/۰۰۹
ABAA	۰/۶۶۸	۰/۱۴۷		۰/۰۱۲۸	۰/۰۱۲۸	۰/۰۲۰۱
AAAB	۰/۸۱۵	۰/۱۵۳	۰/۱۶۱		۰/۰۱۲۳	۰/۰۲۲۹
AABA	۰/۸۱۵	۰/۱۵۳	۰/۱۶۱	۰/۱۶۸		۰/۰۲۲۹
BBAA	۱/۱۴۶	۰/۶۳۷	۰/۸۵۲	۲/۳۴۴	۲/۳۴۴	

میانگین تنوع نوکلوتیدی و هاپلوتیپی در درون و بین مناطق مختلف نمونه گیری (Mean ± SE) محاسبه گردید. بطوریکه میانگین تنوع هاپلوتیپی در نمونه های آذربایجان به میزان ۰/۰۴۴ ± ۰/۸۰ و در نمونه های دریاچه سدارس ۰/۰۹۱ ±۲/۳۹ بود. میانگین تنوع هاپلوتیپی محاسبه شده در ۶۰ عدد ماهی سیم آنالیز شده مناطق مختلف ۰/۰۳۵±۲/۵۹ می باشد.

میانگین تنوع نوکلئوتیدی در کل نمونه ها ۰/۲۳ درصد می باشد، که میانگین تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های سواحل آذربایجان به میزان ۰/۵۸ ودرنمونه دریاچه سدارس۰/۳۵ محاسبه گردید(جدول ۵).

جدول ۵: درصد تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در مناطق نمونه برداری

تنوع / مناطق	تنوع هاپلوتیپی (درصد)	تنوع نوکلئوتیدی (درصد)
سواحل آذربایجان	۸/۰۰ ± ۰/۰۴۴	۰/۵۸۰
دریاچه ارس	۲/۳۹ ±۰/۰۹۱	۰/۳۵
میانگین	۲/۵۹ ±۰/۰۳۵	۰/۲۳۳

محاسبات اختلاف نوکلئوتیدی بین دو منطقه نشان می دهد که اختلاف نوکلئوتیدی ۰/۵۲۸ درصد و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۶ درصد است.

آزمون ناهمگنی جغرافیائی با توجه به فراوانی و ترکیب هاپلوتیپ ها بوسیله آزمون Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار در بین نمونه های دو منطقه مختلف محاسبه گردید (جدول ۶). میزان X^2 نشاندهنده اختلاف معنی داری در توزیع هاپلوتیپ ها در بین جمعیت های دو منطقه بود. به عبارت دیگر جمعیت آذربایجان از نمونه های ارس جدا می باشد.

جدول ۶: مقادیر X^2 و p دومنطقه

مناطق	آذربایجان	ارس
آذریایجان		۲۱
ارس	$P \leq 0.001$	

بحث

بر طبق نتایج بررسیهای انجام شده در این تحقیق با استفاده از روش PCR- RFLP مشخص شد که از ۱۷ آنزیم بکار رفته چهار آنزیم *BanII, HaeIII, BcII, DraI* در بین ماهیان سیم دومنطقه تنوع نشان دادند. بدین نحو که این چهار آنزیم در ماهی سیم سواحل آذربایجان تنوع نشان دادند، در حالی که در ماهیان سیم سد ارس تنها آنزیم *DraI* چنین تفاوتهایی را نشان داد و آنزیمهای دیگر فاقد تنوع بودند. از طرفی دیگر به کمک روش PCR-RFLP و با استفاده از دو آنزیم پلی مرف *HaeIII , BanII* توانستند تنوع را در ماهیان سیم سواحل جمهوری آذربایجان بخوبی آشکار سازد و این ماهی را از ماهیان سیم مولد موجود در کارگاه تکثیر و پرورش شهید انصاری رشت تفکیک نماید (۱۱).

البته این دو آنزیم در ماهیان سیم مولد موجود در کارگاه تکثیر وپرورش شهید انصاری رشت هیچ گونه تنوعی را نشان ندادند که با نتایج محققین دیگر مبنی برهم خون بودن ماهیان سیم این کارگاه مطابقت دارد (۹). دلیل چنین پدیده ای به تاریخچه تکثیر مصنوعی سیم در سال ۱۳۶۵ بر می گردد، که در آن سال با استفاده از یک جفت مولد سیم صید شده از سواحل ایرانی دریای خزر(گیلان) اقدام به تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر سیم نمودند و تمامی ماهیان سیم موجود در تالاب انزلی و سواحل ایران حاصل از تکثیر آن یک جفت مولد می باشند (۵). این در حالی است که ماهی سیم سواحل جمهوری آذربایجان بدلیل عدم کاهش جمعیت تنوع جمعیتی خوبی را نشان می دهد. البته لازم به ذکر است که در این مطالعه ۶ هاپلوتیپ بدست آمد که هاپلوتیپ AAAA در دو منطقه غالب بود. در حالی که در مطالعه قبلی هاپلوتیپ AA برای نمونه‌های ماهیان سیم مولد کارگاه شهید انصاری و هاپلوتیپ BB برای نمونه های آذربایجان غالب بودند (۱۱).

بنابراین استفاده از ماهیان سیم سواحل جنوب غربی دریای خزر(سواحل جمهوری آذربایجان) جهت بهبود تنوع ژنتیکی ماهیان سیم سواحل ایران پیشنهاد می‌گردد. ضمن اینکه بدلیل پایین بودن تنوع ژنتیکی در ماهیان سیم دریاچه سد ارس پیشنهاد می شودکه ماهیان سیم این دریاچه با ماهیان سیم سواحل جمهوری آذربایجان تلاقی داده شوند.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر خانی پور ریاست محترم مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر و سایرکارشناسان آن مرکز،کارشناسان انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتردادمان رشت، جناب آقای دکتراصفهانی، جناب آقای دکترسمیع زاده، جناب آقای دکتر مشایخی، سرکارخانم دکتر صالحی، جناب آقای مهندس محمدرضا نوروز فشخامی، جناب آقای مهندس فریدون چکمه دوز، جناب آقای مهندس شهروز برادران نویری، جناب آقای مهندس مرتضی حسین زاده، سرکار خانم مهندس مهتاب یارمحمدی، جناب آقای مهندس سعید قلی پور، جناب آقای مهندس ابوالفضل جوادی، سرکار خانم صفیه علیپور و دیگر همکاران نهایت سپاس و تشکر را داریم.

منابع

۱. امین زاده، س. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان در قطعه ND5/6 ژنوم میتوکندریائی به روش PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۱ صفحه.

۲. حسینی ،س. ا و سیرنگ ، هـ . ۱۳۶۹ . ماهی سیم . انتشارات مرکز تحقیقات شیلات گیلان، بندر انزلی. ۱۲۲ صفحه.

۳. ساجدی، ر. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی در ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان با استفاده از تکنیک PCR-RFLP روی ژنوم میتوکندری. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس.۶۷ ص.

۴. سرپناه ، ع . ن . ۱۳۸۰ . پایش (مونیتورینگ) دریاچه سد ارس ، مطالعات ماهی شناسی. مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر ، بندر انزلی. ۷۳ صفحه .

۵. شریفی ، ع . ا و رامین ، م . ۱۳۷۰ . بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی سیم . مجموعه گزارشهای علمی تهیه شده در مرکز تحقیقاتی شیلات ، دفترا ، صفحات ۶۱ – ۳۵ .

۶. صیاد بورانی ، م . ۱۳۷۹ . نقش رها سازی بچه ماهی سیم در احیاء ذخایر این ماهی . مجله علمی شیلات ایران . سال نهم ، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۷۹ . صفحات ۳۹ ـ ۲۷.

۷. عطائی، ف. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفید رود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی.۱۵۷ص.

۸. قاسمی ،س . ا . مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) درسواحل جنوبی دریای خزر ورودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا . دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده علوم دریایی نور.۷۳ صفحه.

۹. گلشاهی، ع . ۱۳۷۶ . تعیین همخونی مولدین ماهی سیم در کارگاههای تکثیر و پرورش . پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال ، دانشکده علوم و فنون دریایی. ۵۰ صفحه.

۱۰. لالوئی، ف. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استانهای گیلان ومازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد.۹۸ صفحه.

۱۱. محمدی، م. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی DNA میتوکندری (mtDNA) درماهی سیم به روش PCR-RFLP روی قطعه ای ازژنوم میتوکندری. پایان نامه گارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم- دانشگاه تربیت مدرس، ۷۹ص.

12. Fuchs, H; Gross, R; Stein, H and Rottmann, O. 1998. Application of molecular genetic markers for the differentiation of bream (*Abramis brama* L.) populations from the rivers main and Danube. Journal – Ichthyology. vol. 14, no. 1 – 2. pp. 49 – 55.

13. Pourkazemi, M. 1996. Molecular and Biochemical Genetic analysis of sturgeon stock from the South Caspian Sea. Ph. D. Thesis, School of Biological Sciences, university of Wales, Swan Sea. Chapter: 88: 188-211.

14. Rezvani, G. S. 2002. Study of mtDNA variation of Russian Sturgeon population from the southern Caspian Sea using RFLP analysis of the PCR amplified ND5/6 gene region. Iranian J. of Fisheries Sciences. 2(1): 13-36.

15. Wolter, C; Kirschbaum, F. and Ludwig, A. 2003. Sub-population structure of common fish species in the Elbe River estimated from DNA analysis. J. Applied. Ichthyology. Blackwell Verlage, Berlin. n. 19. pp. 278-283.