ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۴۸- ۳۴۱

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گل چراغ *Garra rufa* (Heckel, 1843) استان فارس با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Study of genetic diversity of *Garra rufa* (Heckel, 1843) in Fars province using microsatellite markers

قاسم عسکری*[۱]، علی شعبانی[۱]، حمیدرضا رضایی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Askari Gh*[1], Shabani A[1], Rezaei HR[1]

1. MSc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:askarighasem82@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

Garra rufa **متعلق به خانواده کپور ماهیان و از گونه‌های مهم اکولوژیک رودخانه‌ای می باشد. در این مطالعه از شش جایگاه میکروساتلایت جهت بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Garra rufa* در دو رودخانه فهلیان و سرآب بهرام استان فارس استفاده شد. در این بررسی از ۵۶ نمونه (۲۸ عدد برای هر رودخانه) استفاده شد. میانگین تعداد الل در سطح جمعیت‌ها ۱۱/۴۱ بود که از میانگین گزارش شده برای ماهیان آب شیرین بالاتر بود. میانگین هتروزیگوسیتی به ترتیب ۰/۴۹۷ و ۰/۸۴۷ بدست آمد. تقریبا تمامی جایگاه‌های ژنی انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ را نشان دادند. با توجه به میزان جریان ژنی بالا (Nm= ۱۷/۲۱۲) بین دو منطقه و F_{st} پایین (F_{st} = ۰/۰۲) به نظر می‌رسد تمایز پایینی بین جمعیت‌های این گونه در مناطق مورد بررسی وجود دارد. بر اساس تجزیه‌های موجود به نظر می‌رسد، گونه *Garra rufa* دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی در مناطق مورد بررسی بود.**

واژه‌های کلیدی

استان فارس
تنوع ژنتیکی
میکروساتلایت
DNA
Garra rufa

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) با ۲۲۰ جنس و در حدود ۲۴۲۰ گونه بزرگترین خانواده در بین مهره‌داران می‌باشند (Coad 2009). ماهی گل چراغ با نام علمی *Garra rufa* متعلق به خانواده کپور ماهیان می‌باشد. این گونه از گونه‌های معمول در نهرها و رودخانه‌های غرب و جنوب غرب ایران و همچنین در حوضه های دجله و فرات، سیحون، رودخانه عاصی در ترکیه یافت می شود (Coad 2009)، اما زیستگاه اصلی این گونه در ایران می باشد. این گونه دماهای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و بالاتر را ترجیح می‌دهد، و در رودخانه‌ها بر روی سطح سنگ‌ها از فیتوپلانکتون‌ها و تا حد کمی از حشرات آبزی تغذیه می‌کنند و در زیر سنگ‌ها و قلوه سنگ‌ها در بستر رودخانه قرار می‌گیرند. این ماهی یکی از گونه‌های مهم اکولوژیک اکوسیستم بوده، و به پالایش رودخانه‌ها کمک می‌کند (Coad 2009). همچنین دارای ارزش درمانی در درمان بیماری‌های پوستی می‌باشد (Sayili et al. 2007).

درک ساختار ذخایر ماهیان یکی از پارامترهای مهم و اساسی در دستیابی به مدیریت پایدار زیست شناختی، شیلاتی و ژنتیکی است (Shaklee and Currens 2003). ساختار ذخایر در گذشته به وسیله پارامترهای فنوتیپی ماهیان نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف مانند تعداد باله‌ها، اندازه، سن بلوغ و خصوصیات مریستیک تعیین می‌شد (Hartl 2000)، اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و آثار منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین، محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده از مارکرهای مولکولی، همچون ریزماهواره‌ها، آلوزایم و RAPD[1] برای شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت (Verspoor and Jordan 1989). ژنتیک مولکولی به عنوان ابزاری مدرن، توانایی شناسایی و تعیین ساختار ذخایر ماهیان را دارد (Magoulas 2005). در میان نشانگرهای رایج DNA که می‌توان از آنها برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی استفاده کرد، نشانگرهای ریزماهواره حاوی اطلاعات مفیدتر و پلی‌مورفیسم بیشتری می‌باشند. نشانگرهای ریزماهواره به علت 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 دارای کاربرد گسترده‌تری هستند (Chen et al. 2008).

یکی از مشکلات امروز ذخایر آبزیان در دنیا، کاهش تنوع ژنتیکی است که بر اثر فعالیت‌های متعدد بشر، اعم از ایجاد آلودگی‌ها، صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه، مسدود کردن مسیر مهاجرت اتفاق می‌افتد (Ferguson et al. 1995; Zhao et al. 2005). تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند، بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al. 1996). نشانگرهای مولکولی به طور مستقیم قادرند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (Ferguson et al. 1995). تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در میان افراد حاصل می‌شود (Utter 1991). به طور کلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است (Pujolar et al. 2009). علیرغم اهمیت بسیار بالای اکولوژیکی و درمانی ماهی گل چراغ، تاکنون هیچ تحقیقی در مورد ساختار ژنتیکی و جمعیت شناسی این گونه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در سطح جهان صورت نگرفته است. به همین منظور در این تحقیق از ۶ جایگاه ریزماهواره برای بررسی ساختار ژنتیکی این گونه در دو رودخانه فهلیان و سرآب بهرام استان فارس استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA

تعداد ۵۶ عدد ماهی از دو رودخانه فهلیان و سرآب بهرام استان فارس (شکل ۱) (۲۸ عدد برای هر رودخانه) در آذرماه سال ۱۳۹۰ صید شد. نمونه‌برداری بصورت کاملا تصادفی در رودخانه صورت گرفت. به‌منظور استخراج DNA از بافت باله نمونه‌برداری شد. تمامی نمونه‌ها کدبندی و در اتانول ۹۶ درصد فیکس شد و در نهایت به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد (Hillis et al. 1996). DNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر

[1] Random amplified polymorphic DNA

Archive of SID
www.SID.ir

استریل تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی بوسیله ژل آگارز یک درصد و روش اسپکتروفتومتری تعیین شد (Sambrook et al. 1989).

شکل۱- موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری

تجزیه مولکولی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گل چراغ از شش جایگاه ریزماهواره MFW17 (Crooijmans et al. 1997)، GGM023b، GGM 024، GGM 007، GGM-045، GGM 027 (Matura et al. 2011) استفاده شد (جدول۱). واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام و بهترین دمای الحاق برای هر یک مشخص شد. تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری و شرایطی شامل ۲۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین المللی تگ DNA پلیمراز، بافر 1X PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم انجام شد. سیکل دمایی برای هر جایگاه عبارت بود از ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای یک دقیقه، با یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۳ دقیقه. محصول زنجیره پلی‌مراز بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد (غیر یونیزه شده) جداسازی و بوسیله روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (Bassam et al. 1991). ژل رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل مورد عکسبرداری قرار گرفت و بوسیله نرم افزار Gel pro analyzer طول قطعات باندها محاسبه شد.

تجزیه آماری

تعداد الل در هر جایگاه ژنی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، تعداد الل‌های واقعی (Na)، تعداد الل موثر (Ne)، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر Fst، تست معنی‌دار بودن احتمال کسری هتروزیگوسیتی یا زیاد بودن هتروزیگوسیتی نیز از نرم افزار و جریان ژنی با استفاده از نرم افزار Genealex ver.6.5 (Peakall and Smouse 2012) محاسبه شد. برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، مورد انتظار (He) و تنوع آللی از آزمون ویلکاکسون غیر پارامتریک در نرم افزار SPSS ver.16 (Zar 1999) استفاده شد. برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی بر اساس مدل اللی بی‌نهایت (Fst) با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزار Genealex ver.6.5 مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی (Nei 1978) و رابطه فیلوژنیک جمعیت‌ها از نرم افزار PopGene استفاده شد (Yeh et al. 1999).

نتایج و بحث

با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه ژنوم این گونه، در این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت با استفاده از ۲۰ جفت آغازگرهای غیراختصاصی متعلق به خانواده کپور ماهیان پرداخته شد، که از این تعداد ۶ جفت از نشانگرهای مورد استفاده تولید باند پلی‌مورف نمودند (جدول۱). در سطح شش جایگاه ژنی مورد بررسی، بیشترین میزان الل مشاهده شده در سطح جایگاه GGM 024 و GGM 027 در جمیعت رودخانه سرآب بهرام، و کمترین میزان الل مشاهده شده در سطح جایگاه GGM023b در هر دو جمعیت مشاهده شد. تعداد متوسط الل مشاهده شده و موثر در جمعیت یک (رودخانه فهلیان) به ترتیب ۱۱، ۶/۸۶۶ و برای جمعیت دو (رودخانه سرآب بهرام) به ترتیب ۱۱/۸۳۳، ۷/۵۷۸ بدست آمد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و

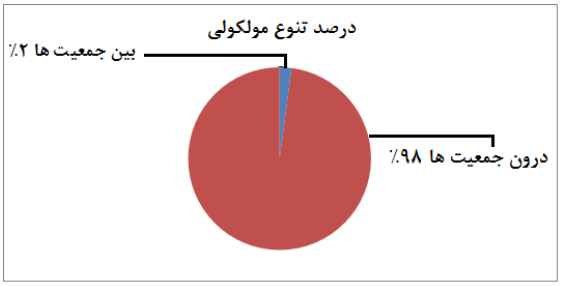
Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- خصوصیات جایگاه ژنی مورد استفاده در این تحقیق

جایگاه ژنی	وزن (جفت باز)	تعداد الل	آغازگر (′3-′5)	دمای اتصال °C
MFW17	۱۱۲ – ۲۳۲	۱۱	F: CTCAACTACAGAGAAATTTCATC R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	۵۵
GGM023b	۹۶ – ۱۳۶	۸	F:TCACCATCCACTGAAGACCA R:GAAATATGTAACGTCATTAATTGTGTG	۶۰
GGM 024	۱۲۸ – ۲۰۸	۱۵	F:TCCCTCTTTTTGCTCTCAGG R:TAGGTGAACAAATGGCATGG	۵۴
GGM007	۲۳۲ – ۳۰۰	۱۳	F:GCTGTGCTGACTGGCACTT R:CAAACCAACATTTCATCAAAAA	۵۵
GGM-045	۱۵۲ – ۲۰۰	۱۱	F:TCTCATGGGTCTCTGGGTTC R:TGTGCAGAAAGGCTGTTGAG	۵۶
GGM 027	۱۷۶ – ۲۵۲	۱۳	F:TCGGTGCACCCCTAGTAAAC R:CCAAGTGTGTGTTTGGATGG	۵۴

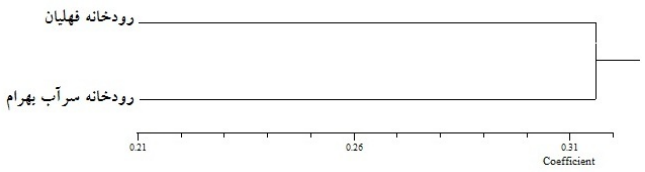
مورد انتظار (He) به ترتیب ۰/۴۹۷ و ۰/۸۴۷ بدست آمد، که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت یک و دو به ترتیب ۰/۴۸۲ و ۰/۵۱۲ محاسبه شد (جدول۲).

نتایج مربوط به بررسی تعادل هاردی – واینبرگ در جدول۲ آورده شده است. از ۱۲ تست مورد بررسی (۶ جایگاه × ۲ منطقه) ۱۱ تست بطور معنی‌داری انحراف از تعادل را نشان دادند ($P \leq$ ۰/۰۵). متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) و جریان ژنی به ترتیب ۰/۴۱۶ و ۱۷/۲۱۲ را نشان داد. میزان شاخص‌های F_{st} و R_{st} بر اساس تجزیه واریانس مولکولی از نظر تمایز در بین مناطق مورد بررسی به ترتیب ۰/۰۲۰ و ۰/۰۲۸ محاسبه شد. همچنین بر اساس شاخص F_{st} در سطح ۹۹ (جدول ۳) نشان داد که، ۹۸ درصد تنوع در درون جمعیت‌ها و تنها دو درصد تنوع در بین جمعیت‌ها می‌باشد (شکل۲).



شکل۲- توزیع تنوع ژنتیکی بر اساس معیار F_{st}

میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز به ترتیب ۰/۷۷۹ و ۰/۲۴۹ بدست آمد (جدول۵). دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند (شکل۳) (Nei's 1978).



شکل ۳- مقایسه فاصله ژنتیکی دو جمعیت بر اساس دندروگرام UPGMA

طبق نظر (O'Connell 1997) تعداد ۵۰ نمونه و شناسایی بین ۵ تا ۱۰ الل در خصوص ساختار جمعیت کافی بوده و نتایج بدست آمده قابل اطمینان خواهد بود، اگرچه اندازه کم نمونه تعداد الل‌های شناسایی شده در هر جایگاه را کاهش می‌دهد، اما بر الل‌های معمول و فراوانی آنها موثر نمی‌باشد. Kanapen et al. (2006) در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Gobio gobio* با استفاده از نشانگر میکروساتلایت از ۸۲ نمونه استفاده نمودند. Durna et al. (2010) در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Garra rufa* با استفاده از نشانگر RFLP از ۸۶ نمونه استفاده نمودند. در بررسی حاضر از تعداد ۵۶ نمونه استفاده شد، و با توجه به نتایج آماری به نظر می رسد تعداد نمونه جمع آوری شده برای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه کافی بوده است.

امروزه تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از شاخص‌های مهم وضعیت اکولوژیک اکوسیستم‌های آبی بوده که، به عنوان ابزاری مفید و قدرتمند برای ارزیابی و مدیریت جوامع زیستی مطرح است (Avise 2000). تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط سازمان حفاظت جهانی برای برنامه حفظ ذخایر می‌باشد (Lucentini et al. 2009). تنوع ژنتیکی به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- تنوع ژنتیکی جایگاه های ژنی مورد استفاده در جمعیت های مورد بررسی

		MFW17	GGM023b	GGM 024	GGM007	GGM-045	GGM 027
رودخانه فهلیان	N_a	۱۰	۸	۱۴	۱۲	۱۲	۱۰
	N_e	۵/۲۹۷	۵/۲۰۹	۱۱/۲۸۱	۷/۳۶۲	۵/۶۲۰	۶/۴۲۶
	H_o	۰/۳۲۱	۰/۵۷۱	۰/۹۶۴	۰/۳۹۳	۰/۴۶۴	۰/۱۷۹
	H_e	۰/۸۱۱	۰/۸۰۸	۰/۹۱۱	۰/۸۶۴	۰/۸۲۲	۰/۸۴۴
	F_{IS}	۰/۶۲۴	۰/۲۹۳	-۰/۰۵۸	۰/۵۴۵	۰/۴۳۵	۰/۷۸۹
	pHw	***	***	*	***	***	***
رودخانه سرآب بهرام	N_a	۱۱	۸	۱۵	۱۳	۹	۱۵
	N_e	۹/۰۶۴	۳/۶۵۵	۱۰/۱۱۶	۷/۱۲۷	۵/۵۸۰	۹/۹۲۴
	H_o	۰/۷۱۴	۰/۳۵۷	۰/۹۲۹	۰/۲۵۰	۰/۴۶۴	۰/۳۵۷
	H_e	۰/۸۹۰	۰/۷۲۶	۰/۹۰۱	۰/۸۶۰	۰/۸۲۱	۰/۸۹۹
	F_{IS}	۰/۱۹۷	۰/۵۰۸	-۰/۰۳۰	۰/۷۰۹	۰/۴۳۴	۰/۶۰۳
	pHw	***	***	ns	***	**	***

N_a) تعداد الل؛ N_e) تعداد الل موثر؛ H_O) هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e) هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ F_{IS}) ضریب درون آمیزی؛ pHw) تست احتمال هاردی-واینبرگ (n.s، *، ** و *** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج، یک و یک صدم درصد).

جدول۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در F_{st}

	df	SS	MS	Est. Var.	٪	Stat	Value	Prob
بین جمعیت‌ها	۱	۵/۶۹۶	۵/۶۹۶	۰/۰۵۶	۲			
درون جمعیت‌ها	۱۱۰	۲۸۴/۴۲۹	۲/۵۸۶	۲/۵۸۶	۹۸	F_{st}	۰/۰۲۱	۰/۰۱۰

df (درجه آزادی)، SS(مجموع مربعات)، MS (انحراف میانگین مربعات)، Prob (معنی دار بودن انحراف بعد از ۹۹۹ جایگزینی تصادفی)

پایه‌ای برای توانایی تکامل جمعیت‌ها است. اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، نقش اساسی در حفاظت و بهره‌برداری پایدار از آنها دارد.

ریز ماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که بطور گسترده در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu et al. 2009). در واقع این نشانگرها به دلیل فراوانی آنها در ژنوم تمام موجودات، تنوع بالا در قطعات تکرار شونده آنها و هم بارز بودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر از سایر نشانگرها نشان می‌دهند (Liu and Cordes 2004). با وجود اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی ماهی گل چراغ (*Garra rufa*)، این گونه فاقد جایگاه اختصاصی بوده و اطلاعاتی در مورد وضعیت ژنتیکی این گونه از خاستگاه اصلی آن یعنی جنوب و جنوب غرب ایران، شرق عراق و بخش کوچکی از جنوب شرق ترکیه وجود ندارد. در این پژوهش از ۲۰ جایگاه ژنتیکی اختصاصی دو گونه *Garra gotyla* و *Cyprinus carpio* استفاده شد، که تنها ۶ جایگاه شش جایگاه پلی‌مورفیسم را نشان دادند (Crooijmans et al. 1997؛ Matura et al. 2011). ۶ جایگاه تشخیص داده شده دارای کارایی مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه می‌باشند.

کاهش تعداد الل مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind et al. 2009). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. بالا بودن غنای اللی، نشان‌دهنده بالا بودن اندازه موثر جمعیت می‌باشد (Diz and Presa 2009). در این بررسی متوسط الل مشاهده شده ۱۱/۴۱ برای هر جایگاه بدست آمد (جدول۲). متوسط الل مشاهده شده برای ماهیان آب شیرین ۹/۱ برای هر جایگاه گزارش شده است (DeWoody and Avise 2000). Knapen et al. (2006) متوسط الل مشاهده شده برای

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۴- میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (F_{st}) در سطح شش جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	MFW17	GGM023b	GGM 024	GGM007	GGM-045	GGM 027	میانگین
Nm	۱۱/۸۰۱	۷/۵۶۶	۳۶/۴۳۶	۱۰/۴۷۷	۲۸/۰۰۰	۸/۹۹۳	۱۷/۲۱۲
F_{st}	۰/۰۲۱	۰/۰۳۲	۰/۰۰۷	۰/۰۲۳	۰/۰۰۹	۰/۰۲۷	۰/۰۲۰

جدول ۵- ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی

منطقه	فهلیان	سرآب بهرام
فهلیان		۰/۲۴۹
سرآب بهرام	۰/۷۷۹	

*عدد بالای قطر مربوط به فاصله ژنتیکی و عدد زیر قطر مربوط به شباهت ژنتیکی می‌باشد.

هر جایگاه را در گونه *Gobio gobio*، ۷/۵۷ بدست آوردند. تعداد الل‌های مشاهده شده در تمامی جایگاه‌های ژنی بیشتر از تعداد گزارش شده برای دو گونه *Garra gotyla* و *Cyprinus carpio* با استفاده از همین آغازگرها بود (Matura et al. 2011؛ Crooijmans et al. 1997). این اختلاف ممکن است به علت تفاوت در تعداد نمونه‌ها باشد، اما می‌تواند به دلیل تنوع ژنتیکی بالاتر گونه مورد بررسی نیز بوده باشد. هتروزیگوسیتی نیز به عنوان معیاری از سنجش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، مورد توجه اکولوژیست‌ها می‌باشد (Xu et al. 2001). هتروزیگوسیتی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیار بالا دارد، زیرا هر هتروزیگوت ناقل الل‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع می‌باشد (Diz and Presa 2009). متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جمعیت‌های مورد بررسی به ترتیب ۰/۴۹۷ و ۰/۸۴۷ بدست آمد (جدول۲). متوسط هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مورد بررسی نزدیک به مقدار گزارش شده برای ماهیان آب شیرین می‌باشد. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ گزارش شده است (DeWoody and Avise 2000). Knapen et al. (2006) میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را برای گونه *Gobio gobio* به ترتیب ۰/۵۹۷، ۰/۶۶۸ گزارش کردند. Matura et al. (2011) میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را برای گونه *Garra gotyla* به ترتیب ۰/۵۷۵ و ۰/۷۳۹ گزارش کردند. مقایسه داده‌های حاصل نشان می‌دهد متوسط هتروزیگوسیتی و تعداد الل مشاهده شده در این بررسی بالاتر از میانگین گزارش شده برای ماهیان آب شیرین می‌باشد. بالا بودن تعداد الل مشاهده شده ممکن است به دلیل سیلاب‌های فصل بهار در این مناطق باشد که تخم‌ها و بچه ماهیان این گونه را از بالا دست به سمت پایین دست با خود حمل می‌نماید. این نتایج حاکی از این مطلب می‌باشد که در این مناطق شرایط مناسب بوده و تهدیدی برای تنوع ژنتیکی این گونه وجود ندارد. با کنترل آلودگی در این مناطق می‌توان تنوع ژنتیکی در این مناطق را همچنان حفظ نمود.

در جمعیت‌های طبیعی و وحشی ماهیان، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Yue et al. 2004; Lucentini et al. 2006). با توجه به اینکه تعادل هاردی- واینبرگ بر اساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت است، بنابراین انتظار انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ در جمعیت‌های وحشی وجود دارد (Dixon et al. 2008). در این بررسی ۱۱ نمونه از ۱۲ تست مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی واینبرگ را نشان دادند (جدول۲). انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ را می‌توان به علت آمیزش خویشاوندی بین گونه‌ها، پهلوگیری تعداد محدودی از الل‌ها، ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها و خطای نمونه‌برداری دانست (Callen et al. 1993; McQuown et al. 2003; Skalla et al. 2004; Zhao et al. 2005; Dahle et al. 2006; Li

Archive of SID
www.SID.ir

(et al. 2007). در این مطالعه خروج از تعادل را می‌توان به علت استفاده از آغازگرهای غیر اختصاصی، تعداد کم نمونه‌ها، خطای نمونه‌برداری بیان نمود.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) معیاری مناسب برای بررسی ساختار جمعیت و تعیین میزان تمایز و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Grassi et al. 2004). بر اساس نتایج این تجزیه و بر اساس شاخص F_{st} تنوع ژنتیکی را بین این دو جمعیت دو درصد محاسبه شد. میانگین F_{st} به میزان ۰/۰۲ بدست آمد. این موضوع نشان‌دهنده تمایز بسیار پایین این دو جمعیت می‌باشد. بر اساس معیار Wright (1987) میزان F_{st} کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز پایین بین جمعیت‌ها می‌باشد. از دلایل پایین بودن تمایز بین این دو جمعیت می‌توان به اتصال دو رودخانه به یکدیگر و در نهایت ریختن به رودخانه زهره و ارتباط آبی که این دو با یکدیگر دارا می‌باشند، مرتبط دانست. مقادیر کم F_{st} خود نیز بیان کننده اختلاف ژنتیکی قابل توجهی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Balloux et al. 2002). وجود دامنه‌های متفاوت F_{st} در بین جمعیت‌ها را می‌توان به به علت جریان ژنی (Nm)، تاثیر رانش ژنی و جدایی جغرافیایی مرتبط دانست (Li et al. 2007). میانگین جریان ژنی (Nm) بین دو جمعیت ۱۷/۲۱۲ بدست آمد. بر اساس گزارش Li et al (2007) هرگاه Nm>1 باشد، جریان ژنی عامل اصلی در تمایز ژنتیکی بوده و هر گاه Nm<1 باشد، رانش ژنی عامل اصلی تمایز ژنتیکی می‌باشد. از اینرو نتایج نشان می‌دهد که جریان ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت می‌باشد. جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی مابین مناطق باشد. با توجه به ارزیابی مقادیر بدست آمده از فراوانی اللی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی – واینبرگ و شاخص F_{st} می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دو جمعیت مجزا در این رودخانه‌ها وجود دارد که دارای جریان ژنی نسبتا بالایی با یکدیگرند. این تبادلات ژنی به دلیل ارتباط آبی این دو رودخانه در محل پیوستن به یکدیگر و در نهایت ریختن به رودخانه زهره می‌باشد. بر اساس تجزیه‌های موجود به نظر می‌رسد، گونه *Garra rufa* دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی در مناطق مورد بررسی است و با توجه به اهمیت اکولوژیک این گونه در پالایش رودخانه‌ها حفظ تنوع ژنتیکی لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

Avise JC (2000) Phylogeography the history and formation of species. Harward University Press, Cambridge England.

Balloux F, Brunner H, Lugon-Moulin N (2002) The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11:321-323.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff GM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry 84: 680-683.

Bataillon TM, David JL, Schoen DJ (1996) Neutral genetic markers and conservation: simulated Germplasm collections. Genetics 144:409-417.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Philips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993) Incisence and origin of 'null' alleles in the (AC)n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52:922-927.

Chen L, Li Q, Yang J (2008) Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus Japonicus Selenka*) from northern China. Aquaculture Research 39: 1541-1549.

Coad BW (2009) Fereshwater fishes of Iran. www.briancoad.com.

Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van der poal JJ, Groenen MAM (1997) Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal Genetics 28:129-134.

Dahle G, Jorstad KE, Rusaas HE, Ottera H (2006) Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morpha*) populations. Marine Science 63: 209-215.

Dewoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Fish Biology 56: 461-473.

Dixon TJ, Coman GJ, Arnold SJ, Sellars MJ, Lyons RE, Dierens D, Preston NP, Li Y (2008) Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. Aquaculture 283: 1-6.

Diz PA, Presa P (2009) The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287: 278-285.

Durna S, Bardakci F, Degerli N (2010) Genetic diversity of Garra rufa Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. Biochemical Systematics and Ecology. 38:83-92.

Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Fish Biology 47: 103-126.

Grassi F, Imazio S, Gomarasca S, Citterio S, Aina R, Sgorbati S, Sala F, Patrignani G, Labra M (2004) Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science 166: 1437-1441.

Hartl DL (2000) A Primer of population genetics. Sinauer Associates Inc Sunderland MA USA. 68-72.

Archive of SID
www.SID.ir

Hillis DM, Mortiz C, Mable B (1996) Molecular systematics. 2nd ed, Sinauer Associates Sunderland.
Kanapen D, Taylor M, Blust R, Verheyen (2006) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the gudgeon, *Gobio gobio* (Cyprinidae). Molecular Ecology Notes 6:387-389.
Li D, Kang D, Yin Q, Sun Z, Liang L (2007) Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations. Genetics and Genomics 34: 984-993.
Lind CU, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture 286: 12-19.
Liu F, Xia JH, Bai ZH, Fu JJ, Li JL, Yue GH (2009) High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. Aquaculture 297: 51-56.
Liu Z, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238:1-37.
Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Gigliarelli L, Sgaravizzi G, Natali M, Panara F (2009) Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox Lucius*) population. Fisheries Research 96:139-147.
Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Gigliarelli L, Natali M, Panara F (2006) Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius*). Fisheries Research 80: 251-262.
Magoulas A (2005) Mitochondrial DNA. In stock identification methods applications in fishery science. 2nd edition (Academic Press), 311-330.
Matura R, Sharma S, Barat A, Pande V, Mahanta P (2011) Development and characterization of microsatellite markers in *Garra gotyla* (Family: Cyprinidae, Pisces). (In press).
McQuown E, Krueger CC, Kincaid HL, Gall GAE, May B (2003) Genetic comparison of Lake Sturgeon population: differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite Loci. Great Lakes Research 29: 3-13.
Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
O'Connell M, Skibinski DOF, Beardmore JA (1997) Absence of restriction site variation in the mtDNA and ND6 gene of Atlantic salmon amplified by the polymerase chain reaction. Journal of Fish Biology 47:910-913.
Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.
Pujolar JM, Deleo GA, Ciccotti E, Zane L (2009) Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. Journal of Fish Biology 74: 2034-2046.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular cloning: A laboratory manual. (Eds. Ford, N., Nolan, C. and Fregusen, M.) 743-745. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
Sayili M, Akca H, Duman T, Esengun K (2007) Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: A case study of Kangal Fish Spring, Turkey. Journal Tourism Management. 28: 625-629.
Shaklee JB, Currens KP (2003) Genetic stock identification and risk assessment. In population genetics principles and applications for fisheries scientists. Fish and fisheries 5: 291-328.
Skalla A, Hbyheim B, Glover K, Dahle D (2004) Microsatteletie analysis in domesticated and wild Atlantic salmon. Aquaculture 240: 131-143.
Utter FM (1991) Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology 39: 1-20.
Verspoor E, Jordan WC (1989) Genetic variation at the Me-2 locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. Fish Biology 35: 205-213.
Wright S (1987) Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
Xu Z, Primavera JH, De la Pena LD, Pettit P, Belak J, Warren AA (2001) Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (Penaeus monodon) in the Philippines using microsatellites. Aquaculture 199: 13-40.
Yeh FC, Yang RC, 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.
Yue GH, Li Y, Lim LC, Orban L (2004) Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. Aquaculture 237:89-102.
Zar JH (1999) Biostatistical analysis, 4th Ed, Prentice Hall Upper Saddle River New Jersey.
Zhao N, Shao Z, Ai W, Zhu B, Brosse S, Chang J (2005) Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. Ichthyology 21:7-13.

Archive of SID

www.SID.ir