ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۹۰- ۳۸۷

مقایسه ژنتیکی سگ ماهی جویباری *Oxynoemacheilus kiabii* (Golzarianpour, Abdoli and Frehof 2011) رودخانه گاماسیاب در دو استان کرمانشاه و همدان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Genetic comparison of *Oxynoemacheilus Kiabii* (Golzarianpour, Abdoli and Frehof 2011) from Gamasiab River in Kermanshah and Hamadan Province, using microsatellite markers

قاسم عسکری*[۱]، علی شعبانی[۱]، زهره قدسی[۱]، هاشم نوفرستی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیار و دانش‌آموختگان کارشناسی‌ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

Askari Gh*[1], Shabani A[1], Ghodsi Z[1], Nowferesti H[1]

1. MSc Student, Associate Professor and Graduate Students, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Askarighasem82@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۳- تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

چکیده

شش نشانگر ریزماهواره به منظور بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی دو جمعیت ماهی *Oxynoemacheilus Kiabii* رودخانه گاماسیاب در حوضه دو استان همدان و کرمانشاه مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۶۰ نمونه از دو منطقه جمع‌آوری شد. هر شش نشانگر ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق پلی‌مورفیسم نشان دادند. در مجموع ۷۰ الل برای شش جایگاه مورد استفاده بدست آمد طوری که تعداد الل در هر جایگاه در محدوده ۱۶ – ۶ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) به ترتیب ۰/۵۱۵ و ۰/۸۴۹ بود. بیشتر مناطق انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ را نشان داد. با توجه به میزان جریان ژنی بالا (N_m= ۱۴/۵۵۴) بین دو منطقه و F_{st} پایین (F_{st} = ۰/۰۲۱) به نظر می‌رسد تمایز پایینی بین جمعیت‌های این گونه در مناطق مورد بررسی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

کرمانشاه
تنوع ژنتیکی
ریزماهواره
همدان
Oxynoemacheilus Kiabii

Archive of SID

مقدمه

سگ ماهیان جویباری بعد از کپور ماهیان، فون غالب ماهیان آب-های داخلی ایران می‌باشند (Keivany 2008). گونه *O. Kiabii* از خانواده سگ ماهیان جویباری بوده و پراکنش آن در غرب کشور می‌باشد. این گونه در سال ۲۰۱۱ میلادی کشف و نام‌گذاری شد. کاربردهای بالقوه نشانگرهای ریزماهواره در آبزی‌پروری شامل بررسی تنوع ژنتیکی، تمایز ژنتیکی در بین جمعیت‌های وحشی و پرورشی و ارزیابی نسب و ارتباط افراد و جمعیت‌ها با یکدیگر می‌باشد (Norris et al. 1999). تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با بررسی تنوع ژنتیکی ماهیان دارای ارزش اقتصادی در ایران انجام شده است (Ghelichpour et al. 2010; Kashiri et al. 2010; Rezaii et al. 2010; Ghodsi et al. 2011)، اما در زمینه ماهیان غیراقتصادی مطالعات بسیار اندکی انجام شده است. با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با این گونه صورت نگرفته در این مطالعه، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه مورد بررسی قرار گرفت. در اسفند ماه سال ۱۳۹۰ تعداد ۶۰ نمونه (۳۰ نمونه برای هر استان) رودخانه گاماسیاب در استان‌های کرمانشاه و همدان صید شد. فاصله بین دو ایستگاه نمونه‌برداری (نهاوند- همدان؛ فرامان- کرمانشاه) در حدود ۲۰۰ کیلومتر بود. در محل نمونه‌برداری باله‌های ماهیان جدا و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و به آزمایشگاه انتقال داده شد. DNA ژنومی با استفاده از روش فنول – کلروفورم استخراج شد (Sambrook and Russell 2000). به منظور بررسی کیفیت DNA استخراجی از ژل آگارز و اسپکتروفنومتر استفاده شد.

در این مطالعه از شش جایگاه ریزماهواره، (Taylor et al. 2001; Bang et al. 2009) استفاده شد (جدول۱). واکنش زنجیره پلی-مراز (PCR) با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µ M، یک واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (شرکت سیناکلون)، ۲۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه دمایی برای هر جایگاه عبارت بود از سه 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 سه دقیقه. محصول PCR بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد جداسازی و با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (Caetano et al. 1997).

تعداد الل مشاهده شده (Na)، تعداد الل موثر (Ne)، ناخالصی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی موردانتظار (He)، تعادل هاردی – واینبرگ (HWE)، شاخص درون‌آمیزی (Fis)، شاخص Fst ، Rst و جریان ژنی با استفاده از نرم‌افزار Genealex ver.6.5 (Peakall and Smouse 2012) محاسبه شد. شاخص شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei 1978) و دارنگاره UPGMA با استفاده از نرم‌افزار PopGene ver 1.31 محاسبه و ترسیم شدند. در مجموع ۷۰ الل برای شش جایگاه مورد استفاده بدست آمد. بیشترین تعداد الل در جایگاه IC720 و کمترین تعداد آن در جایگاه Bbar4 مشاهده شد. بیشترین و کمترین تعداد الل موثر برای دو جایگاه IC720 (۱۰/۹۸۹) و Bbar4 (۴/۲۱۹) محاسبه شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۵۱۵) بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جمعیت رودخانه گاماسیاب در منطقه نهاوند همدان ۰/۵۳۰ و برای منطقه فرامان کرمانشاه ۰/۵۰۰ بدست آمد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای دو جمعیت استان‌های همدان و کرمانشاه به ترتیب ۰/۸۶۰ و ۰/۸۳۷ بدست آمد (جدول۲). از ۱۲ آزمون مورد بررسی، ۹ آزمون انحراف معنی-داری را از تعادل هاردی – واینبرگ نشان دادند ($P\leq$۰/۰۵). متوسط شاخص درون‌آمیزی (Fis) برای جمعیت همدان و کرمانشاه به ترتیب ۰/۳۸۰ و ۰/۴۱۳ بدست آمد. بررسی نتایج پارامتر F_{st} ناشی از تجزیه واریانس مولکولی در سطح ۹۹ درصد نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸ درصد) در درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (دو درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز به ترتیب ۰/۷۶۳ و ۰/۲۷۰ بدست آمد (جدول۳). دارنگاره UPGMA بر اساس میزان فاصله ژنتیکی نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند. با توجه به اینکه سگ ماهی جویباری *O. Kiabii* به تازگی کشف شده، هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با ساختارشناسی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف اینگونه با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت نگرفته است. متوسط الل مشاهده شده برای جمعیت نهاوند همدان (۱۲/۱۶) بیش از جمعیت فرامان کرمانشاه (۱۰/۸۳) بود. میانگین الل مشاهده شده برای هر جایگاه ۱۱/۵

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در این تحقیق

جایگاه ژنی	دامنه طولی (جفت باز)	تعداد الل	آغازگر (5′-3′)	دمای اتصال (°C)
Bbar4	۸۴ – ۱۲۰	۷	F: ATAATCACAGCCCCGCAGAG R: GGGTGGTGGAATATATTGGAAA	۵۵
Bbar11	۱۸۴ – ۲۲۸	۱۰	F: GCGGAGGAAGAGAAACACAG R: CTATGCCATTGCCACACATC	۵۱
IC228	۲۷۲ – ۳۵۶	۱۲	F: AATACGAAACTACTTGGTAATGGC R: GTGAAAAGGTCCAGTTAAAAGC	۴۸
IC230	۲۷۲ – ۳۵۲	۱۴	F: GGGTATAGGTGAAAAGGTCC R: ATACGAAACTACTTGGTAATGGC	۵۱
IC487	۱۶۸ – ۲۲۰	۱۲	F: GATTATGCCATGCCGTTGACTGT R: GCTGTTGAAAACTCACCCCTGTG	۵۶
IC720	۲۳۶ – ۴۹۸	۱۵	F: CGCAATGCATTCTCCAATCTCAA R: GACCCCACTCATCACTGCCTCTC	۶۲

جدول۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی

رودخانه گاماسیاب		Bbar4	Bbar11	IC228	IC230	IC487	IC720
نهاوند همدان	N_a	۶	۹	۱۲	۱۶	۱۳	۱۷
	N_e	۴/۸۴۰	۵/۱۴۹	۷/۶۸۳	۹/۷۷۸	۷/۴۴۶	۱۴/۲۳۵
	H_o	۰/۲۷۳	۰/۶۸۲	۰/۶۳۶	۰/۴۰۹	۰/۸۶۴	۰/۳۱۸
	H_e	۰/۷۹۳	۰/۸۰۶	۰/۸۷۰	۰/۸۹۸	۰/۸۶۶	۰/۹۳۰
	F_{IS}	۰/۶۵۶	۰/۱۵۴	۰/۲۶۸	۰/۵۴۴	۰/۰۰۲	۰/۶۵۶
	pHw	***	***	**	***	ns	***
فرامان کرمانشاه	N_a	۸	۱۰	۱۲	۱۲	۱۱	۱۲
	N_e	۳/۵۹۹	۵/۲۳۲	۹/۵۸۴	۶/۹۶۴	۷/۶۸۳	۷/۷۴۴
	H_o	۰/۲۷۳	۰/۳۱۸	۰/۷۲۷	۰/۵۰۰	۰/۷۷۳	۰/۴۰۹
	H_e	۰/۷۲۲	۰/۸۰۹	۰/۸۹۶	۰/۸۵۶	۰/۸۷۰	۰/۸۷۱
	F_{IS}	۰/۶۲۲	۰/۶۰۷	۰/۱۸۸	۰/۴۱۶	۰/۱۱۲	۰/۵۳۰
	pHw	***	***	ns	***	ns	***

N_a) تعداد الل؛ N_e) تعداد الل موثر؛ H_O) هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e) هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ F_{IS}) ضریب درون‌آمیزی؛ pHw) تست احتمال هاردی- واینبرگ (ns، *، ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد)

جدول ۳- میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (F_{st}) در سطح شش جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	Bbar4	Bbar11	IC228	IC230	IC487	IC720	میانگین
Nm	۵/۹۶۳	۲۲/۹۸۵	۱۲/۷۵۴	۲۰/۷۰۷	۸/۱۵۵	۱۶/۷۶۰	۱۴/۵۵۴
F_{st}	۰/۰۴۰	۰/۰۱۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۲	۰/۰۳۰	۰/۰۱۵	۰/۰۲۱

بود. DeWoody and Avise (2000) با بررسی بیش از ۴۰۰۰۰ نمونه از ۷۸ گونه گزارش کردند که متوسط الل مشاهده شده برای ماهیان آب شیرین معمولا ۷/۵ می باشد. با توجه به میزان گزارش شده برای ماهیان آب شیرین، میزان الل مشاهده شده در این جمعیت‌ها بالاتر از میزان گزارش شده برای ماهیان آب شیرین می‌باشد. کاهش تعداد الل مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind et al. 2009).

هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تمامی جایگاه‌های مورد استفاده بالاتر از میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بود (جدول۲). در بررسی تعادل هاردی – واینبرگ برای دو منطقه نمونه‌برداری، از ۱۲ تست، ۹ تست انحراف معنی‌داری را از تعادل نشان دادند ($P \leq$ ۰/۰۵). در این تحقیق خروج از تعادل را می‌توان به دلیل استفاده از نشانگرهای غیر اختصاصی، وجود الل صفر و احتمالا تعداد کم

Archive of SID
www.SID.ir

نمونه‌ها عنوان کرد. در واقع وجود الل نول در خصوص ریزماهواره‌های ماهیان پدیده‌ای معمول می‌باشد (Norris et al. 1999). بر اساس شاخص Fst تفاوت‌های درون جمعیتی بالایی در حدود ۹۸ درصد در این جمعیت‌ها وجود داشت، اما میزان تمایز بین جمعیتی پایینی در حدود دو درصد برای این دو جمعیت بدست آمد. شاخص Fst بیان کننده تمایز جمعیت در سطوح مختلف می‌باشد. در این مطالعه Fst در حدود ۰/۰۲۱ بدست آمد. میزان جریان ژنی (N_m) در بین دو جمعیت ۱۴/۵۵۴ بدست آمد. یکی از دلایل وجود جریان ژنی بالا در بین این دو جمعیت می‌تواند اثر Wahlund باشد. با استناد به نتایج بدست آمده می‌توان دلیل میزان جریان ژنی بالا را ترکیبی از هر دو اثر عنوان کرد. سازگاری و بقا یک گونه زمانی حفظ می‌شود که تنوع ژنتیکی موجود از بین نرود (Meffe and Carool 1997). بر اساس ارزیابی اطلاعات بدست آمده از فراوانی اللی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی – واینبرگ، شاخص F_{st} و ترسیم دارنگاره مناطق نمونه‌برداری، دو جمعیت در این مناطق دارای جریان ژنی بالایی در بین خود بوده و دارای تنوع ژنتیکی بالای درون‌جمعیتی می‌باشند. همچنین جمعیت ماهی *O. Kiabii* در این مناطق به دلیل ارتباط آبی که با یکدیگر دارا می‌باشند فاصله ژنتیکی از یکدیگر ندارد.

منابع

Bang I, Kim WJ, Rolee I (2009) Characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Miho spine loach (*Iksookimia choii*) and cross-species amplification within the Cobitidae family. Molecular Ecology Resources 9: 281-284.

Caetano AG, Callahan LM, Gresshoff PM (1997) The origin of bermudagrass (Cynodon) offtypes inferred by DNA amplification fingerprinting. Crop Science 37: 81-87.

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

Ghelichpour M, Shabani A, Shabanpour B (2010) Genetic diversity of the two populations of Common carp (Cyprinus carpio) in Gharahsu and Anzali regions using eight microsatellite markers. Taxonomy and Biosystematics 5: 39-49 (In Farsi).

Ghodsi Z, Shabani A, Shabanpour B (2011) Genetic diversity of *Liza aurata* (Risso, 1810) inthe coastal regions of Golstan province, using microsatellite marker. Taxonomy and Biosystematics 6: 35-47 (In Farsi).

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.

Kashiri H, Shabani A, Shabanpour B, Rezaii M (2010) Microsatellite polymorphism in natural populations of threatened Caspian roach in Golestan coasts. Taxonomy and Biosystematics 2: 55-67 (In Farsi).

Keivany Y (2008) A Summary of the Phylogenetic Classification of Fishes. Isfahan University of technology Press Iran (In Farsi).

Lind CU, Evans BS, Knauer J, Taylor JU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture 286: 12-19.

Meffe GK, Carroll CR (1997) Genetic conservation of diversity within species in principles of conservation biology eds. GK. Meffe CR. Carrol pp. 161-21. Sunderland, Ma: Sinauer Associates, Inc: Publisher.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of Individuals. Genetics 89: 583-590.

Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (Salmo salar) populations. Aquaculture 180: 247-264.

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.

Rezaii M, Shabani A, Shabanpour B, Kashiri H (2010) Genetic comparison of Caspian Sea *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) in Gorganroud and Cheshmekile (Tonekabon) rivers using microsatellite markers. Taxonomy and Biosystematics 1: 1-15. (In Farsi).

Sambrook JD, Russell W (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York.

Taylor M, Blust R, Verheyen E (2001) Characterization of microsatellite loci in the stone loach, *Barbatula barbatula* L. Molecular Ecology Notes 1: 96-97.

Archive of SID

www.SID.ir