Arshive of SID

ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۹۹-۹۱

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*) در چشمه مادر و دختر و چشمه چهل‌گزی در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Genetic diversity of zagros zebrafish (Aphanius vladykovi) in Madar-o-dokhtar spring and Chehelgazi spring in the Chaharmahall-o-Bakhtiari Province by using microsatellite markers

سیده‌آمنه حسینی*[۱]، علی شعبانی[۱]، حمیدرضا رضایی[۱]

۱- به‌ترتیب کارشناس ارشد، دانشیار، استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی،گرگان، ایران

Hosseini SA*[1], Shabani A[1], Rezaei HR[1]

1- MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:ahossaini.9571@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۱۵)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*) که ماهی کوچکی از خانواده کپور دندان‌داران و بومی استان چهارمحال‌وبختیاری است، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت. بدین‌منظور تعداد ٤٦ قطعه ماهی در پاییز ۹۰ از چشمه چهل‌گزی و چشمه مادر و دختر جمع‌آوری شد. در این بررسی از ٦ جایگاه ریزماهواره چندشکل استفاده شد. تعداد آلل مشاهده شده در جمعیت‌ها به طور میانگین ۱۱/٤۱ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در چشمه چهل‌گزی ۰/۹۹۳ و در چشمه مادر و دختر ۰/۹۵۷ محاسبه شد که نشان می‌دهد دوره تولیدمثلی طولانی آفانیوس دلیلی بر موفقیت تولیدمثلی و افزایش هتروزیگوسیتی است. نتایج حاصل از Fst (۰/۰۲۳) و Rst (۰/۰۹۲) تمایز ژنتیکی پایینی را میان مناطق نشان دادند. تجزیه واریانس ملکولی تنها دو درصد تنوع بین جمعیت‌ها نشان داد و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۳۲۲ محاسبه شد. جریان ژنی بین دو منطقه ۱۹/۰۹۷، نسبتاً بالا بوده و می‌تواند متأثر از نحوه محاسبه آماری جریان ژنی باشد. در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی از بین ۱۲ تست جایگاه ژنی، در سه تست پیروی از تعادل مشاهده شد. این بررسی دلایل و نتایج اولیه را برای وجود جمعیت‌های متمایز ماهی گورخری زاگرس نشان می‌دهد، بنابراین توجه و اقدامات جدی برای حفظ ذخایر ژنتیکی آن ضروری است.

واژه‌های کلیدی

Aphanius vladykovi
تنوع ژنتیکی
چهارمحال و بختیاری
ریزماهواره

www.SID.ir

Arshive of SID

مقدمه

آفانیوس‌ها ماهیان با ارزش بیولوژیکی هستند که در مبارزه با بیماری مالاریا (با خوردن لارو پشه آنوفل) نقش دارند و از لحاظ ظاهری برای اهداف زینتی به‌کار می‌روند. اغلب یوری‌ترم، یوری-هالین و مقاوم به کمبود اکسیژن بوده اما آب‌های خنثی و پر اکسیژن را ترجیح می‌دهند (Keivany and Soofiani 2004). این ماهیان دارای دوره تولید مثلی طولانی هستند که نوعی سازگاری با شرایط محیطی برای ماهیان کوچک با دوره زیستی کوتاه محسوب می‌شود و زمان آن در جنس‌های مختلف آفانیوس از اواخر اسفند تا اول مهر با غالبیت در فروردین تا مرداد مشاهده شده است (Hossaini and Golzar 2012). این ماهیان دارای دو-شکلی جنسی بوده و بلوغ جنسی زود هنگام را نشان می‌دهند و از چند ماه پس از تولد، توانایی تولیدمثل دارند. *Aphanius vladykovi* در چشمه‌ها و رودخانه‌های استان چهارمحال و بختیاری که اغلب از سرچشمه‌های رودخانه کارون هستند، زندگی می‌کند. نظر به کاهش سالانه جمعیت‌های این ماهی در استان چهارمحال و بختیاری و با توجه به ارزش زیست‌شناختی و زینتی *Aphanius vladykovi*، بررسی تنوع ژنتیکی این موجود جهت درک میزان ذخایر و حفاظت از آن امری ضروری به شمار می‌آید. تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط سازمان جهانی حفاظت از منابع طبیعی (IUCN)[1] برای برنامه‌های حفاظت ذخایر است (Lucentini et al. 2009). بنابراین حفظ بقای هر جامعه، از اهداف اساسی در زیست‌شناسی حفاظت است.

ریزماهواره‌ها یکی از مهم‌ترین نشانگرهای ژنتیکی به شمار می-آیند، زیرا دارای پتانسیل تخمین مهاجرت و قدرت تفکیک برای تشخیص نسبت بالای خویشاوندی می‌باشند (Kimberly et al. 2006). از آن‌جا که برای یک جایگاه که آغازگر ریزماهواره بر اساس آن طراحی می شود، آلل‌های متعددی یافت می‌شود، این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی قابلیت بالایی دارد. پایداری ریزماهواره‌ها احتمالاً از طریق پایداری ژنوم در کلیه سطوح کنترل می شود، به‌طوری که برخی جهش‌ها نظیر جهش‌هایی که موجب

شکل ۱- ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*)

عدم ترمیم DNA می‌شوند، می‌توانند پایداری ژنوم و در نتیجه ریزماهواره‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Jewell 2006)، لذا تنوع ریزماهواره‌ها ابزار بسیار حساسی را برای اندازه‌گیری تفاوت‌های ژنتیکی جزئی بین جمعیت‌ها فراهم می‌آورد.

عوامل تهدیدآمیزی برای زندگی آفانیوس زاگرس مطرح بوده که از آن‌جمله خشک شدن برخی زیستگاه‌ها، آلوده شدن منابع آبی، فرار ماهیان قزل آلا از استخرها و ورود به تالاب‌ها مانند تالاب چغاخور که از زیستگاه‌های مناسب آفانیوس است، همچنین احداث استخرهای قزل‌آلا در مسیر چشمه و رودخانه، که شکارچیان قدری برای آفانیوس هستند و سبب کاهش قابل توجه جمعیت‌های این گونه آبزی شده‌اند، اشاره می‌شود. از جهتی آفانیوس زاگرس در اکثر حوزه‌های آبی با بیماری‌های انگلی مخصوصاً بیماری ایک مواجه و بسیار مستعد برای این بیماری است و آنگونه که در بررسی‌های پیاپی مشاهده شد و با توجه به پژوهش‌های پیشین، دچار تلفات قابل توجهی در اثر ابتلا به ایک می‌شود (Raissy et al. 2008; Fattollahi 2013).

پژوهش‌های محدودی در زمینه ژنتیکی بر روی جنس Aphanius صورت گرفته‌است. در خط ساحلی اطلس جنوبی تنوع ژنتیکی *A.baeticus* با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و هسته‌ای بررسی شد و تنوع ژنتیکی بسیار پایین و تمایز ژنتیکی ضعیفی شناسایی شد. در این خصوص توزیع پراکنده این گونه که از دوره‌های میان دو یخبندان آغاز شده و همراهی آن با حوادث خلفی انقراض و مهاجرت ناشی از چرخه‌های ادواری حاصل از جاری شدن سیل توانسته عدم وجود روابط فیلوژنیک میان جمعیت را به خوبی بیان کند (Gonzales et al. 2014). بررسی

[1] International union for conservation of nature

www.SID.ir

Arshive of SID

تنوع ژنتیکی *A. Fasciatus* نیز تنوع ژنتیکی کم و جمعیت همگن از نظر ژنتیکی را نشان داد و همچنین نشان داد ریزماهواره نسبت به آلوزایم سطح کم تنوع ژنتیکی را نشان داد (Maltagliati 1998; Cimmaruta et al. 2010). در بررسی کروموزومی ماهی گورخری زاگرس مشخص شد که تعداد نمایی کروموزوم‌ها (2n) برابر ٤٨ بوده که مشابه دیگر گونه‌های این جنس از جمله *A.ginaonis*، *A. dispar*، *A.persicus* است که تاکنون بررسی شده‌اند (Esmaeili et al. 2007; Amini and Hemmatzadeh 2012). همچنین بررسی نواربندی‌های گوناگون بر روی کروموزوم‌های *Aphanius vladykovi* که برای نخستین بار در ایران بر روی یک گونه آبزی انجام شد، نشان داد ژنوم این گونه دارای نواحی غنی از بازهای C و G بوده در حالی که بخش‌های غنی از بازهای A و T در آن کم است (Hemmatzade and Amini 2012).

از آن‌جا که تاکنون اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی *Aphanius vladykovi* منتشر نشده و از طرفی دانستن تنوع ژنتیکی برای حفظ ذخایر با ارزش این گونه ضروری است، در این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های آن در دو منطقه با ٦ جفت آغازگر ریزماهواره پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

بررسی مناطق و نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در استان چهار محال و بختیاری از ٢٣ عدد ماهی آفانیوس زاگرس در هر منطقه، چشمه مادر و دختر در شهرستان گندمان با موقعیت جغرافیایی N ″٣١°٥٢′١٨/٨٦ و E ″٥١°٠٩′٣١/٢٥ و چشمه چهل‌گزی در نزدیکی روستای باستانی بیژگرد با موقعیت جغرافیایی N ″٣١°٤٧′٠٤/٢٢ و E ″٣٠/٢٩ ٥١°١٢′ در پاییز سال ١٣٩٠ صورت گرفت (شکل ٢). باله پشتی در اتانول مطلق فیکس شده و برای مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم (Hillis et al. 1996) صورت گرفت. DNA استخراج شده در ١٠٠ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. شش جفت آغازگر ریزماهواره شامل BA9، AC4، CmD1، GATA2 (Strecker 2006)، BL2-114 (Dubut et al. 2009) و GGM024 (Matura et al. 2012) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و دمای بهینه برای هر یک به دست آمد (جدول ١). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ٨ درصد جداسازی شده و در نهایت ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Sambrok et al. 1989). عکس‌برداری از ژل‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD) انجام شد و از نرم‌افزار Gel-Pro Analyzer 6.0 برای محاسبه طول قطعات استفاده شد.

جدول ١- خصوصیات جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های کپوردندان زاگرس

جایگاه	توالی آغازگر(′٣-′٥)	دمای اتصال(°C)	وزن (bp)
BA9(F)	F:CACGCTCCTTTGGGGAAGCCTA R:GCCGTCTGCCTGTTTGCCTTTATC	٦٢	٣٦٣-٢٥٠
CmD1(F)	F:AATGGATGGTGTGAATGGC R:GGATGGATACAGAGCAGCAC	٥٥	٢٢٥-١٦٨
GATA2(F)	F:TCGGATGCTCAGTCAGTACG R:ATGAACAACGAGTCACACGC	٥٢	٢٣١-١٩٢
AC4(T)	F:CTGCTGCAGTCTGCAC R:TCACCTCCAAGGTTAGTCAT	٤٤	١٦٢-١٣٤
BL2-114	F:ATCACTGCCATTTTATTA R:CTGCTCCGCTCTGTTCCA	٥٠	٣٨٠-٢٨٨
GGM024	F:TCCCTCTTTTTGGTCTCAGG R:TAGGTGAACAAATGGCATGG	٥٥	١٨٢-١٤٠

www.SID.ir

Arshive of SID

جدول ۲- تنوع ژنتیکی ٦ جایگاه ژنی مورد مطالعه در جمعیت‌های آفانیوس زاگرس

		BA9(F)	CmD1(F)	GATA2(F)	AC4(T)	BL2-114	GGM024
چشمه چهل‌گزی	Na	۱۸	۷	۱۰	۷	۱۵	۸
	Ne	۱۳/۳۹۲	۳/۳۹۱	٦/۹٦۱	٦/۱۱٦	۱۲/۳۰۲	۵/۳٤۳
	Ho	۱	۱	۱	۰/۹۵۷	۱	۱
	He	۰/۹۲۵	۰/۷۰۵	۰/۸۵٦	۰/۸۳٦	۰/۹۱۹	۰/۸۱۳
	Fis	-۰/۰۸۱	-۰/٤۱۸	-۰/۱٦۸	-۰/۱٤٤	-۰/۰۸۸	-۰/۲۳۰
چشمه مادر و دختر	Na	۱۸	۱۳	۸	۸	۱۵	۱۰
	Ne	۱۲/۹۰۲	۹/۸۸۸	۵/۹٤٤	۵/۸۷۸	۱۱/۱۳۷	٦/٦۵٤
	Ho	۱	۱	۰/۷۳۹	۱	۱	۱
	He	۰/۹۲۲	۰/۸۹۹	۰/۸۳۲	۰/۸۳۰	۰/۹۱۰	۰/۸۵۰
	Fis	-۰/۰۸٤	-۰/۱۱۳	۰/۱۱۱	-۰/۲۰۵	-۰/۰۹۹	-۰/۱۷۷

تجزیه آماری

تجزیه‌های مربوط به ساختار ذخایر ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل موثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) و تست انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ توسط نرم‌افزار GenAlex 6.3 (Peakall and Smouse 2006) محاسبه و مقدار P با روش بونفرونی تصحیح شد. مطالعه Fst و Rst نیز با استفاده از آزمون AMOVA در نرم‌افزار GenAlex 6.3 صورت گرفت.

فرضیه وجود تنگنای ژنتیکی تحت مدل بی‌نهایت (IAM)، با استفاده از نرم افزار Bottleneck 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996) با تعیین انحراف از تعادل جهش- انحراف بر اساس افزایش یا کسری هتروزیگوسیتی بررسی شد.

نتایج

از شش جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی در آفانیوس زاگرس، هر شش جفت چندشکلی را نشان دادند که جزئیات محاسباتی در جدول ۲ آورده شده‌است. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در چشمه چهل‌گزی ۱۱ و در چشمه مادر و دختر ۱۲ محاسبه شد. حداکثر تعداد آلل مشاهده شده مربوط به جایگاه ژنی BA9(F) با ۱۸ آلل در هر دو جمعیت و حداقل مربوط به جایگاه CmD1 و AC4 با ۷ آلل در جمعیت چشمه چهل‌گزی دیده شد. از بین آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، BL2 دارای بیشترین محدوده باندی از اندازه آللی ۲۵۲ تا ۳٤۸ جفت باز و جایگاه AC4 دارای اندازه آللی ۱۳٦ تا ۱٦٤ بودند. در این بین جایگاه دارای اندازه آللی ۱۷۲ تا ۲۲۰، BL2 دارای اندازه آللی ۳۰۸ تا ۳۷۲، GATA2 دارای اندازه آللی ۱۹۲ تا ۲۳۲ و GGM024 دارای اندازه آللی ۱٤٤ تا ۱۸۰ جفت باز بودند. در این مطالعه دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۷۳۹ تا ۱، با میانگین ۰/۹۷۵ بود که در این بین Ho جایگاه AC4 در جمعیت چشمه چهل گزی برابر ۰/۹۵۷ و در جایگاه GATA2 در جمعیت مادر و دختر برابر ۰/۷۳۹ محاسبه شد و سایر مقادیر Ho برای دیگر جایگاه‌ها برابر یک بود. دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۷۰۵ تا ۰/۹۲۵ با میانگین ۰/۸۷٤ به دست آمد که بیش‌ترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی BA9 و کم‌ترین مقدار مربوط به جایگاه CmD1 در جمعیت چشمه چهل‌گزی محاسبه شد. طی بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، انحراف از تعادل بالایی در جایگاه‌های ژنی وجود داشت (جدول ۳) که پس از کاربرد ضریب تصحیح بونفرونی در سه تست پیروی از تعادل مشاهده شد. تمایز بین مناطق توسط شاخص Fst و Rst بر اساس آنالیز واریانس ملکولی (AMOVA) محاسبه شد و مقدار Fst برابر ۰/۰۲۳ و Rst برابر ۰/۰۹۲ به دست آمد. همچنین تجزیه واریانس ملکولی طبق شکل ۲ تنوع بین جمعیت‌ها را بر اساس معیار Fst، دو درصد و درون جمعیت‌ها را ۹۸ درصد نشان داد. این نمودار نشان می‌دهد که در بین این دو منطقه تمایز ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد. شاخص درون آمیزی (Fis) برابر ۰/۱۳۸- و میانگین جریان ژنی بر اساس آزمون AMOVA برابر ۱۹/۰۹۷ به دست آمد. بر اساس Nei (1972) میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز به ترتیب ۰/۷۲۵ و ۰/۳۲۲ به دست آمد.

www.SID.ir

Arshive of SID

جدول ۳- نتایج آزمون X^2 برای تعادل هاردی- واینبرگ در ٦ جایگاه آللی

منطقه	عوامل تعادل X^2	BA9	CmD1	GATA2	AC4	BL2-114	GGM024
چشمه چهل‌گزی	درجه آزادی	۱۵۳	۲۱	۴۵	۲۱	۱۰۵	۲۸
	آزمون مربع کای	۱۵۳	۸۵	۷۲	۳۲	۱۷۲	۵۸
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۶۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی‌دار بودن	***	***	*	ns	***	**
چشمه مادر و دختر	درجه آزادی	۱۵۳	۷۸	۲۸	۲۸	۱۰۵	٤٥
	آزمون مربع کای	۲۲٤	۱۳۳	٤٦	٤۹	۱۲۸	۷۳
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۱۶	۰/۰۰۸	۰/۰۶۶	۰/۰۰۵
	معنی‌دار بودن	**	***	ns	*	ns	*

ns، **،***، به‌ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح پنج، یک و یکدهم درصد.

شکل ۲- چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده تحت معیار Fst

نتایج به دست آمده از تست تعادل جهش- انحراف تحت مدل IAM با استفاده از تست ویلکاکسون و Sign علائمی از بروز تنگنای ژنتیکی در هر دو منطقه نشان دادند.

بحث

ماهی گورخری زاگرس یکی از گونه‌های با ارزش بومی ایران در استان چهارمحال و بختیاری بوده که در سال‌های اخیر جمعیت-های آن دچار تغییرات کاهشی چشمگیری بوده‌اند به گونه‌ای که در زمره ماهیان در معرض تهدید به شمار می‌رود و از عمده دلایل آن می‌توان به آلودگی‌های زیست‌محیطی، خشک شدن بسیاری از منابع آبی و شیوع بالای عوامل بیماری‌زا مخصوصاً انگل *Ichthyopthirius multifilis* که عامل بیماری ایک در ماهیان است، اشاره کرد (Keivany and Soofiani 2004). فعالیت‌های اکولوژیکی و ژنتیکی، نیازی ضروری برای مقابله با کاهش سریع تنوع زیستی هستند، همچنین توسعه استراتژی‌های محافظت مؤثر نیازمند داشتن اطلاعات در مورد روابط اکولوژیکی و ژنتیکی میان جمعیت‌هاست که به امور مدیریتی حفاظت از ذخایر آن‌ها کمک شایانی می‌کند (Rezaei 2010). میزان تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی در تنوع جمعیت ماهیان به موقعیت جغرافیایی، شرایط محیطی، نیروهای به‌گزینی، ذخایر اولیه، دورگ‌گیری و تعامل بین جمعیت‌های اهلی و وحشی بستگی دارد. درک این عوامل برای تعیین احتمال تأثیر ذخیره‌سازی، اهلی‌سازی ماهیان و حتی دورگ‌گیری و ایجاد ماهیان تراریخته، بر تنوع ژنتیکی جمعیت ضروری است (Dunham 2004). در بررسی حاضر بیش‌ترین تعداد آلل مربوط به جایگاه BA9 برابر ۱۸ و کم‌ترین تعداد آلل مربوط به جایگاه AC4 و CmD1 در چشمه چهل‌گزی برابر ۷ به دست آمد. میانگین تعداد آلل مشاهده شده ۱۱/٤۱ محاسبه شد که بیش از میانگین تعداد آلل هر جایگاه در ماهیان آب شیرین (۷/۵) (Dewoody and Avise 2000) بوده و نشان دهنده تنوع آللی مناسبی در جمعیت‌های کنونی می‌باشد. در جمعیت‌های کوچک مانند جمعیت‌های مورد بررسی در این مطالعه، واریانس فراوانی آللی بالاست یعنی نوسانات تعداد آلل به دلیل انحراف ژنتیکی تصادفی در طول زمان بیشتر از وقوع این حالت در جمعیت‌های بزرگ است و البته با توجه به فرمول واریانس فراوانی آللی ($p (1-p) / 2N_e$ = واریانس فراوانی آللی، که p فراوانی آللی و N_e

www.SID.ir

Arshive of SID

جدول ٤- میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (Fst) در جایگاه‌های ژنی مورد بررسی

جایگاه	BA9(F)	CmD1(F)	GATA2(F)	AC4(T)	BL2-114	GGM024	میانگین
Nm	٢٤/٤٣٨	٢/٩٥٦	١٧/١٧٣	٢٨/٤٣٥	٢٦/١٤٩	١٥/٤٣٠	١٩/٠٩٧
Fst	٠/٠١٠	٠/٠٧٨	٠/٠١٤	٠/٠٠٩	٠/٠٠٩	٠/٠١٦	٠/٠٢٣

اندازه مؤثر جمعیت است)، تغییراتی که تعداد آلل‌ها می‌توانند از نسلی به نسل دیگر داشته باشند در جمعیت کوچک سریع‌تر از جمعیت بزرگ رخ می‌دهد. بنابراین این احتمال وجود دارد که در نسل‌های بعدی غنای آللی بنابراین این احتمال وجود دارد که در نسل‌های بعدی غنای آللی کاملاً متفاوت با وضعیت کنونی باشد (Turner and Gold 1998; Shikano et al. 2001; Beaumont and Hoare 2003;). هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر ٠/٩٧٥ برآورد شد که بیش از میانگین Ho در ماهیان آب شیرین است که توسط Dewoody and Advise (2000) برابر ٠/٤٦ محاسبه شد. هتروزیگوسیتی بالا می‌تواند به دلیل آغازگرهای به‌کار رفته باشد. از طرفی این پارامتر با موفقیت تولیدمثل در طول دوره زندگی در هر دو جنس نر و ماده همبستگی دارد (Dewoody and Avise 2000) که این امر نشان می‌دهد دوره تولیدمثلی طولانی آفانیوس دلیلی بر موفقیت تولیدمثلی و افزایش هتروزیگوسیتی است. همچنین این ماهی بسیار مستعد بیماری ایک بوده و در حوزه‌های آبی استان چهارمحال و بختیاری غالباً مبتلا به این بیماری است و این امر زمانی اهمیت دوچندان پیدا می‌کند که کاهش تنوع ژنتیکی سبب می‌شود که جمعیت قادر به انطباق با فشارهای انتخابگر محیط، از قبیل تغییرات آب و هوایی و یا تغییر در منابع در دسترس نباشد. زیرا تنوع ژنتیکی که انتخاب بر اساس آن صورت می‌گیرد ممکن است پیش از این از جمعیت حذف شده باشد. هتروزیگوت‌ها ناقل آلل‌های متفاوتی هستند که نشان‌دهنده تنوع و سازگاری با شرایط متغیر محیطی بوده و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی، رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تأثیر آن است (Beardmore et al. 1997; Ciftci and Okumus 2002). تعداد آلل و هتروزیگوسیتی می‌تواند تحت تأثیر تعداد نمونه و منطقه هدف نیز باشد. همچنین مشاهده افزایش هتروزیگوسیتی در اثر اشتباه در هنگام خواندن آلل‌ها و خطای PCR نیز رخ می‌دهد (Li et al. 2009)، چرا که با توجه به بررسی‌های اندازه مؤثر جمعیت و تنگنای ژنتیکی این مقدار بالای هتروزیگوسیتی واقعی به نظر نمی‌رسد. در این رابطه می‌توان به نسبت‌های جنسی نابرابر در این ماهی اشاره کرد به گونه‌ای که در مناطق نمونه‌برداری بررسی نمونه‌های صید شده بیانگر این مطلب بود که حدود ٧٥ درصد جمعیت را جنس ماده و ٢٥ درصد جمعیت را جنس نر تشکیل می‌دهند که این نسبت‌های جنسی نابرابر سبب کاهش جمعیت مؤثر شده که تمامی جنبه‌های ژنتیک یک جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به مرور سبب افزایش فراوانی آلل‌های مشابه شده که همان افزایش هموزیگوسیتی است.

جدول ٥- تجزیه تنگنای ژنتیکی

جمعیت‌ها	(P) ویلکاکسون	(P) تست Sign	He/Hd
چشمه چهلگزی	٠/٠٠٧	٠/٠٤٧	٦/٠
چشمه مادر و دختر	٠/٠٠٧	٠/٠٤٧	٦/٠

P) احتمال؛ Hd) جایگاه‌های ژنی با کسری هتروزیگوسیتی؛ He) جایگاه-های ژنی با زیاد بودن هتروزیگوسیتی.

Fst تفاوت فراوانی آللی جایگاه‌های مورد مطالعه در بین جمعیت-های مختلف را ارزیابی می‌کند، مقادیر عددی این شاخص از صفر تا یک متغیر است (Beaumont and Hoare 2003). Fst برابر با صفر نشان دهنده عدم وجود تفاوت در بین جمعیت‌ها، آلل‌های یکسان و فراوانی یکسان است. ٠/٠٥ > Fst نشان می‌دهد که جریان ژنی در میان جمعیت‌ها مقداری محدود می‌شود (Hoolihan et al. 2006). با وجود جدایی کامل دو منطقه از نظر جغرافیایی و نداشتن هیچ‌گونه ارتباط آبی بین دو چشمه، جریان ژنی بالا و بطور میانگین برابر ١٩/٠٩٧ وجود دارد. البته احتمال دارد این مقدار بالای جریان ژنی مربوط به ارتباط آبی این دو

www.SID.ir

Arshive of SID

منطقه در گذشته و یک جمعیت بودن سابق آن‌ها باشد. اما قطعاً آنچه تأثیرگذار است نحوه محاسبه آماری جریان ژنی می‌باشد که با وجود این‌که شاخص تمایز ژنتیکی، تمایز اندک یعنی دو درصد را نشان می‌دهد. اما به‌دلیل آنکه متأثر از تعداد آلل‌ها و فراوانی آللی (که در دو جمعیت به هم نزدیک هستند) می‌باشد، طبیعتاً آنالیز آماری جریان ژنی بالایی را نشان می‌دهد. نرخ جریان ژنی ۱۰ درصد یا کمتر، ممکن است بیانگر جمعیت‌های مجزا باشد. در این زمینه بطور خاص گونه‌های دریایی تمایز جمعیتی کمتری نشان می‌دهند که شاید به دلیل موانع بالقوه کمتر برای مهاجرت و جریان ژنی باشد (Carvalho and Hauser 1995). میزان فاصله ژنتیکی (Nei 1972) برای جدایی جمعیت‌ها با دامنه ۰/۰۳ تا ۰/۶۱ ذکر شده است که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد و نشان دهنده تمایز ژنتیکی هر چند اندک بین جمعیت‌های مورد مطالعه است (Shaklee and Tamaru 1982).

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ از بین ۱۲ تست جایگاه ژنی در ۹ تست مشاهده شد و تنها حدود ۲۵ درصد جایگاه‌ها پیروی از تعادل را نشان دادند. انحراف از تعادل در این جمعیت‌ها می‌تواند بر اساس کوچکی جمعیت، رانش ژنتیکی و احتمالاً آمیزش غیرتصادفی باشد. البته احتمال دارد انتخاب طبیعی در این امر دخیل باشد که ممکن است به دلیل ابتلای شدید این ماهیان به بیماری‌های انگلی که بصورت رایج و گسترده مشاهده شده و در نتیجه انتخاب ماهیان مقاوم به بیماری توسط طبیعت باشد.

شناخت جمعیت‌هایی که دچار تنگنای ژنتیکی شده‌اند، با اهمیت بوده زیرا برخی جمعیت‌ها واقعاً آنقدر زمان ندارند تا بتوانند با مشکلاتی سازگار شوند که اغلب جمعیت‌های کوچک را تهدید می‌کند و خطر انقراض آن‌ها را افزون می‌کند. در یک جمعیت بسته، احتمال دارد در هنگام آمیزش ماهیان، افراد خویشاوند با یکدیگر آمیزش کنند و هر قدر شمار مولدین مؤثر (اندازه مؤثر جمعیت) کوچک‌تر باشد احتمال روی دادن این حالت بیشتر است (Amini 2009). محیط بسته و کوچک چشمه‌های محل زیست آفانیوس، عدم ارتباط با سایر آب‌ها و تخریب محیط زیست آن‌ها به مرور زمان سبب کاهش جمعیت و بالطبع کاهش مولدین و اندازه مؤثر جمعیت می‌شود و در پی آن، کاهش اندازه جمعیت مؤثر باعث بروز تنگنای ژنتیکی می‌شود (Machado et al. 2007)، علائم تنگنای ژنتیکی در جمعیت ماهی سفید دریای خزر نیز مشاهده شده که دلیل عمده آن به استفاده از نسبت‌های جنسی نابرابر در تکثیر مصنوعی و بقای متفاوت نتاج به دست آمده از طریق کاهش اندازه مؤثر جمعیت نسبت داده شد (Rezaei 2010). تنگنای ژنتیکی باعث فشار درون آمیزی، افزایش ناهنجاری‌های مادرزادی، اختلالات کروموزومی و کاهش بقای فرزندان می‌شود (Schwartz et al. 2008) و خطر انقراض را با بیان آلل‌های زیان- آور مغلوب افزایش می‌دهد (O'Grady et al. 2006). اکثر مطالعات تنوع ژنتیکی تمرکز خود را بر روی هتروزیگوسیتی و غنای آللی قرار می‌دهند در صورتی که نتایج حاصل از آنالیز تنگنای ژنتیکی می‌تواند تصویر روشن‌تری از وضعیت ژنتیک جمعیت بویژه جمعیت‌های کوچک در اختیار کارشناسان قرار دهد.

نتیجه‌گیری

ماهیان ساکن در محیط‌های بسته معمولاً در مقابل خطر انقراض ناشی از تخریب زیستگاه آسیب‌پذیری بیشتری دارند. از آن‌جایی که *Aphanius vladykovi* گونه بومی ایران در استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد که در اثر خشکسالی و تهدیدات بیولوژیکی و زیست‌محیطی جمعیت‌های آن کاهش چشمگیری در ٤ سال اخیر داشته‌اند، لذا ضروری است تدابیر مدیریتی جهت بهینه‌سازی وضعیت زیستگاه‌های آفانیوس صورت گیرد. از طرفی تاکنون تکثیر مصنوعی آفانیوس زاگرس با موفقیت صورت نگرفته، لذا فراهم آوردن امکان تکثیر طبیعی با احیای زیستگاه‌های طبیعی آن امری ضروری به نظر می‌رسد. این بررسی دلایل و نتایج اولیه را برای وجود جمعیت‌های متمایز ماهی گورخری زاگرس نشان می‌دهد. بنابراین توجه و اقدامات جدی برای حفظ ذخایر ژنتیکی آن ضروری است.

www.SID.ir

Arshive of SID

منابع

Abedi E, Mohammadi M, Ghasemi SA (2011) Genetic diversity of Scomberomorus guttatus in persian gulf by using microsatellite markers. Oceanology 2: 15-21.

Abedi E, Zolgharnein H, Salari MA, Mohammadi M, Ghasemi SA, Archangi B, Mirza R (2010) Genetic diversity of Scomberomorus commerson in Persian gulf by using microsatellite markers. Journal of Marine Science and Technology 9 :83-91. (In farsi)

Amini F (2009) Basic of fish genetic, racing modification and biotechnology, 2nd ed In translation Genetic for fish hatchery managers (Tiv D, 1993). Jahad daneshgahi press. Tehran: 276-277. (In farsi)

Amini F, Hemmatzadeh A (2012) Chromosomal study on zagros pupfish (*Aphanius vladykovi*). Journal of Veterinary Research 67: 291-296. (In farsi)

Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI (1997) Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture Resourse 28: 829- 839.

Beaumont AR, Hoare K (2003) Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. University of Wales, Bangor, UK. published by Blackwell Science Ltd p.p: 158.

Carvalho GR, Hauser L (1995) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. G.R. Carvalho and T.J. Pitcher, (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries. London: Chapman and Hall, 55-80.

Ciftci Y, Okumus I (2002) Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science 2: 145-155.

Cimmaruta R, Angeletti D, Pontremolesi A, Nascetti G (2010) Low microsatellite variation in Aphanius fasciatus from the Tarquinia Salterns. Transitional Waters Bulletin 4: 83-93.

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.

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

Dubut V, Martin J, Costedoat C, Chappaz R , Gilles A (2009) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the freshwater fishes Telestes souffia and Telestes muticellus (Teleostei: Cyprinidae). Molecular Ecology Resourses 9 : 1001-1005.

Dunham RA (2004) Aquaculture and fisheries Biotechnology, Genetic Approaches, 2nd edition p.p: 495.

E-Reith M R, Jackson T, Robichaud, M (2004) Genetic improvement, avoiding genetic bottlenecks in broodstok selection. Global Aquaculture Advocate: 57-58.

Esmaeili HR, Piravar Z, Shiva AH (2007) Karyological analysis of two Endemic Tooth- Carp, Aphanius persicus and Aphanius sophiae (Pisces: Cyprinodontidae), from southwest Iran. Torkish Journal of Zoology 31:69-74.

Fattollahi M (2013) Outbreak of ectoparasite argulus foliaceus in broods of zagros pupfish Aphanius vladykovi in Choghakhor lagoon of Chaharmahal-o-Bakhtyari, Iran. Iranian Veterinary Journal 9 : 89-103.

Gonzalez EG, Pedraza-Lera C, Doadrio I (2014) Genetic diversity and population history of the endangered killifish Aphanius baeticus. Journal of Heredity 105: 597-610.

Hemmatzadeh A, Amini F (2012) C-, G-, NOR- and restriction enzyme- banding and DAPI staining of chromosomes of Zagros pupfish *Aphanius vladykovi*. Journal of Aquatic animals and Fisheries 3: 59-66.

Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer, EA (1996) Nucleic Acids IV:sequencing and cloning. In: Molecular Systematics (eds. Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. K.) 321-384. Sinauer Associates, Sunderland.

Hoolihan JP, Anandh, PJ, Herwerden, LV (2006) Mitochondrial analyses of narrow - barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) suggests a single genetic stock in the ROPME sea area. ICES Journal of Marinc Science 63:1066-1074.

Hossaini SA, Golzar M (2012) reproduction strategy of genus Aphanius (Teleostei: Cyprinodontidae). The Second national conference on the Caspian Sea Fisheries Resources. (In farsi)

Jewell-E AR (2006) SSR Primer and SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery. Nucleic Acids Research 34: 656-659.

Keivany Y, M-Soofiani N (2004) Contribution to the biology of zagros tooth-carp, Aphanius vladykovi (Cyprinodontidae) in central Iran. Environmental Biology of Fishes 71: 165-169.

Kimberly AS, Robert JT (2006) microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters 9: 615-629.

Li J, Wang G, Bai Z (2009) Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (Hyriopsis cumingii) estimated by microsatellite DNA markers. Journal of Biology 5: 181-190.

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.

Machado-Schiaffino G, Depico E, Garcia-Vazquez E (2007) Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. Aquaculture 264: 59-65.

Maltagliati F (1998) A preliminary investigation of allozyme genetic variation and population geographical structure in Aphanius fasciatus from Italian brackish-water habitats. Journal of Fish Biology 52: 1130-1140.

Matura R, Sharma S, Barat A, Pande V, Mahanta P C (2012) Development and characterization of microsatellite markers in Gara gutyla (Family: Cyprinidae, Pisces). Molecular Ecology Resourses 12: 185-189.

Nei M (1972) Genetic distance between populations. The American Naturalist 106: 283-292.

O'Grady JJ, Brook BW, Reed DH, Ballou JD, Tonkyn DW, Frankham R (2006) Realistic levels of inbreeding depression strongly affect extinction risk in wild populations. Biological Conservation 133: 42-51.

www.SID.ir

Arshive of SID

O'Connell M, Skibinski DO F, 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 (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

Raissy M, Barzegar M, Rahimi E, Jalali B (2008) Identification of worm parasites of fishes in Choghakhor Lagoon, Iran. The 12th world lake conference: 2177-2180.

Rezaei M (2010) Genetic diversity or Rutillus frisii kutum by using microsatellite markers, Gorgan University of Agriculture science and Natural Resource, Iran. (In farsi)

Sambrok J, Fritsch E F, Maniatis T (1989) Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press: 743-745.

Schwartz RS, May B (2008) Genetic Evaluation of Isolated Populations for Use in Reintroductions Reveals Significant Genetic Bottlenecks in Potential Stocks of Sacramento Perch. Transactions of the American Fisheries Society 137:1764-1777.

Shaklee JB, Tamaru CS, Waples R S (1982) Speciationand evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science 36: 141-157.

Shikano T, Chiyokubo T, Taniguchi (2001) Temporal changes in allele frequency, genetic variation and inbreeding depression in small populations of the guppy, Poecilia reticulate. Heredity 86: 153-160.

Strecker U (2006) Genetic difrentation and reproductive isolation in a Cyprinodon fish species Xock from Laguna Chichancanab, Mexico. Molecular Phylogenetics and Evolution 39: 865–872.

Turner TF, Gold GR (1998) What kind of genetic information is best for estimating genetic effective population size? A case study of three classes of molecular markers surveyed in Red drum (Sciaenops ocellatus) from the gulf of Mexico. Proceedings of the 50th gulf and Caribbean fisheries institute: 1043-1052.

Van Herwerden LV, Mcllwain J, Al-Ouf H, Al-Amry W, Reyes A (2006) Development and application of microsatellite markers for Scomberomorus commerson (Perciformes; Teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. Fish Research 79: 258-266.

Zane L, Borgelloni L, Patariollo T (2002) Strategies for microsatellite isolation. Molecular Ecology 11: 1-16.for microsatellite isolation. Molecular Ecology 11: 1-16.

www.SID.ir