

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

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

قاسم عسکری<sup>۱\*</sup>، علی شهبانی<sup>۱</sup>، حمیدرضا رضایی<sup>۱</sup>

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

Askari Gh<sup>\*1</sup>, Shabani A<sup>1</sup>, Rezaei HR<sup>1</sup>

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 فهلپان و سرآب بهرام استان فارس استفاده شد. در این بررسی از ۵۶ نمونه (۲۸ عدد برای هر رودخانه) استفاده شد. میانگین تعداد آلل 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. تقریباً تمامی جایگاه‌های ژنی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند. با توجه به میزان جریان ژنی بالا ( $Nm = 17/212$ ) بین دو منطقه و  $F_{st}$  پایین ( $F_{st} = 0/02$ ) 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*

## 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 می‌شود (Coad 2009)، اما زیستگاه اصلی این گونه در ایران می‌باشد. 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 آبی 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 زیست‌شناختی، 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 مرستیک 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 ریزماهواریها، آلوزایم<sup>۱</sup> و RAPD 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 ریزماهواری حاوی اطلاعات مفیدتر و پلی‌مورفیسم بیشتری می‌باشند. نشانگرهای ریزماهواری 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 پلیمرز 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 جمعیت‌شناسی این گونه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواری در سطح جهان صورت نگرفته است. به همین منظور در این تحقیق از ۶ جایگاه ریزماهواری 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 کاملاً 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

<sup>۱</sup> Random amplified polymorphic DNA

عکسبرداری قرار گرفت و بوسیله نرم افزار Gel pro analyzer طول قطعات باندها محاسبه شد.

تجزیه آماری

تعداد ال در هر جایگاه ژنی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_o$ )، هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_e$ )، تعداد ال‌های واقعی ( $N_a$ )، تعداد ال موثر ( $N_e$ )، تعادل هاردی-واینبرگ، مقادیر  $F_{st}$ ، 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 ( $H_o$ )، مورد انتظار ( $H_e$ ) و تنوع آلی 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 آلی بی‌نهایت ( $F_{st}$ ) با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزار Genealex ver.6.5 مورد استفاده قرار گرفت. به منظور 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 (جدول ۱). در سطح شش جایگاه ژنی مورد بررسی، بیشترین میزان ال مشاهده شده در سطح جایگاه GGM 027 و GGM 024 در جمعیت رودخانه سرآب بهرام، و کمترین میزان ال مشاهده شده در سطح جایگاه GGM023b در هر دو جمعیت مشاهده شد. تعداد متوسط ال مشاهده شده و موثر در جمعیت یک (رودخانه فهلان) 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

استرل 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).



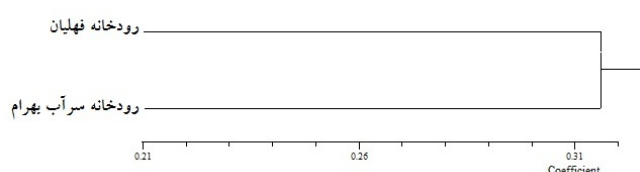
شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه برداری

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 (جدول ۱). 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 نگ 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 نیترا ت نقره رنگ‌آمیزی شد (Bassam et al. 1991). ژل رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل مورد

جدول ۱- خصوصیات جایگاه ژنی مورد استفاده در این تحقیق

| جایگاه ژنی | وزن (جفت باز) | تعداد ال | آغازگر (5'-3')                                            | دمای اتصال °C |
|------------|---------------|----------|-----------------------------------------------------------|---------------|
| MFW17      | ۱۱۲ - ۲۳۲     | ۱۱       | F: CCAACTACAGAGAAATTTTCATC<br>R: GAAATGGTACATGACCTCAAG    | ۵۵            |
| GGM023b    | ۹۶ - ۱۳۶      | ۸        | F: TCACCATCCACTGAAGACCA<br>R: GAAATATGTAACGTCATTAATTGTGTG | ۶۰            |
| GGM 024    | ۱۲۸ - ۲۰۸     | ۱۵       | F: TCCCTCTTTTGTCTCAGG<br>R: TAGGTGAACAAATGGCATGG          | ۵۴            |
| GGM007     | ۲۳۲ - ۳۰۰     | ۱۳       | F: GCTGTGCTGACTGGCACTT<br>R: CAAACCAACATTTTCATCAAAAA      | ۵۵            |
| GGM-045    | ۱۵۲ - ۲۰۰     | ۱۱       | F: TCTCATGGGTCTCTGGGTTT<br>R: TGTGCAGAAAGGCTGTTGAG        | ۵۶            |
| GGM 027    | ۱۷۶ - ۲۵۲     | ۱۳       | F: TCGGTGCACCCCTAGTAAAC<br>R: CCAAGTGTGTGTTTGGATGG        | ۵۴            |



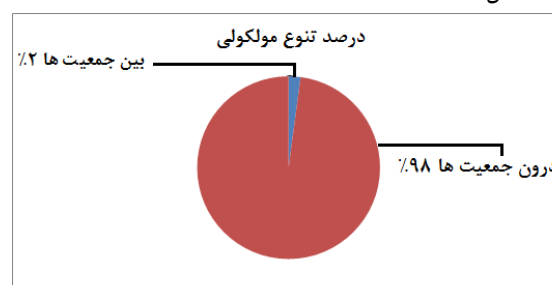
شکل ۳- مقایسه فاصله ژنتیکی دو جمعیت بر اساس دندروگرام UPGMA

طبق نظر (O'Connell 1997) تعداد ۵۰ نمونه و شناسایی بین ۵ تا ۱۰ ال در خصوص ساختار جمعیت کافی بوده و نتایج بدست آمده قابل اطمینان خواهد بود، اگرچه اندازه کم نمونه تعداد ال-های شناسایی شده در هر جایگاه را کاهش می‌دهد، اما بر ال‌های معمول و فراوانی آنها موثر نمی‌باشد. (Kanapen et al. 2006) بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Gobio gobio* با استفاده از نشانگر میکروساتلایت از ۸۲ نمونه استفاده نمودند. (et al. 2010) Durna 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 می‌رسد 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 (Avisé 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

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 (جدول ۲).

نتایج مربوط به بررسی تعادل هاردی - واینبرگ در جدول ۲ آورده شده است. از ۱۲ تست مورد بررسی (۶ جایگاه  $2 \times 2$  منطقه) ۱۱ تست بطور معنی‌داری انحراف از تعادل را نشان دادند (۰/۰۵  $P \leq$ ). 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 (شکل ۲).



شکل ۲- 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 (جدول ۵). دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند (شکل ۳) (Nei's 1978).

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جایگاه های ژنی مورد استفاده در جمعیت های مورد بررسی

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

( $N_a$  تعداد ال؛  $N_e$  تعداد ال موثر؛  $H_o$  هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛  $H_e$  هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛  $F_{IS}$  ضریب درون آمیزی؛ pHw) تست احتمال هاردی-واینبرگ ( $\chi^2$ ،  $n.s.$ ) و \*\*\* به ترتیب عدم اختلاف معنی دار در سطوح پنج، یک و یک دهم درصد).

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در  $F_{ST}$ 

| Prob  | Value | Stat     | %  | Est. Var | MS    | SS      | df  |
|-------|-------|----------|----|----------|-------|---------|-----|
|       |       |          | ۲  | ۰/۰۵۶    | ۵/۶۹۶ | ۵/۶۹۶   | ۱   |
| ۰/۰۱۰ | ۰/۰۲۱ | $F_{ST}$ | ۹۸ | ۲/۵۸۶    | ۲/۵۸۶ | ۲۸۴/۴۲۹ | ۱۱۰ |

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

اختصاصی دو گونه *Garra gotyla* و *Cyprinus carpio* استفاده شد، که تنها ۶ جایگاه شش جایگاه پلی مورفیسم را نشان دادند (Matura et al. 2011؛ Crooijmans et al. 1997). ۶ جایگاه تشخیص داده شده دارای کارایی مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه می باشند.

کاهش تعداد ال مشاهده شده در سطح جمعیت می تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind et al. 2009). در بررسی های تنوع ژنتیکی غنای الی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. بالا بودن غنای الی، نشان دهنده بالا بودن اندازه موثر جمعیت می باشد (Diz and Presa 2009). در این بررسی متوسط ال مشاهده شده ۱۱/۴۱ برای هر جایگاه بدست آمد (جدول ۲). متوسط ال مشاهده شده برای ماهیان آب شیرین ۹/۱ (DeWoody and Avise 2000). Knapen et al. (2006) متوسط ال مشاهده شده برای

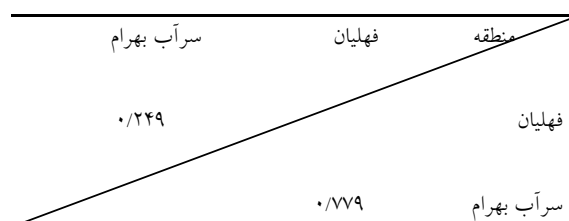
پایه ای برای توانایی تکامل جمعیت ها است. اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه ها، نقش اساسی در حفاظت و بهره برداری پایدار از آنها دارد.

ریز ماهواره ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که بطور گسترده در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می شوند (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 می دهند (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

جدول ۴- 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



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

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 (جدول ۲). انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را می‌توان به علت آمیزش خویشاوندی بین گونه‌ها، پهلویی تعداد محدودی از الل‌ها، ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها و خطای نمونه- برداری دانست (Callen et al. 1993; McQuown et al. 2003; Skalla et al. 2004; Zhao et al. 2005; Dahle et al. 2006; Li

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 می- باشد (Diz and Presa 2009). متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جمعیت‌های مورد بررسی به ترتیب ۰/۴۹۷ و ۰/۸۴۷ بدست آمد (جدول ۲). 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 و ۰/۶۶۸ گزارش کردند. (2011) Matura et al. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را برای گونه *Garra gotyla* به ترتیب ۰/۵۷۵ و ۰/۷۳۹ گزارش

## منابع

- Avice 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) Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)<sub>n</sub> 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) Freshwater fishes of Iran. [www.briancoad.com](http://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, Avice 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.

(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 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 هرگاه  $Nm < 1$  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 الی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی - واینبرگ و شاخص  $F_{st}$  می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دو جمعیت مجزا در این رودخانه‌ها وجود دارد که دارای جریان ژنی نسبتاً 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.

- 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) Microsatellite 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.