

**بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*)
در چشمه مادر و دختر و چشمه چهل گزی 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
Chaharmahal-o-Bakhtiari Province by using microsatellite
markers**

سیده آمنه حسینی^{۱*}، علی شهبانی^۱، حمیدرضا رضایی^۱

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

Hosseini SA^{*1}, Shabani A¹, Rezaei HR¹

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: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*) که ماهی کوچکی از خانواده کپور دندان داران و بومی استان چهارمحال و بختیاری است، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت. بدین منظور تعداد ۴۶ قطعه ماهی در پاییز ۹۰ از چشمه چهل گزی و چشمه مادر و دختر جمع آوری شد. در این بررسی از ۶ جایگاه ریزماهواره چندشکل استفاده شد. تعداد آلل مشاهده شده در جمعیت ها به طور میانگین ۱۱/۴۱ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در چشمه چهل گزی ۰/۹۹۳ و در چشمه مادر و دختر ۰/۹۵۷ محاسبه شد که نشان می دهد 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 جمعیت ها نشان داد و فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها ۰/۳۲۲ محاسبه شد. جریان ژنی بین دو منطقه ۱۹/۰۹۷، نسبتاً بالا بوده و می تواند 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 جمعیت های متمایز ماهی گورخری زاگرس نشان می دهد، بنابراین توجه و اقدامات جدی برای حفظ ذخایر ژنتیکی آن ضروری است.

واژه های کلیدی

Aphanius vladykovi
تنوع ژنتیکی
چهارمحال و بختیاری
ریزماهواره

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 به کار می‌روند. اغلب یوری‌ترم، یوری-هالین و مقاوم به کمبود اکسیژن بوده اما آب‌های خشتی 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 طبیعی¹ (IUCN) برای برنامه‌های حفاظت ذخایر است (Lucentini et al. 2009). بنابراین حفظ بقای هر جامعه، از اهداف اساسی در زیست‌شناسی حفاظت است.

ریزماهورها یکی از مهم‌ترین نشانگرهای ژنتیکی به شمار می‌آیند، 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 ریزماهور بر اساس آن طراحی می‌شود، آلل‌های متعددی یافت می‌شود، این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی قابلیت بالایی دارد. پایداری ریزماهورها احتمالاً از طریق پایداری ژنوم در کلیه سطوح کنترل می‌شود، 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 ریزماهورها را تحت تأثیر قرار دهند (Jewell 2006). لذا تنوع ریزماهورها 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 قزل‌آلا 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 آبی 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

گندمان با موقعیت جغرافیایی $31^{\circ}52'18''N$ و $31^{\circ}52'18''E$ و $51^{\circ}09'31''E$ و چشمه چهل گزی در نزدیکی روستای باستانی بیژگرد با موقعیت جغرافیایی $31^{\circ}47'04''N$ و $30^{\circ}29'E$ در پاییز سال ۱۳۹۰ صورت گرفت (شکل ۲). باله پستی 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 پلیمرز استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم (Hillis et al. 1996) صورت گرفت. DNA استخراج شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر $-20^{\circ}C$ 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 پلیمرز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و دمای بهینه برای هر یک به دست آمد (جدول ۱). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد جداسازی شده و در نهایت ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Sambrook 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.

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 (۲n) برابر ۴۸ بوده که مشابه دیگر گونه‌های این جنس از جمله *A. dispar*, *A. ginaonis*, *A. persicus* است که تاکنون بررسی شده‌اند (Esmaeili et al. 2007; Amini and Hemmatzadeh 2012). همچنین بررسی نواری‌های گوناگون بر روی کروموزوم‌های *Aphanius vladykovi* که برای نخستین بار در ایران بر روی یک گونه آبی 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 ۶ جفت آغازگر ریزماهواره پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

بررسی مناطق و نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در استان چهارمحال و بختیاری از ۲۳ عدد ماهی آفانیوس زاگرس در هر منطقه، چشمه مادر و دختر در شهرستان

جدول ۱- خصوصیات جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های کپوردندان زاگرس

جایگاه	توالی آغازگر (۵' - ۳')	دمای اتصال ($^{\circ}C$)	وزن (bp)
BA9(F)	F: CACGCTCCTTTGGGGAAGCCTA R: GCCGTCTGCCTGTTTGCCTTTATC	۶۲	۲۵۰-۳۶۳
CmD1(F)	F: AATGGATGGTGTGAATGGC R: GGATGGATACAGAGCAGCAC	۵۵	۱۶۸-۲۲۵
GATA2(F)	F: TCGGATGCTCAGTCAGTACG R: ATGAACAACGAGTCACACGC	۵۲	۱۹۲-۲۳۱
AC4(T)	F: CTGCTGCAGTCTGCAC R: TCACCTCCAAGGTTAGTCAT	۴۴	۱۳۴-۱۶۲
BL2-114	F: ATCACTGCCATTTTATTA R: CTGCTCCGCTCTGTTCCA	۵۰	۲۸۸-۳۸۰
GGM024	F: TCCCTCTTTTGGTCTCAGG R: TAGGTGAACAAATGGCATGG	۵۵	۱۴۰-۱۸۲

جدول ۲- تنوع ژنتیکی ۶ جایگاه ژنی مورد مطالعه در جمعیت‌های آفانیوس زاگرس

GGM024	BL2-114	AC4(T)	GATA2(F)	CmD1(F)	BA9(F)	
۸	۱۵	۷	۱۰	۷	۱۸	Na
۵/۳۴۳	۱۲/۳۰۲	۶/۱۱۶	۶/۹۶۱	۳/۳۹۱	۱۳/۳۹۲	Ne چشمه چهل گزی
۱	۱	۰/۹۵۷	۱	۱	۱	Ho
۰/۸۱۳	۰/۹۱۹	۰/۸۳۶	۰/۸۵۶	۰/۷۰۵	۰/۹۲۵	He
-۰/۲۳۰	-۰/۰۸۸	-۰/۱۴۴	-۰/۱۶۸	-۰/۴۱۸	-۰/۰۸۱	Fis
۱۰	۱۵	۸	۸	۱۳	۱۸	Na
۶/۶۵۴	۱۱/۱۳۷	۵/۸۷۸	۵/۹۴۴	۹/۸۸۸	۱۲/۹۰۲	Ne چشمه مادر و دختر
۱	۱	۱	۰/۷۳۹	۱	۱	Ho
۰/۸۵۰	۰/۹۱۰	۰/۸۳۰	۰/۸۳۲	۰/۸۹۹	۰/۹۲۲	He
-۰/۱۷۷	-۰/۰۹۹	-۰/۲۰۵	۰/۱۱۱	-۰/۱۱۳	-۰/۰۸۴	Fis

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 شده است. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در چشمه چهل گزی 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 چهل گزی دیده شد. از بین آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، BL2 دارای بیشترین محدوده باندی از اندازه آللی ۲۵۲ تا ۳۴۸ جفت باز و جایگاه AC4 دارای اندازه آللی ۱۳۶ تا ۱۶۴ بودند. در این

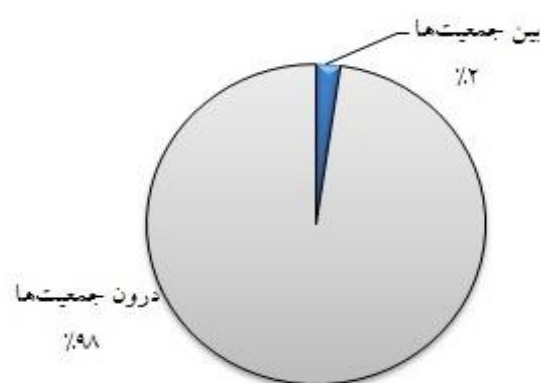
بین جایگاه دارای اندازه آللی ۱۷۲ تا ۲۲۰، BL2 دارای اندازه آللی ۳۰۸ تا ۳۷۲، GATA2 دارای اندازه آللی ۱۹۲ تا ۲۳۲ و GGM024 دارای اندازه آللی ۱۴۴ تا ۱۸۰ جفت باز بودند. در این مطالعه دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۷۳۹ تا ۱، با میانگین ۰/۹۷۵ بود که در این بین Ho جایگاه AC4 در جمعیت چشمه چهل گزی برابر ۰/۹۵۷ 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 ۰/۸۷۴ به دست آمد که بیشترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی BA9 و کمترین مقدار مربوط به جایگاه CmD1 در جمعیت چشمه چهل گزی 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.

جدول ۳- نتایج آزمون X^2 برای تعادل هاردی- واینبرگ در ۶ جایگاه آللی

منطقه	عوامل تعادل X^2	BA9	CmD1	GATA2	AC4	BL2-114	GGM024
چشمه چهل گزی	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
	معنی دار بودن	***	***	*	ns	***	**
چشمه مادر و دختر	درجه آزادی	۱۵۳	۷۸	۲۸	۲۸	۱۰۵	۴۵
	آزمون مربع کای	۲۲۴	۱۳۳	۴۶	۴۹	۱۲۸	۷۳
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۱۶	۰/۰۰۸	۰/۰۶۶	۰/۰۰۵
	معنی دار بودن	**	***	ns	*	ns	*

ns, **, ***, به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و معنی دار در سطوح پنج، یک و یکدهم درصد.

درصد تنوع ملکولی



شکل ۲- چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده تحت معیار F_{st}

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 جمعیت‌های 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 *Ichthyophthirius multifiliis* 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 ۱۱/۴۱ محاسبه شد که بیش از میانگین تعداد آلل هر جایگاه در ماهیان آب شیرین (۷/۵) (Dewoddy 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 $N_e = p(1-p) / 2N_e$ که p فراوانی آللی و N_e

جدول ۴- 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	۲۴/۴۳۸	۲/۹۵۶	۱۷/۱۷۳	۲۸/۴۳۵	۲۶/۱۴۹	۱۵/۴۳۰	۱۹/۰۹۷
Fst	۰/۰۱۰	۰/۰۷۸	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۶	۰/۰۲۳

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 ۰/۹۷۵ برآورد شد که بیش از میانگین Ho در ماهیان آب شیرین است که توسط Dewoody and Advise (2000) برابر ۰/۴۶ محاسبه شد. هتروزیگوسیتی بالا می‌تواند به دلیل آغازگرهای به کار رفته باشد. از طرفی این پارامتر با موفقیت تولیدمثل در طول دوره زندگی در هر دو جنس نر و ماده همبستگی دارد (Dewoody and Advise 2000) که این امر نشان می‌دهد دوره تولیدمثل طولانی آفانیوس دلیلی بر موفقیت تولیدمثل 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 دوجندان 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 ۷۵ درصد جمعیت را جنس ماده و ۲۵ 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 هتروزیگوسیتی است.

جدول ۵- تجزیه تنگنای ژنتیکی

جمعیت‌ها	(P) ویلکاکسون	(P) تست Sign	He/Hd
چشمه چهلگری	۰/۰۰۷	۰/۰۴۷	۶/۰
چشمه مادر و دختر	۰/۰۰۷	۰/۰۴۷	۶/۰

(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 جمعیت‌های 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. $Fst < ۰/۰۵$ 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 ۱۹/۰۹۷ وجود دارد. البته احتمال دارد این مقدار بالای جریان ژنی مربوط به ارتباط آبی این دو

منطقه در گذشته و یک جمعیت بودن سابق آن‌ها باشد. اما قطعاً آنچه تأثیرگذار است نحوه محاسبه آماری جریان ژنی می‌باشد که با وجود این که شاخص تمایز ژنتیکی، تمایز اندک یعنی دو درصد را نشان می‌دهد. اما به دلیل 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 زیان‌آور 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 vladikov* گونه بومی ایران در استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد که در اثر خشکسالی و تهدیدات بیولوژیکی و زیست‌محیطی جمعیت‌های آن کاهش چشمگیری در ۴ 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.

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 vladkovi*). *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 Resource* 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 Resources* 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 broodstock 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 vladkovi* 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 vladkovi*. *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 vladkovi* (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 Resources* 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.

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 of *Rutilus frisii kutum* by using microsatellite markers, Gorgan University of Agriculture science and Natural Resource, Iran. (In farsi)

Sambrook 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) Speciation and 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 reticulata*. *Heredity* 86: 153-160.

Strecker U (2006) Genetic differentiation 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, McIlwain 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.