مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۲۳-۱۱۴

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت (*Barbus grypus*) در رودخانه کرخه استان خوزستان و گونه پرورشی آن با استفاده از نشانگر ریزماهواره

Study on the genetic diversity of *Barbus grypus* in Karkheh river in Khuzestan province and a cultured species by microsatellite marker

[۱]محبوبه کرمی‌نسب, [۲]زینب حسین نیا *, [۳]حامد کلنگی میاندره, [۴]علی شعبانی

Mahbobe Karami nasab[1], Zeinab Hosseinnia*[۲], Hamed Kolangi Miandare[3],Ali Shabany[4]

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ۳- استادیار ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

1&2- MSc. Students 3- Assistant Professor 4- Associate Professor
Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment,
Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
Gorgan, Golestan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: z.hosseinnia@yahoo.com

(تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰)

چکیده

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) از خانواده *Cyprinidae* می‌باشد که در منابع آبی غرب و جنوب‌غرب ایران به‌ویژه آب‌های استان خوزستان حضور گسترده‌ای دارد. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت رودخانه کرخه با نمونه پرورشی آن با استفاده از ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره‌ای می‌باشد. در پاییز ۱۳۹۱، ۶۰ نمونه ماهی از دو منطقه جهت این بررسی، صید شد. طبق نتایج به‌دست آمده متوسط میزان F_{st}، ۰/۲۸ به دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد. دربررسی تعادل هاردی-واینبرگ، نمونه‌ها دراکثر لکوس‌ها انحراف از تعادل را نشان دادند. همچنین میزان نسبتاً بالایی ازجریان ژنی بین جمعیتها مشخص گردید. تنوع ژنتیکی دو منطقه، شامل کرخه تعداد الل در جایگاه: N_a= ۱۰/۲۸۶، تعدادالل مؤثر: N_e=۶/۷۸۹، هتروزیگوسیتی مشاهده شده: H_o= ۰/۶۹۱، هتروزیگوسیتی موردانتظار: H_e= ۰/۸۴۰ و پرورشی N_a= ۱۳/۲۸۶، N_e=۹/۱۴۱، H_o= ۰/۸۰۰، H_e= ۰/۸۸۳ نیز تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین آنالیز واریانس با استفاده از داده‌های ژنی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیت‌ها وجود داشته و بخش اصلی تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج بدست آمده در این پژوهش پیش از انجام آن، در گونه پرورشی با توجه به رعایت موارد اصلاح نژادی در مراکز تکثیر تقریباً قابل پیش بینی و مشخص بود.

واژه‌های کلیدی

تعادل هاردی- واینبرگ
تنوع ژنتیکی
ریزماهواره
ماهی شیربت
Barbus grypus

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

مقدمه

جهت بهره‌برداری پایدار از ذخایر ارزشمند ماهیان، نیاز به شناخت کافی از وضعیت ذخایر گونه‌ها، نژادها و جمعیت‌های متعدد آن‌ها می‌باشد تا اعمال مدیریت بهره‌برداری در جهت کمک به حفظ ذخایر، رهاسازی بچه ماهی‌ها و کاهش فشار صیادی بر اساس اصول علمی بنا گردد (رضوانی گیل کلائی و همکاران، ۱۳۸۸). درحال حاضر، بسیاری ازگونه های درمعرض خطر برای محفوظ ماندن از خطر انقراض، نیاز به تکثیر مصنوعی دارند، زیرا به علت تأثیرات مستقیم یا غیرمستقیم انسانی، همچون از دست رفتن زیستگاه‌ها، بهره‌برداری بیش از حد، آلودگی، معرفی گونه-های شکارچی و رقیب و یا ورود بیماری‌ها قادر به بقا در محیط-های طبیعی نامناسب نیستند. درآینده نیز، گونه‌های بسیار بیشتری به این وضعیت دچار خواهند شد (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; IUCN, 2006). بنابراین، جهت تحقق اهداف مدیریتی، مطالعات مولکولی جمعیت روی ماهی‌ها انجام می‌گیرد (Park and Moran, 1995; Allenford *et al*. 1987). آگاهی از میزان ذخایر ژنی و تنوع ژنتیکی در بین افراد یک گونه، از اهداف ارزشمند مدیریت ذخایر و اصلاح نژاد است؛ به‌طوری که بررسی ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان اقتصادی، برای حفاظت از جمعیت آن‌ها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang *et al*. 2007). در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک صورت می‌گرفت اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و اثرهای منفی دست‌کاری در نشانه-گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده ازمارکرهای مولکولی همچون ریزماهواره ها و آلوزایم جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت. در این میان، نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده تری نسبت به سایر نشانگرها دارند. جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، توالی‌های کوتاه و تکراری DNA هستند که دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی هستند (Angers and Bernatchez, 1998). ریزماهواره‌ها به‌علت بالا بودن تعداد الل‌هایشان، در بین تمام نشانگرها، بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (Liu, 2007). این چند شکلی بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (Dunham, 2004). در واقع این نشانگرها ارزش بالایی داشته به طوری که علاوه بر فراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرار شونده در آن‌ها بالاست که دلیل آن را می‌توان به نرخ بالای جهش در این نشانگرها نسبت داد. ازطرفی به علت همبارزبودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر نشان داده، لذا میتوان اذعان نمود که این نشانگرها در بررسی‌های جمعیتی ماهیان بر برخی معایب روش‌های دیگر غلبه دارند (Verspoor and Jordan, 1989) مطالعات تنوع ژنتیکی زیادی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفته است. رضایی(۱۳۸۸) در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۸۱ گزارش نمود. همچنین، چکمه دوز و همکاران (۱۳۸۷) در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بهاره و پاییزه ماهی سفید در دریای خزر با نشانگر ریزماهواره، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار را به‌ترتیب در محدوده ۰/۹۶-۰/۲۱ گزارش نمودند که بالا بودن دامنه هتروزیگوسیتی در ماهی سفید دریای خزر را بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این ماهی دانستند. پامپولی و همکاران (۲۰۰۶) به‌مقایسه تنوع ژنتیکی روغن ماهی اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) پرورشی با نوع وحشی آن پرداختند. نتایج حاکی از کاهش مقدار متوسط الل و تنوع اللی نمونه‌های پرورشی نسبت به نمونه‌های وحشی بود که دلیل آن را کاهش تعداد مولدین موثر دانستند. بائی و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره به‌بررسی تنوع ژنتیکی ۴ جمعیت پرورشی باس دهان‌بزرگ (*Micropterus salmoides*) و مقایسه آن با نمونه‌های وحشی پرداختند. با توجه به کاهش شدید تنوع آللی و کاهش هتروزیگوسیتی که همراه با علائمی از کاهش N_e نیز بود به این نتیجه رسیدند که تنگنای ژنتیکی رخ داده است.

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) از خانواده *Cyprinidae* بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین (Nelson, 1994) و یکی از گونه‌های بومی می‌باشد که در حوضه آبریز خلیج فارس، رودخانه‌های دشت خوزستان و حوزه‌ی رودخانه‌های دجله و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

فرات پراکنش دارد (Dorostghoal *et al.* 2009). این ماهی بنتوپلازیک و ساکن آب‌های شیرین در مناطق تحت حاره ای می‌باشد و یک گونه همه‌چیزخوار بوده که در سنین بالا به رژیم گوشتخواری روی می‌آورد. این گونه دارای اهمیت اقتصادی در میان مردم محلی است و یک گونه مهم تجاری در آبزی پروری ایران به‌شمار می‌رود. برخی از گزارشات نشان می‌دهد که جمعیت این گونه در رودخانه‌های خوزستان کاهش یافته است (نیک‌پی، ۱۳۷۵). با وجود اهمیت این ماهی متاسفانه تاکنون آگاهی‌هایی درمورد تنوع ژنتیکی این گونه در میان مناطق مختلف منتشر نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی وضعیت ژنتیکی ماهی شیربت در رودخانه کرخه و مقایسه آن با نمونه‌های پرورشی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در پاییز ۱۳۹۱ تعداد ۳۰ عدد ماهی شیربت از رودخانه کرخه و ۳۰ عدد از مرکز تکثیر ماهیان گرمابی اهواز جمع‌آوری شد. حدود ۳ گرم از باله سینه‌ای هر ماهی جداسازی و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک مطلق نگهداری شد. سپس نمونه‌ها برای استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم انجام پذیرفت(Hillis *et al.* 1996) . DNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر تا زمان انجام مطالعات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگارز یک درصد و روش اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت از جایگاه‌های ژنی Bbar11، Bl1-153، GATA20، GGM024، MFW7، MFW26 و MFW2 استفاده شد (جدول ۱). تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل: ۱۵ نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۵۰ نانوگرم از نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی *Taq* پلیمراز(Fermentas)، بافر PCR ۱۰X(Fermentas)، ۱/۵ میلی-مولار کلریدمنیزیم و آب‌مقطر تا رسیدن به حجم، انجام گرفت. چرخه دمایی برای هرجایگاه ژنی عبارت بود از: یک مرحله ابتدایی ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته-سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به‌مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه (بسط) و یک مرحله انتهایی ۷۲ درجه‌ای به‌مدت ۳ دقیقه به‌عنوان مرحله بسط نهایی. محصولات واکنش PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. از نشانگر اندازه DNA (Ladder 50bp fermentas) به‌عنوان شاخص برای تعیین اندازه اللی استفاده شد. در ادامه، ژل‌ها به‌روش نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شدند (Bassam *et al.*, 1991) و پس از تهیه تصویر آن‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD)، از نرم‌افزار Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تعداد الل مشاهده شده ، الل موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) و تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Genealex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه شد. به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی براساس مدل اللی بی‌نهایت (F_{st}) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزاری Genealex استفاده شد. تعیین فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I)(Nei, 1978) و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA و نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh *et al.* 1999) صورت گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

جدول۱- خصوصیات جایگاه های ژنی مورد استفاده در این مطالعه

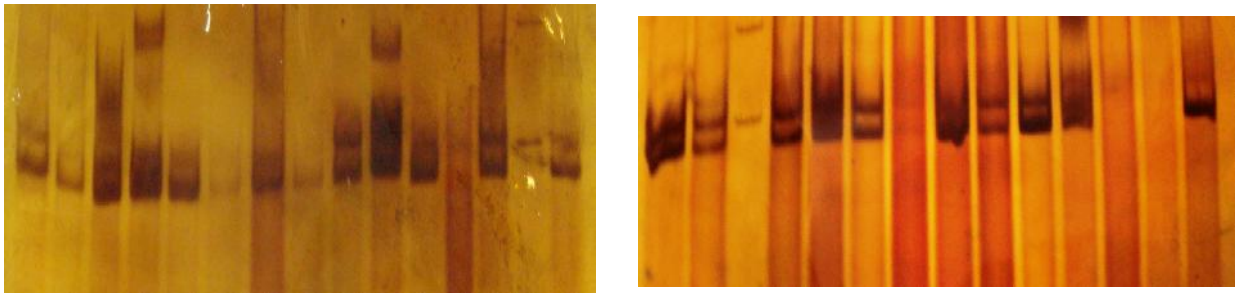
Table 1: Specifications of genetic loci that are used in this study

دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temp. (°C)	اندازه اللی (bp) Allele size	توالی sequence	جایگاه ژن Locus
49	116-216	F: GCGGAGGAAGAGAAACACAG R: CTATGCCATTGCCACACATC	Bbar11
56	168-244	F: GCACAGCTCTAATCGGTCACT R:TATGGTCAAACACGGGTCAA	Bl1-153
54	76-144	F: AATCATGGCGATGGAAAGAC R: AATGACACTTCACATCTAGC	GATA20
55	116-184	F: TCCCTCTTTTTGCTCTCAGG R: TAGGTGAACAAATGGCATGG	GGM024
58	156-212	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	MFW2
59	116-172	F: TACTTTGCTCAGGACGGATGC R: ATCACCTGCACATGGCCACTC	MFW7
48	120-200	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGGATGCAAAAG	MFW26

نتایج

هر ۷ جایگاه ژنی مورد استفاده در این بررسی پلی مورفیسم را نشان دادند (شکل ۱). تعداد الل‌های مربوط به تمامی جایگاه‌های چندشکل در جدول (۲) نشان داده شده است. تعداد کل الل در سطح جایگاه در دامنه ۱۸-۸ به‌دست آمد بطوری‌که جایگاهGGM024پایین‌ترین (۸ الل) و Bbar11(۱۸ الل) بالاترین تعداد الل را نشان دادند. تعداد متوسط الل‌های مشاهده شده و موثر در کرخه به‌ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۶/۷۸۹ و در جمعیت پرورشی ۱۳/۲۸۶ و ۹/۱۴۱ به‌دست آمد که از این نظر بین مناطق هدف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e)به‌ترتیب در دامنه ۰/۳۶۰-۱/۰۰۰ (متوسط: ۰/۷۴۶) و ۰/۷۵۰-۰/۹۲۱ (متوسط: ۰/۸۶۱) قرار داشت. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح مناطق نیز به ترتیب ۰/۶۹۱-۰/۰۷۸ برای کرخه و پرورشی به‌دست آمد. همچنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و موردانتظار، مشاهده نشد($P>0/05$). در بررسی نمونه‌ها از نظر تعادل هاردی-واینبرگ تمام نمونه‌های دو منطقه (۱۴ نمونه) انحراف از تعادل را نشان دادند. در این بررسی ضریب تصحیح بونفرونی اعمال شد. متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و جریان ژنی (N_m) به ترتیب ۰/۱۳۶ و ۱۰/۷۸۱ به‌دست آمد. از نظر تمایز بین مناطق میزان شاخص F_{st} و R_{st} بر اسا تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) به ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۱۸۸ به‌دست آمد. همچنین نتایج براساس AMOVA نشان داد که ۹۷ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها وتنها ۳ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها می‌باشد (شکل ۲). براساس معیار فاصله ژنتیکی Nei میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه ۰/۶۴۷ و مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۴۳۵ به‌دست آمد. دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه به‌طور کامل مجزا قرار دارند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]



شکل ۱- تصویر نشانگرهای ریزماهواره ماهی شیربت در جایگاه‌های MFW2 و Bl1-153

Figure 1 . Microsatellite profiles of *Barbus grypus* at loci MFW2 and Bl1-153

جدول۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه درجمعیت‌های ماهی شیربت

Table 2: Genetic variability of microsatellite loci in two populations for *Barbus grypus*

MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	Bl1-153	Bbar11		
9	10	11	8	10	13	11	N_a	کرخه
4.980	6.614	7.962	3.994	7.310	10.504	6.158	N_e	
0.360	0.640	0.880	0.520	0.760	0.960	0.720	H_o	
0.799	0.849	0.874	0.750	0.863	0.905	0.838	H_e	
***	***	**	**	***	***	**	pHw	
13	13	13	9	12	15	18	N_a	پرورشی
8.929	9.124	10.246	5.274	7.622	10.163	12.626	N_e	
0.680	0.920	0.800	0.800	0.760	0.640	1.000	H_o	
0.888	0.890	0.902	0.810	0.869	0.902	0.921	H_e	
***	***	***	**	***	**	***	pHw	

N_a: تعداد الل‌های مشاهده شده؛ N_e: تعداد الل‌های مؤثر؛ H_o: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ F_{is}: ضریب درون‌آمیزی؛ pHw: تست احتمال تعادل هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، *: P≤۰/۰۵، **: P≤۰/۰۱، ***: P≤۰/۰۰۱)

Na, number of observed alleles; Ne, number of effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; Fis, fixation indices; PHW, Hardy-Weinberg probability test
(*P < 0.05, **P <0.01, ***P < 0.001, n.s, non-significant).

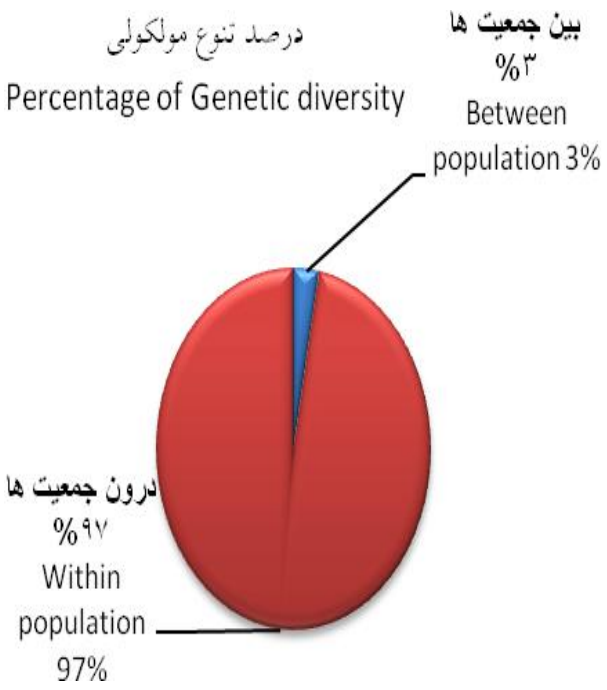
جدول۳- میزان Fst (ضریب تمایز) ، Fis (ضریب درون آمیزی)، Nm (جریان ژنی) در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه

Table 3. Nm, F_{st} and F_{is} index of five microsatellite loci in two populations for *B. grypus*

میانگین Average	MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	Bl1-153	Bbar11	جایگاه ژنی Locus
0.028	0.034	0.021	0.018	0.046	0.036	0.010	0.035	F_{st}
0.136	0.384	0.103	0.054	0.154	0.122	0.114	0.022	F_{is}
10.781	7.077	11.945	13.543	5.242	6.724	24.021	6.912	N_m

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]



شکل۲- تنوع ژنتیکی بدست آمده براساس معیار Fst

Figure 2. The distribution of genetic diversity on

F_{st} standard

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

بحث

تنوع ژنتیکی به‌عنوان پایه‌ای برای توانایی تکامل جمعیت‌هاست. دانسته‌های مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، نقشی اساسی درحفاظت و بهره‌برداری پایدار از آن‌ها دارد. عملیات آبزی‌پروری می‌تواند روی تنوع ژنتیکی یک گونه اثرگذار باشد (Norris *et al*. 1999). اندازه کوچک جمعیت و برنامه‌های کنترل نشده تکثیرمصنوعی، ازعوامل اصلی از کاهش تنوع ژنتیکی درگونه‌های پرورشی است (Hansen *et al*. 2000)، بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی باید به‌عنوان اولویت اصلی در برنامه‌های تکثیرحمایتی درنظرگرفته شود.

ریزماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که بصورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌گردند (Liu *et al*. 2009). درواقع، این نشانگرها ارزش بالایی دارند؛ به‌طوری که علاوه برفراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرارشونده درآنها بالاست که علت آن را میتوان به نرخ بالای جهش دراین نشانگر نسبت داد و از طرفی، به‌دلیل همبارز بودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر از سایر نشانگرها نشان می‌دهد(Liu and Cordes, 2004).

با وجود اهمیت بالای اقتصادی و تجاری ماهی شیربت، این گونه فاقد آغازگر طراحی شده اختصاصی می‌باشد. در این بررسی جهت مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیربت رودخانه کرخه وپرورشی از ۷ نشانگر ریزماهواره‌ای استفاده شد که همگی پلی-مورف بودند. کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگرکاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind *et al*. 2009). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. درواقع، بالا بودن غنای اللی، نشاندهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت بوده، استفاده از غنای اللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه-های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (Diz and Presa, 2009). دراین بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های کرخه و پرورشی به‌ترتیب ۰/۶۹ و۰/۸۰به‌دست آمد، که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین (۰/۴۶) (Dewoody and Avise, 2000) بالاتر می-باشند اما بین دو جمعیت از این نظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p< 0.05$).

در بررسی‌های تنوع ژنتیکی وخصوصا در مورد گونه‌هایی که تحت برنامه‌های تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر قرار دارند، هتروزیگوسیتی نمی‌تواند شاخص مناسبی برای نشان دادن وضعیت ژنتیکی باشد (Petit *et al*. 1998). تعداد متوسط الل واقعی در سطح جمعیت‌های کرخه و پرورشی به‌ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۱۳/۲۸۶محاسبه شد که تفاوت معنی داری از این نظر بین دو جمعیت مورد بررسی مشاهده نشد و این مقادیر بیشتر از مقدار محاسبه شده برای ماهیان آب شیرین (۷/۵) (Dewoody and Avise, 2000) بود. این مقدار به‌شدت تحت تاثیر تعداد نمونه‌ها می‌باشد، بر همین اساس، این امکان وجود دارد که در آزمایشات گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت تعداد الل‌های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین بدست آید. وجود حداقل تعداد ۳۰ نمونه می تواند تعداد الل‌های واقعی را در بررسی‌های ریزماهواره نشان دهد (Goldstien and Scholottor, 1999; Silva and Russo, 2000; Peakall and Smous, 2006). تعداد الل مؤثر در همه جایگاه‌ها کمتر از الل مشاهده شده می‌باشد که علت این امر محدود بودن تعداد مولدین مؤثر در عملیات تکثیر مصنوعی و امکان از دست رفتن الل‌ها در طی زمان می‌باشد. این نتایج نشان می دهد که به‌رغم مسائلی همچون تکثیر مصنوعی ماهی شیربت و فشار صید، تنوع ژنتیکی این ماهی در سطح قابل قبولی قرار دارد.متأسفانه علی‌رغم مزایای تکثیر مصنوعی، این روش در دراز مدت می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر ژنی بومی گردد (Blanchet *et al*. 2008). با اینکه انتظار می‌رود میزان الل واقعی و هتروزیگوسیتی در جمعیت پرورشی کمتر از جمعیت وحشی باشد اما از این نظر اختلاف معنی داری بین این جمعیت‌ها مشاهده نشد که این می‌تواند به علت وقوع درون آمیزی در جمعیت کرخه باشد که دلیل آن وجود تنگنای ژنتیکی می‌باشد که این امر در طولانی مدت باعث روند کاهشی در تنوع ژنتیکی جمعیت می‌شود. در صورت بزرگ بودن بیش از اندازه جمعیت، تصادفی بودن آمیزش‌ها و عدم وجود جهش، بهگزینی و مهاجرت (جابجایی ماهیان از یک جمعیت به جمعیت دیگر)، فراوانی آللی و ژنوتیپی می‌تواند از نسلی به نسل دیگر ثابت بماند که تحت عنوان تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌شود. در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini *et al*. 2006). در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، همه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

موارد انحراف از تعادل را نشان دادند که ضریب تصحیح بونفرونی در این بررسی لحاظ شد. انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ می‌تواند علل متعددی داشته باشد. رضایی (۱۳۸۸) با بررسی جمعیت‌های ماهی سفید، علت انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ را عملیات تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر عنوان کرد. Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی *Acipenser sinensis* انحراف را به وجود آلل‌های صفر و تلاقی خویشاوندی نسبت دادند. در واقع وجود الل‌های صفر در ماهی پدیده‌ای کاملاً عادی می‌باشد و وجود این الل‌ها در توارث میکروستلایت در ماهیان مورد تأیید قرار گرفته است (Rodzen and May, 2002 Appleyard) و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ساختار ژنتیکی تن‌ماهی چشم‌درشت (*Thunnus obesus*) انحراف از تعادل هاردی_واینبرگ را مربوط به خطای نمونه‌گیری دانست. در اینجا علاوه بر دلایل ذکر شده، انحراف از تعادل را می‌توان به غیراختصاصی بودن آغازگرها یا تعداد کم نمونه نیز نسبت داد.

در این بررسی متوسط میزان F_{is}، ۰/۱۳۶ به‌دست آمد و چون این مقدار بیشتر از صفر است می‌تواند دال بر آمیزش خویشاوندی و اختلاط بین جمعیت‌ها باشد (Wright, 1951). آمیزش خویشاوندی از جمله ملاحظات اصلی در جمعیت‌های ماهیان به‌شمار می‌رود که می‌تواند باعث کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش میزان بقاء و عدم مقاومت در برابر بیماری‌ها و در نهایت به خطر انداختن جمعیت‌ها می‌گردد (Fergusen, 1995). میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر اطلاق می‌شود که هرچه این میزان بین دو منطقه بیشتر باشد به این معنی است که مهاجرت بین دو منطقه بیشتر و اختلاف ژنتیکی کمتر و میزان تنوع ژنتیکی در دو منطقه بیشتر می‌شود (Rezvani Gilkolaei, 2009; Beacham *et al*. 2004). هرگاه $N_m > ۱$ باشد، جریان ژنی اصلی‌ترین عامل ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $N_m < ۱$ باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود (Li *et al*. 2007). از این‌رو نتایج به‌دست آمده نشان دهنده این است که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها جریان ژنی با میزان ۱۰/۷۸۱ بوده و دلیل مشاهده تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های این گونه را می‌توان وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها دانست. احتمالاً دلیل بالا بودن جریان ژنی را می‌توان انتخاب تصادفی و استفاده از تعداد زیاد مولدین جهت تکثیر اعلام کرد. در مراکز تکثیر ماهی شیربت عمدتاً سالانه تعداد زیادی مولد از رودخانه‌ها صید می‌شود که این امر موجب افزایش جریان ژنی خواهد شد.

در بررسی‌های جمعیتی میزان F_{st} به عنوان یک شاخص مهم جهت تفکیک و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها به کار می‌رود (Ballox and Moulin, 2002). یکی از مهمترین و هدفمندترین موضوعات در تحقیقات روی جمعیت‌های گونه‌های مختلف نیز دست‌یابی به اختلاف فراوانی اللی میان جمعیت‌ها یا به عبارتی همان F_{st} به عنوان مقیاسی از تنوع جمعیتی است. هرگاه میزان F_{st} کمتر از ۰/۰۵ باشد، نشان دهنده وجود تمایز کم، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ نشان دهنده تمایز متوسط، مقدار بین ۰/۱۵تا ۰/۲۵ نشان دهنده تمایز بالا و مقدار بالای۰/۲۵ نیز نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی خیلی بالا در بین جمعیت‌ها می‌باشد (Wright, 1978). در این بررسی میزان متوسط F_{st}، ۰/۰۲۸ می‌باشد که نشان دهنده تمایز پایین بین جمعیت‌ها می‌باشد و با توجه جریان ژنی بالای بین این دو منطقه، به سادگی قابل توجیه می‌باشد. درصورت عدم وجود جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها انتظار می‌رفت تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین آنها ایجاد گردد. آنالیز واریانس مولکولی به عنوان یک آنالیز آماری، ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Grassi *et al*. 2004). با توجه به اینکه R_{st} از دانسته‌های مربوط به اندازه اللی استفاده می‌کند و وابسته به جهش نیست، می‌تواند داده‌های بیولوژیک بهتری نسبت به معیار F_{st} فراهم کند (Balloux and Moulin, 2002). بنابراین نتایج آزمون AMOVA در این بررسی بر اساس R_{st} حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در داخل جمعیت‌ها (۸۳٪) و در عین حال تنوع ژنتیکی پایین بین جمعیت‌ها (۱۷٪) می‌باشد. برای ریزماهواره‌ها میزان R_{st} می‌تواند بیشتر از F_{st} باشد (Slatkin, 1995) که در این بررسی میزان F_{st} و R_{st} به‌عنوان شاخص‌های تمایز به‌ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۱۸۸ به‌دست آمد که نشان از وجود تمایز پایین بین مناطق مورد بررسی است. طبق پیراسنجه های عنوان شده توسط Throp(۱۹۸۲) که مقدار شباهت ژنتیکی را بر اساس سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره‌داران محاسبه کرد، برای جمعیت‌هایی که به گونه‌های مشابه تعلق دارند،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

شباهت ژنتیکی بین ۰/۸۰–۰/۹۰ و در گونه‌های متعلق به جنس-های مشابه بین ۰/۳۵–۰/۸۵ قرار دارد. مقدار به‌دست آمده در این بررسی ۰/۶۴۷ می‌باشد که در محدوده گونه‌های مشابه قرار دارد و با مقادیر تمایز پایین به‌دست آمده مطابق است.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش، به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار دارد و تنوع بین گونه‌های پرورشی و کرخه اختلاف معنی داری نشان نمی‌دهد. همچنین تنوع ژنتیکی قابل قبول در جمعیت پرورشی، حاکی از رعایت مباحث مربوط به اصلاح نژاد در این جمعیت می‌باشد. با این وجود، احتمال کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی به-دلیل درون آمیزی در آینده، دور از انتظار نیست. همچنین نتایج نشان داد که نشانگر ریزماهواره از توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در این ماهی برخوردار است.

منابع

Allendorf F, Ryman N, Utter F. 1987. Genetics and fishery management. University of Washington. Wasgington.

Angers B, Bernatchez L. 1998. Combined use of SMM and non SMM methods to infer finestructure and evolutionary history of brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. Molecular Biology Evolution 15: 143-159.

Appleyard SA, Ward RD, Grewe PM. 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian ocean using mitochondrial DNA and microsatellite. Journal of Fish Biology 62: 987-999.

Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimate of population differentiation withmicrosatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.

Bai J, Lutz-Carrillo DJ, Quan Y, Liang S. 2008. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China Aquaculture 278: 27-30.

Gresshoff GM. 1991. Fast and sensitive silver stainingof DNA in polyacrylamide gels. Analytical biochemistry 84: 680-683.

Beacham Td, Mcintosh M, MacConnachie C. 2004. Population structure of lake-type and river-type sockeye salmon in Transboundary rivers of northern British Columbia. Journal of Fish. Biology 65: 389-402.

Blanchet S, Paez D, Bernatchez L, Dodson J. 2008. An integrated comparison ofcaptive-bredand wild Atlantic salmon (*salmosalar*): Implications for supportive breeding programs. Biological Conservation 141: 1989-1999.

Chakmedooz F, Pour kazemi M, Zamini DA, Yarmohammadi M, Rezvani S, Azizzade, L. 2009. Genetic diversity of (*Rutilus frisii kutum*) with microsatellite marker. Proceedings of the First National Congress of the fishery resources of the Caspian Sea. Page 2 (In Farsi).

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

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

Dorostghoal M, Peyghan R, Papan F, Khalili L. 2009. Macroscopic and microscopic studies of annual ovarian maturation cycle of Shirbot *Barbus grypus* in Karon river of Iran. Shiraz University. Iranian Journal of Veterinary Research 27: 172–179.

Dunham RA. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology genetic approaches. Canadian Association of Business Incubation Publishing, London.

Fergusen M. 1995. The role of moleculargenetic markers in the management of culturedfish. G. R. arvalhoand, T. J. Pitcher (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries. London:Chapman and Hall 81-104.

Goldstein DB, Schlotterer C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press. New York. 368p.

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 *Valerianawallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science 166: 1437-1441.

Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Mensberg KD. 2000. Microsatellite andmitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

interbreeding between hatcheryand wild brown trout (*Salmo trutta* L.). Molecular Ecology 9: 583-594.

Hillis DM, Mortiz C. 1996. Molecular systematic. 2nd Ed, Sinauer Associates Inc, PublishersSunderland, Massachusetts.

IUCN.2006. IUCN Red List of Threatened species. Retrieved from http://www.redlist.org/. On 18May 2007.

Li D, Kang D, Yin Q, Sun Z, Liang L. 2007. Microsatellite DNA Marker Analysis of GeneticDiversity 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 Z. 2007. Aquaculture Genome Technologies. Blackwell Publishing, Oxford.

Liu F, Xia JH, Bai ZH, Fu JJ, Li JL, Yue GH. 2009. High genetic diversity andsubstantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed bymicrosatellite analysis. Aquaculture 297: 51-56.

Liu Z, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications inaquaculturegenetics. Aquaculture 238:1-37.

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.

Millennium Ecosystem Assessment. 2005. Ecosystems and human well-being: Current state andtrends: Findings of the conditions and trends working group of the millennium ecosystemassessment. Island Press, Washington D.C.

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

Neik pei M. 1997. Report of Barbus biology project, Iranian Fisheries Research and Training Organization 28-36 (In Farsi).

Nelson J. 1994. Fishes of the World. 3rd ed., John Wiley and Sons, NewYork.

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

Pampoulie Ch, Jorundsdottir TD, Steinarsson A, Petursdottir G, Stefansson MO, Danielsdottir AK. 2006. Genetic comparison of experimental farmed strains and wildIcelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture 261: 556-564.

Park LK, Moran P. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. MolecularGenetics in Fisheries. London.

Peakall R, Smouse PE. 2006. Gene Alex 6: genetic analysis in excel. Population geneticsoftware for teaching and research. Molecular Ecology 6: 288-295.

Peakall R, Smouse PE. 2006. Gene Alex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology and Systemic 28: 105-128.

Petit R J, Mousadik AE, Pons AO. 1998. Identifying populations for conservation on thebasis of genetic markers. Conservation Biology 12: 844-855.

Rezae M. 2010. Genetic diversity of (*Rutilus frisii kutum*) with microsatellite marker. MSc Thesis of Fisheries. The natural resources and Agriculture university of Gorgan 83pp(In Farsi).

Rezvani Gilkolaei K, Salari Aliabadi MA, Zolgharnain H, Nabavi SMB. 2009. Population genetic structure of Cobia, *Rachycentron canadum* revealed by microsatellite markers. Iranian journal of Fisheries science 3:61-69.

Silva EP, Russo CAM. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. Hydrobiologia, 420: 119-135.

Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462.

Thorp JP. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation andsystematic. Annual Review of Ecology and Systematics 13:139-168.Wright, B. S. 1951. The genetical structure of populations. Annual Eugenics 15: 323-354.

Verspoor E, Jordan WC. 1989. Genetic variation at the Me-2locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence forits selective maintenance. Fish Biology 35: 205-213.

Wright S. 1978. Evolution and the genetics of populations variability within and among natural populations. University of Chicago Press. 2nd Ed., University of Chicago Press, Chicago.

Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-basesFreeware for population Genetic Analysis. Retrieved from:www.uallberta.ca/fyeh/. University ofAlberta and the Centre for International Forestry Research.

Zhao N, Shao Z, Zhu B. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* genetic variability. J. Appl. Ichthyology 21:7-13.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Genetic diversity of *Barbus grypus* in the Karkheh River in Khuzestan Province and cultured fish studied using a microsatellite marker

Mahbobe Karami nasab[1], Zeinab Hosseinnia*[2], Hamed Kolangi Miandare[3],Ali Shabany[4]

1&2- MSc. Students 3- Assistant Professor 4- Associate Professor
Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

* Corresponding Author, Email: z.hosseinnia@yahoo.com

A B S T R A C T

Shirbot (*barbus grypus*) belongs to the *Cyprinidae* family and is widely present in the west and Southwest's water resources of Iran, especially the Karkhe River in Khuzestan Province. The aim of this study was to compare levels of genetic polymorphism between Karkhe River and cultured *Barbus grypus* populations using seven microsatellite loci. Genetic diversity was investigated by studying 60 samples collected from two regions. According to the results, the F_{st} value was 0.033, which indicates low genetic diversity between the populations. Most of the loci showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Also a relatively high level of gene flow was found among the population. Genetic variations in Karkheh: mean number of alleles per locus, N_a=10.286, mean effective number of alleles, N_e=6.789, observed heterozygosity, H_o=0.691 and expected heterozygosity, H_e=0.840 and cultured fish N_a=13.286, N_e=9.141, H_o=0.800 and H_e=0.883 were not statistically different. Also, analysis of molecular variance showed that there is low genetic variation among populations and most of the observed variation is within the populations.

Key Words

Genetic Diversity, Hardy-Weinberg Equilibrium, Microsatellite, Shirbot (*Barbus grypus*)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.6.9]