

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

^۱محبوبه کرمی نسب، ^۲زینب حسین نیا، ^۳حامد کلنگی میاندره، ^۴علی شعبانی

Mahbobe Karami nasab¹, Zeinab Hosseinnia^{2*}, Hamed Kolangi Miandare³, Ali Shabany⁴

۱- 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* می باشد که در منابع آبی غرب و جنوب غرب ایران به ویژه آب های استان خوزستان حضور گسترده ای دارد. هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت رودخانه کرخه با نمونه پرورشی آن با استفاده از ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره ای می باشد. در پاییز ۱۳۹۱، ۶۰ نمونه ماهی از دو منطقه جهت این بررسی، صید شد. طبق نتایج به دست آمده متوسط میزان F_{st} ، $0/28$ ، به دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت های مورد بررسی می باشد. در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، نمونه ها در اکثر لکوس ها انحراف از تعادل را نشان دادند. همچنین میزان نسبتاً بالایی از جریان ژنی بین جمعیتها مشخص گردید. تنوع ژنتیکی دو منطقه، شامل کرخه تعداد ال در جایگاه: $N_a=10/286$ ، تعداد ال مؤثر: $N_e=6/789$ ، هتروزیکوسیتی مشاهده شده: $H_o=0/691$ ، هتروزیکوسیتی مورد انتظار: $H_e=0/840$ و پرورشی $N_a=13/286$ ، $N_e=9/141$ ، $H_o=0/800$ ، $H_e=0/883$ نیز تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین آنالیز واریانس با استفاده از داده های ژنی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیتها وجود داشته و بخش اصلی تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیتها می باشد. 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.

واژه های کلیدی

تعادل هاردی-واینبرگ
تنوع ژنتیکی
ریزماهواره
ماهی شیربت
Barbus grypus

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). در حال حاضر، بسیاری از گونه‌های در معرض 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 گونه‌های شکارچی و رقیب و یا ورود بیماری‌ها قادر به بقا در محیط‌های طبیعی نامناسب نیستند. در آینده 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؛ به طوری 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 مرستیک صورت می‌گرفت اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و اثرهای منفی دست‌کاری در نشانه‌گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده از مارکرهای مولکولی همچون ریزماهوره‌ها و آلوزایم جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت. در این میان، نشانگرهای ریزماهوره در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده تری نسبت به سایر نشانگرها دارند. جایگاه‌های ریزماهوره‌ای، توالی‌های کوتاه و تکراری DNA هستند که دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی هستند (Angers and Bernatchez, 1998). ریزماهوره‌ها به علت بالا بودن تعداد آللهایشان، در بین تمام نشانگرها، بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (Liu, 2007). این چند

شکلی بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهوره 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. از طرفی به علت همبازبودن، 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 ریزماهوره صورت گرفته است. رضایی (۱۳۸۸) در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهوره، 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 ریزماهوره، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار را به ترتیب 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) به مقایسه 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 ریزماهوره به بررسی تنوع ژنتیکی ۴ جمعیت پرورشی باس دهان‌بزرگ (*Micropterus salmoides*) و مقایسه آن با نمونه‌های وحشی پرداختند. با توجه به کاهش شدید تنوع آلی 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 حوزه رودخانه‌های دجله و

MF7، MF26 و MF2 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 10X (Fermentas)، ۱/۵ میلی-مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم، انجام گرفت. چرخه دمایی برای هر جایگاه ژنی عبارت بود از: یک مرحله ابتدایی ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، درجه حرارت اتصال (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه (بسط) و یک مرحله انتهایی ۷۲ درجه‌ای به مدت ۳ دقیقه به‌عنوان مرحله بسط نهایی. محصولات واکنش PCR روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۸ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. از نشانگر اندازه DNA (Ladder 50bp) (Fermentas) به‌عنوان شاخص برای تعیین اندازه الی استفاده شد. در ادامه، ژل‌ها به‌روش نیترا-نقره 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 الی مشاهده شده، الی موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_e) و مورد انتظار (H_o) 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 الی بی‌نهایت (F_{st}) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزاری Genealex استفاده شد. تعیین فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (Nei, 1978) (I) و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها با استفاده از ترسیم درخت UPGMA و نیز با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh *et al.*, 1999) صورت گرفت.

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 آبی 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 آب مقطر 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 پلیمرز و الکتروفورز

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت از جایگاه‌های ژنی Bbar11، B11-153، GATA20، GGM024.

جدول ۱- خصوصیات جایگاه های ژنی مورد استفاده در این مطالعه

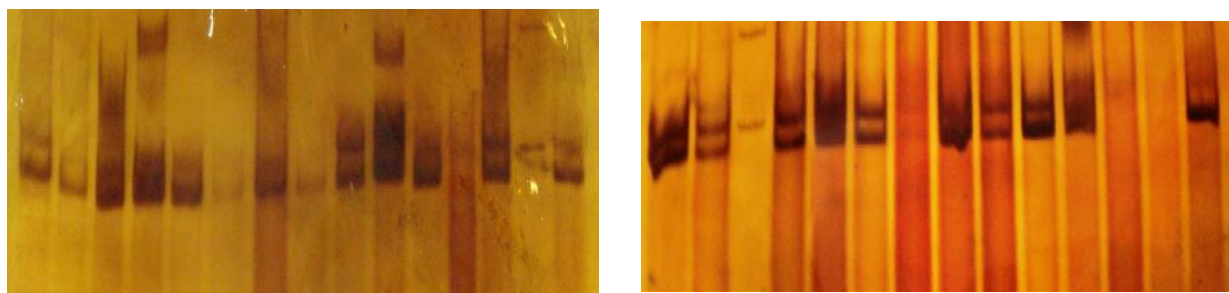
Table 1: Specifications of genetic loci that are used in this study

دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temp. (°C)	اندازه الی (bp) Allele size	توالی sequence	جایگاه ژن Locus
49	116-216	F: GCGGAGGAAGAGAAACACAG R: CTATGCCATTGCCACACATC	Bbar11
56	168-244	F: GCACAGCTCTAATCGGTCCT R: TATGGTCAAACACGGGTCAA	B11-153
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

شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و جریان ژنی (N_m) به ترتیب ۰/۱۳۶ و ۱۰/۷۸۱ به دست آمد. از نظر تمایز بین مناطق میزان شاخص F_{st} و R_{st} بر اساس تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۱۸۸ به دست آمد. همچنین نتایج براساس AMOVA نشان داد که ۹۷ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها 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 به دست آمد. دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه به‌طور کامل مجزا قرار دارند.

هر ۷ جایگاه ژنی مورد استفاده در این بررسی پلی مورفیسم را نشان دادند (شکل ۱). تعداد ال‌های مربوط به تمامی جایگاه‌های چندشکل در جدول (۲) نشان داده شده است. تعداد کل ال در سطح جایگاه در دامنه ۱۸-۸ به دست آمد بطوری‌که جایگاه GGM024 پایین‌ترین (۸ ال) و Bbar11 (۱۸ ال) بالاترین تعداد ال را نشان دادند. تعداد متوسط ال‌های مشاهده شده و موثر در کرخه به ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۶/۷۸۹ و در جمعیت پرورشی ۱۳/۲۸۶ و ۹/۱۴۱ به دست 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) به ترتیب 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 به دست آمد. همچنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، 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



شکل ۱- تصویر نشانگرهای ریزماهواره ماهی شیربت در جایگاه‌های MFW2 و B11-153

Figure 1 . Microsatellite profiles of *Barbus grypus* at loci MFW2 and B11-153

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه در جمعیت‌های ماهی شیربت

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

MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	B11-153	Bbar11	
9	10	11	8	10	13	11	N_a
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
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 آلل‌های مشاهده شده؛ N_e : تعداد آلل‌های مؤثر؛ H_o : هتروزایگوسیتی مشاهده شده؛ H_e : هتروزایگوسیتی مورد انتظار؛ F_{is} : ضریب درون‌آمیزی؛

pHw: تست احتمال تعادل هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.01$ ، $P \leq 0.001$)

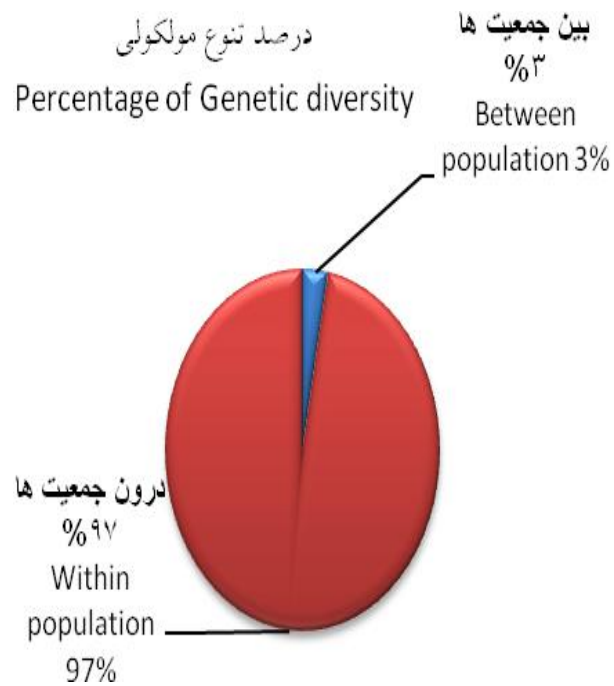
N_a , number of observed alleles; N_e , number of effective alleles; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; F_{is} , fixation indices; PHW, Hardy-Weinberg probability test

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s, non-significant).

جدول ۳- میزان F_{st} (ضریب تمایز)، F_{is} (ضریب درون‌آمیزی)، N_m (جریان ژنی) در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه

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

میانگین Average	MFW26	MFW7	MFW2	GGM024	GATA20	B11-153	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



شکل ۲- تنوع ژنتیکی بدست آمده براساس معیار F_{st}

Figure 2. The distribution of genetic diversity on

F_{st} standard

تنوع ژنتیکی به عنوان پایه‌ای برای توانایی تکامل جمعیت‌هاست. دانسته‌های مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، نقشی اساسی در حفاظت و بهره‌برداری پایدار از آن‌ها دارد. عملیات آبی‌پروری می‌تواند روی تنوع ژنتیکی یک گونه اثرگذار باشد (Norris et al. 1999). اندازه کوچک جمعیت و برنامه‌های کنترل نشده تکثیر مصنوعی، از عوامل اصلی از کاهش تنوع ژنتیکی در گونه‌های پرورشی است (Hansen et al. 2000)، بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی باید به عنوان اولویت اصلی در برنامه‌های تکثیر حمایتی در نظر گرفته شود.

ریزماهورها نشانگرهای ژنتیکی هستند که بصورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌گردند (Liu et al. 2009). در واقع، این نشانگرها ارزش بالایی دارند؛ به طوری که علاوه بر فراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرارشونده در آنها بالاست که علت آن را میتوان به نرخ بالای جهش در این نشانگر نسبت داد و از طرفی، به دلیل همباز 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 و پرورشی از ۷ نشانگر ریزماهوره‌ای استفاده شد که همگی پلی-مورف بودند. کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد (Lind et al. 2009). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. در واقع، بالا بودن غنای اللی، نشاندهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت بوده، استفاده از غنای اللی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (2009 Diz and Presa). در این بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های کرخه و پرورشی به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۸۰ به دست آمد، که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین (۰/۴۶) (Dewoody and Avise, 2000) بالاتر می‌باشد اما بین دو جمعیت از این نظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p < 0.05$).

در بررسی‌های تنوع ژنتیکی و خصوصا 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 به ترتیب ۱۰/۲۸۶ و ۱۳/۲۸۶ محاسبه شد که تفاوت معنی‌داری 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 به شدت 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 می‌تواند تعداد الل‌های واقعی را در بررسی‌های ریزماهوره نشان دهد (Goldstien and Scholottor, 1999; Silva and Russo, 2006; Peakall and Smous, 2000). 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 می‌دهد که به رغم 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 معنی‌داری 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 اللی 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

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 بالا و مقدار بالای ۰/۲۵ نیز نشان دهنده تمایز 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. در صورت 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 ریزماهورها میزان R_{st} می‌تواند بیشتر از F_{st} باشد (Slatkin, 1995) که در این بررسی میزان F_{st} و R_{st} به-عنوان شاخص‌های تمایز به ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۱۸۸ به دست آمد که نشان از وجود تمایز پایین بین مناطق مورد بررسی است. طبق پیراسنجی‌های 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،

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 آل‌های صفر و تلاقی خویشاوندی نسبت دادند. در واقع وجود آل‌های صفر در ماهی پدیده‌ای کاملاً عادی می‌باشد و وجود این آل‌ها در توارث میکروستالیت در ماهیان مورد تأیید قرار گرفته است (Rodzen, 2002) و Appleyard and May (۲۰۰۲) در مطالعه ساختار ژنتیکی تن ماهی 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 به دست 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 به-شمار می‌رود که می‌تواند باعث کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش میزان بقا و عدم مقاومت در برابر بیماری‌ها و در نهایت به خطر انداختن جمعیت‌ها می‌گردد (Ferguson, 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, 2004; Gilkolaei, 2009; Beacham et al. 2004). هرگاه $N_m > 1$ باشد، جریان ژنی اصلی‌ترین عامل ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $N_m < 1$ باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود (Li et al. 2007). از این رو نتایج به دست 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

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.

شبهات 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

منابع

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

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 with microsatellite 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 staining of 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 of captive-bred and 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.

Ferguson M. 1995. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. 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, Gomasasca 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 and mitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent

- interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9: 583-594.
- Hillis DM, Mortiz C. 1996.** *Molecular systematics*. 2nd Ed, Sinauer Associates Inc, Publishers Sunderland, Massachusetts.
- IUCN. 2006.** IUCN Red List of Threatened species. Retrieved from <http://www.redlist.org/>. On 18 May 2007.
- 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 Z. 2007.** *Aquaculture Genome Technologies*. Blackwell Publishing, Oxford.
- 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, 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 and trends: Findings of the conditions and trends working group of the millennium ecosystem assessment*. Island Press, Washington D.C.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *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*. 3rded., John Wiley and Sons, New York.
- Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. 1999.** Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture* 180: 247-264.
- Pampoulie Ch, Jorundsdottir TD, Steinarsson A, Petursdottir G, Stefansson MO, Danielsdottir AK. 2006.** Genetic comparison of experimental farmed strains and wild Icelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261: 556-564.
- Park LK, Moran P. 1995.** Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Molecular Genetics in Fisheries*. London.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** Gene Alex 6: genetic analysis in excel. Population genetics software 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 the basis 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 and systematics. *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-2 locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for 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-bases Freeware for population Genetic Analysis. Retrieved from: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta 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.

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

Mahbobe Karami nasab¹, Zeinab Hosseinnia^{*2}, Hamed Kolangi Miandare³, Ali Shabany⁴

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

ABSTRACT

Shirbot (*barbus grypus*) belongs to the *Cyprinidae* family and is widely present in the west and Southwest's water resources of Iran, especially the Karkheh River in Khuzestan Province. The aim of this study was to compare levels of genetic polymorphism between Karkheh 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*)