بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سنگ‌لیس (*Garra rufa*) در استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

- **قاسم عسکری***: دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٩١٧٥-٤٨٧
- **علی شعبانی**: دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٩١٧٥-٤٨٧
- **حمیدرضا رضایی**:دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی:٤٩١٧٥-٤٨٧

تاریخ دریافت: مرداد ١٣٩١ **تاریخ پذیرش: آبان ١٣٩١**

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سنگ‌لیس در دو رودخانه بشار و کبگیان استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از شش جایگاه ریزماهواره انجام گرفت. در این پژوهش از ٥٦ قطعه ماهی سنگ‌لیس استفاده گردید. براساس نتایج حاصله، متوسط شاخص F_{st}، ٠/٠٢٤ به‌دست آمد که حکایت از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد بررسی دارد. تعداد الل مشاهده شده در محدوده ٢٥ – ٧ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به‌ترتیب در محدوده ١/٠٠٠ – ٠/٠٠٠ (میانگین ٠/٥٩٥) و ٠/٩٤٦ – ٠/٧٦٧ (میانگین ٠/٨٥٥) به‌دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی پایینی بین جمعیت‌ها وجود داشته و بخش عمده تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. براساس آنالیزهای موجود به‌نظر می‌رسد، گونه *Garra rufa* دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی در مناطق مورد بررسی است.

کلمات کلیدی: سنگ‌لیس، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، استان کهگیلویه و بویر احمد

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: askarighasem82@gmail.com

مقدمه

زیستگاه‌های آب شیرین نسبت به فعالیت‌های انسانی و تغییرات زیست محیطی آسیب‌پذیر می‌باشند (۱۰). ماهی سنگ‌لیس یکی از کوچک‌ترین اعضا خانواده کپور ماهیان و یکی ۷۳ عضو جنس *Garra* می باشد (۱۱;۴). زیستگاه اصلی آن رودخانه‌های غرب و جنوب غرب ایران است (۴). ماهی سنگ‌لیس جزو ماهیان بنتوپلاژیک آب‌های شیرین بوده و در ایران آن را با نام‌های گل چراغ، گل خورک، دکتر ماهی نیز می‌شناسند.

این گونه از گروه ماهیان مکنده و بر سطح سنگ‌ها و بستر رودخانه‌ها تغذیه می‌نماید Sayili و همکاران (۲۰۰۷) از این گونه به‌عنوان گونه‌ای مناسب جهت درمان بیماری‌های پوستی نام برده‌اند و از آن در درمان بیماری‌های قارچی استفاده نمودند.

تکنیک‌های ژنتیک مولکولی به‌عنوان ابزاری مدرن توانایی شناسایی و تعیین ساختار ذخایر ماهیان هنگامی که پارامترهای فنوتیپیک یا خصوصیات رفتاری به‌عنوان ابزارهای سنتی و قدیمی ناتوان هستند را دارند (۲۱). نشانگرهای ژنتیکی به صورت موفقیت‌آمیزی جهت تعیین ساختار ذخایر ماهیان و ایجاد ارتباط میان جمعیت‌های ماهیان استفاده شده اند (۳۳). در میان نشانگرهای مختلف ژنتیکی رایج در بررسی تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره حاوی اطلاعات بهتر و کامل‌تری نسبت به سایر نشانگرها می‌باشند. ریز ماهواره‌ها توالی‌های ساده تکرار شونده و واحدهای کوچک تکرار شونده می‌باشند. به‌علت سطوح بالای چند شکلی، میزان بالای جهش، هم بارزی، تعداد زیاد و پراکنش بالای ژنومی، ریزماهواره‌ها نشانگرهای مناسبی جهت مطالعات اکولوژیک و تکاملی هستند (۱۶).

نشانگرهای ریز ماهواره در طی چند سال گذشته در ایران جهت مطالعات ساختاری جمعیت‌های ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است. Ghodsi و همکاران(۲۰۱۱) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی کفال طلایی در سواحل استان گلستان پرداخته و وجود علائمی از تنگنای ژنتیکی را در جمعیت‌های مورد بررسی گزارش نمودند. Mohamadian و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی سیاه کولی در سواحل شرقی و غربی دریای خزر پرداخته و میزان بالای تنوع ژنتیکی در این گونه در مناطق مورد بررسی گزارش نمودند. Rezaei و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر در دو روخانه گرگانرود و چشمه کیله (تنکابن) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره پرداخته و تنگنای ژنتیکی را برای این گونه گزارش نمودند.

با توجه به این‌که ماهی سنگ‌لیس دارای ارزش اکولوژیک بالایی بوده و از گونه‌های بومی ایران می‌باشد و تاکنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با ساختار و تنوع ژنتیکی این گونه در آب‌های ایران و جهان صورت نگرفته است، لذا این تحقیق با هدف بررسی ساختار ژنتیکی و بررسی تنوع ژنتیکی آن در رودخانه‌های بشار و کبگیان استان کهگیلویه و بویراحمد صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۶ نمونه ماهی از دو رودخانه بشار و کبگیان (۲۸ عدد برای هر رودخانه) استان کهگیلویه و بویراحمد در پاییز ۱۳۹۰ صید گردید (شکل ۱). در حدود ۲-۳ گرم باله هر ماهی در اتانل ۹۶ درصد فیکس و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی انتقال داده شد. استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم انجام گردید (۱۴). DNA استخراجی تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز و روش اسپکتوفتومتری تعیین گردید (۲۸).

شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سنگ‌لیس از شش جایگاه ریزماهواره MFW17، GGM023b، GGM007، GGM-045، GGM002، GGM034 غیراختصاصی استفاده گردید (۲۰ و ۵) (جدول۱). واکنش زنجیره پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد تک DNA پلی‌مراز، بافر PCR (1X)، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید

منیزیم (شرکت سیناکلون) و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود.

محصولات واکنش زنجیره پلی‌مراز بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۰ درصد جداسازی و به‌وسیله نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید (۲۸). ژل رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دستگاه مستندساز ژل مورد عکس‌برداری قرار گرفت و به‌وسیله نرم‌افزار Gel pro analyzer طول قطعات باندها محاسبه گردید.

جدول ۱- خصوصیات جایگاه ژنی مورد استفاده در این تحقیق

جایگاه ژنی	وزن مولکولی (جفت باز)	تعداد الل	پرایمر	دمای اتصال
MFW17	۱۶۰ - ۲۰۰	۹	F: CTCAACTACAGAGAAATTTCATC R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	۴۶
GGM023b	۱۰۰ - ۱۳۲	۹	F:TCACCATCCACTGAAGACCA R:GAAATATGTAACGTCATTAATTGTGTG	۵۳
GGM 002	۲۰۴- ۳۴۴	۲۴	F:CACTTTGTCCTTGCCATTGA R:CTCAACACCGTGGACTCTCA	۵۵
GGM007	۲۳۶ - ۳۰۰	۱۱	F:GCTGTGCTGACTGGCACTT R:CAAACCAACATTTCATCAAAAA	۵۲
GGM-045	۱۵۶ - ۱۹۶	۱۰	F:TCTCATGGGTCTCTGGGTTC R:TGTGCAGAAAGGCTGTTGAG	۵۳
GGM 034	۱۲۸ - ۱۷۶	۱۲	F:CGCGCAAGTTTCTTTCAGTT R:GCTGTGAGACAAGCCTAAACC	۵۶

ارزیابی تعداد الل در هر لوکوس، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، تعداد الل‌های واقعی (Na)، تعداد الل موثر (Ne)، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر Fst، تست معنی‌دار بودن احتمال کسری هتروزیگوسیتی یا زیاد بودن هتروزیگوسیتی نیز از نرم‌افزار و جریان ژنی با استفاده از نرم‌افزار Genalex ver.6.5 (۲۵) محاسبه گردید. برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، مورد انتظار (He) و تنوع آللی از آزمون ویلکاکسون غیرپارامتریک در نرم‌افزارSPSS ver.16 (۳۸) استفاده شد. تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی و رابطه فیلوژنیک بین جمعیت‌ها از ترسیم درخت UPGMA با استفاده از نرم‌افزار PopGene مشخص گردید (۳۶). تعیین تنوع درون و بین جمعیتی و هم‌چنین میزان تمایز بین‌جمعیتی براساس مدل اللی بی‌نهایت (Fst) و مدل جهش پله‌ای (Rst) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی از طریق نرم‌افزار Genalex ver.6.5 انجام گردید.

نتایج

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ماهی سنگ‌لیس در این مطالعه از ۹ جفت پرایمر اختصاصی کپور معمولی و ۱۲ جفت پرایمر اختصاصی *Garra gotyla* استفاده گردید. طی این مطالعه تنها شش جایگاه دارای چندشکلی بودند (جدول۱). تعداد الل مربوط به تمامی جایگاه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. متوسط میزان الل مشاهده شده (N_a) در دو رودخانه بشار و کبگیان به‌ترتیب ۱۲/۵ و ۱۲ به‌دست آمد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان الل مشاهده شده به‌ترتیب مربوط به جایگاه GGM 002 (۲۵ الل) و جایگاه MFW17 (۷ الل) در رودخانه بشار می‌باشد. متوسط الل موثر (N_e) برای دو جمعیت بشار و کبگیان به‌ترتیب ۸/۷۹۹ و ۸/۱۷۱ به‌دست آمد، که کم‌ترین و بیش‌ترین میزان الل موثر به‌ترتیب مربوط به دو جایگاه GGM023b (۴/۲۸۴) و GGM002 (۱۸/۶۶۷) رودخانه بشار بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) به‌ترتیب ۰/۵۹۵ و ۰/۸۵۵ به‌دست آمد. کم‌ترین و بیش‌ترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های MFW17 (۰/۰۰۰) رودخانه بشار و GGM 002 (۱/۰۰۰) هر دو رودخانه بشار و کبگیان می‌باشد. این کاهش شدید میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه MFW17 جمعیت رودخانه بشار احتمالاً به‌دلیل وجود الل صفر در ژنوم جمعیت مذکور می‌باشد (جدول۲). وجود الل صفر در ماهیان پدیده‌ای طبیعی می‌باشد و وجود این الل‌ها در توارث ریزماهواره‌ها در ماهیان به اثبات رسیده است (۲۷). نتایج مربوط به بررسی تعادل هاردی – واینبرگ در جدول ۲ آورده شده است. از ۱۲ تست مورد بررسی (۶ جایگاه × ۲

منطقه) ۱۱ تست به‌طور معنی‌داری انحراف از تعادل را نشان دادند ($P \leq ۰/۰۵$). متوسط شاخص درون‌آمیزی (FIS) و جریان ژنی (Nm) به‌ترتیب ۰/۳۱۱ و ۱۵/۷۵۷ به‌دست آمد. متوسط میزان Fst و Rst بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی براساس فراوانی اللی به‌ترتیب ۰/۰۲۴ و ۰/۰۱۸ به‌دست آمد (جدول ۳). بررسی نتایج حاصل از پارامتر Fst ناشی از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹ درصد نشان داد که اختلاف ژنتیکی بالایی (۹۷ درصد) در درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (۳ درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد (نمودار ۱). هم‌چنین براساس نتایج حاصل از پارامتر Rst تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸ درصد) درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (۲ درصد) در بین جمعیت‌ها به‌دست آمد. شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو منطقه مورد بررسی به‌ترتیب ۰/۷۱۲ و ۰/۳۴۰ محاسبه گردید. دندوگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نشان داد که این دو جمعیت در شاخه‌های مجزا قرار می‌گیرند.

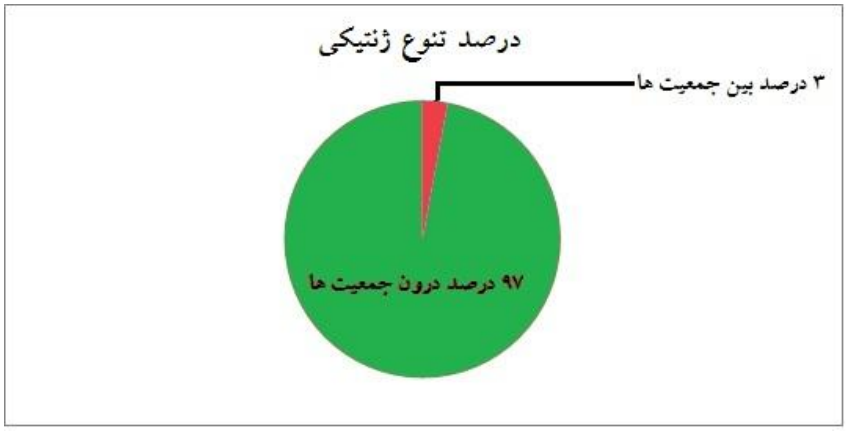
جدول۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی

جایگاه ژنی	MFW17	GGM023b	GGM 002	GGM007	GGM-045	GGM 034	میانگین
Nm	۲۱/۲۰۰	۶/۸۸۶	۲۴/۶۷۵	۲۹/۶۵۲	۶/۰۳۸	۶/۰۹۲	۱۵/۷۵۷ ± ۰/۱۲
F_{st}	۰/۰۱۲	۰/۰۳۵	۰/۰۱۰	۰/۰۰۸	۰/۰۴۰	۰/۰۳۹	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۱

N_a: تعداد الل، N_e: تعداد الل موثر، H_O: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار،F_{IS}: ضریب درون‌آمیزی، pHw: تست احتمال هاردی- واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، $P \leq ۰/۰۵$*، $P \leq ۰/۰۱$**، $P \leq ۰/۰۰۱$***).

جدول ۳- میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (F_{st}) در سطح شش جایگاه ژنی مورد استفاده

		MFW17	GGM023b	GGM 002	GGM007	GGM-045	GGM 034
	N_a	۱۰	۸	۲۳	۱۲	۹	۱۰
	N_e	۵/۹۳۹	۶/۶۴۴	۱۷/۲۳۱	۹/۰۱۱	۵/۴۰۷	۴/۷۹۵
رودخانه	H_o	۰/۳۹۳	۰/۷۵۰	۱/۰۰۰	۰/۳۵۷	۰/۷۱۴	۰/۶۴۳
کبگیان	H_e	۰/۸۳۲	۰/۸۴۹	۰/۹۴۲	۰/۸۸۹	۰/۸۱۵	۰/۷۹۱
	F_{IS}	۰/۵۲۸	۰/۱۱۷	-۰/۰۶۲	۰/۴۹۸	۰/۱۲۴	۰/۱۸۸
	pHw	***	***	ns	***	**	***
	N_a	۷	۹	۲۵	۱۰	۱۱	۱۳
	N_e	۴/۷۸۰	۴/۲۸۴	۱۸/۶۶۷	۶/۷۰۱	۸/۸۵۹	۹/۵۰۳
رودخانه	H_o	۰/۰۰۰	۰/۷۱۴	۱/۰۰۰	۰/۱۴۳	۰/۷۸۶	۰/۶۴۳
بشار	H_e	۰/۷۹۱	۰/۷۶۷	۰/۹۴۶	۰/۸۵۱	۰/۸۸۷	۰/۸۹۵
	F_{IS}	۱/۰۰۰	۰/۰۶۸	۰/۸۳۲	۰/۱۱۴	-۰/۰۵۷	۰/۲۸۲
	pHw	***	***	**	***	***	***



نمودار۱- توزیع تنوع ژنتیکی بر اساس معیار F_{st}

بحث

ماهی سنگ‌لیس از خانواده کپور ماهیان و جنس *Garra* می‌باشد. امروزه از این ماهی به‌عنوان یک گونه خوراکی، آکواریومی و درمانی استفاده می‌شود. با توجه به آلودگی‌های روز افزون منابع آب‌های داخلی و در معرض تهدید قرار گرفتن گونه‌های آبزی یک ضرورت جهت حفظ زیستگاه و بقای این گونه‌ها احساس می‌گردد. یکی از راه‌های بررسی میزان سازگاری یک موجود با شرایط محیطی موجود، بررسی ساختار ژنتیکی این گونه‌ها در منابع آبی می‌باشد. امروزه آلودگی‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی عامل اصلی آلودگی منابع آبی و تخریب زیستگاه موجودات آبزی می‌باشد.

تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می‌گردد و می توان آن را توسط نشانگرهای ژنتیکی اندازه‌گیری نمود (۳۲). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی آبزیان در راستای حفاظت از ذخایر آن‌ها دارای اهمیت اساسی می‌باشد و سطوح بالای تنوع ژنتیکی توانایی جمعیت‌ها را در پاسخ به انتخاب طبیعی و سلامت افراد آن جمعیت افزایش می‌دهد، ساده‌ترین ابزار برای بررسی تنوع ژنتیکی در یک جایگاه، محاسبه فراوانی الل‌ها می‌باشد (۱۵). به‌طور متوسط تعداد الل در هر لوکوس در ماهیان آب شیرین ۷/۵ الل می‌باشد (۷). در این مطالعه متوسط تعداد الل مشاهده شده در هر لوکوس ۱۲ الل بود که از تعداد گزارش شده برای ماهیان آب شیرین بالاتر می‌باشد. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۰/۵۹۵ و ۰/۸۵۵ به‌دست آمد که از میانگین هتروزیگوسیتی گزارش شده برای ماهیان آب شیرین (H_o = ۰/۴۶) بالاتر می‌باشد (۷) (جدول ۲). الل موثر (N_e) بیانگر تعداد الل‌هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌نمایند (۱۸). تعداد الل‌های واقعی در هر لوکوس می‌تواند تحت تاثیر تعداد نمونه‌ها قرار گیرد، به‌طوری که با تعداد نمونه متفاوت تعداد الل واقعی متفاوتی در هر جایگاه ریزماهواره به‌دست می‌آید و کاهش تعداد الل مشاهده شده در جمعیت می‌تواند نشان‌دهنده کاهش تنوع ژنتیکی در سطح جمعیت باشد (۱۸). در واقع ارزیابی غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی در بررسی‌های تنوع ژنتیکی دارای ارزش بالاتری بوده به‌طوری که هتروزیگوسیتی بیش‌تر بر پایه تغییرات تصادفی در فراوانی ژنی می‌باشد (۹). بالا بودن تعداد الل مشاهده شده ممکن است به‌دلیل مناسب بودن شرایط محیطی و وقوع جهش‌های ژنتیکی زیاد در طی مدت زمان زیاد و انتقال آن‌ها از نسلی به نسل دیگر باشد (۳۵).

در جمعیت‌های طبیعی و وحشی ماهیان، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ زیاد دیده می‌شود (۳۷؛۱۹). با توجه به این‌که تعادل هاردی- واینبرگ براساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت است، بنابراین انتظار انحراف از تعادل هاردی – واینبرگ در جمعیت‌های وحشی وجود دارد (۸). 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 به‌علت آمیزش خویشاوندی بین گونه‌ها، پهلوگیری تعداد محدودی از الل‌ها، ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها و خطای نمونه‌برداری دانست (۱؛۳۰؛ ۲۲؛ ۳۹؛ ۶؛ ۱۷). آمیزش خویشاوندی از جمله خطرات اصلی در جمعیت ماهیان به‌شمار می‌رود، که می‌تواند باعث کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش میزان بقاء و عدم مقاومت در برابر بیماری‌ها گردد (۱۲). با افزایش میزان مهاجرت، میزان شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها

افزایش می‌یابد (۲۴). زمانی که جریان ژنی ۱۰ درصد و یا کم‌تر باشد، می‌توان ذخایر را جدا از هم درنظر گرفت (۲). در این بررسی متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) و جریان ژنی (N_m) به‌ترتیب ۰/۳۱۱ و ۱۵/۷۵۷ به‌دست آمد، میانگین بالای این شاخص‌ها می‌تواند به‌دلیل آمیزش خویشاوندی و اختلاط بین جمعیت‌ها باشد (۳۴). در صورتی‌که جریان ژنی بین جمعیت‌ها وجود نداشته باشد و یا این‌که جریان کمی وجود داشته باشد، بین آن‌ها تفاوت ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای به‌وجود خواهد آمد (۳). بر اساس آنالیز واریانس مولکولی و شاخص F_{st} اختلاف ژنتیکی را بین دو جمعیت در حدود ۳ درصد محاسبه و میانگین شاخص F_{st} در حدود ۰/۰۲۴ به‌دست آمد. میزان فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بین دو جمعیت به‌ترتیب ۰/۳۴۰ و ۰/۷۱۲ به‌دست آمد. مقادیر فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) برای جمعیت‌هایی با گونه‌های مشابه و گونه‌های هم‌جنس به‌ترتیب در محدوده ۰/۰۰۲ – ۰/۰۷ و ۰/۶۱ – ۰/۰۳ می‌باشد (۳۱). میزان فاصله ژنتیکی بدست آمده برای این بررسی در محدوده گونه‌های هم‌جنس قرار می‌گیرد. با توجه به ارزیابی مقادیر به‌دست آمده از فراوانی اللی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی- واینبرگ، F_{st} و ترسیم دندروگرام UPGMA دو جمعیت، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دو جمعیت مجزا در این دو رودخانه وجود دارد که دارای جریان ژنی نسبتاً بالایی با یکدیگرند. این تبادلات ژنی به‌نظر می‌رسد به‌دلیل ارتباط آبی این دو رودخانه در محل پیوستن به یکدیگر و در نهایت ریختن به رودخانه خرسان باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد شرایط زیستگاهی در این مناطق هم‌چنان مطلوب بوده و این ماهیان توانسته‌اند تنوع بالای ژنتیکی را در درون جمعیت‌های خود حفظ نمایند.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم مهندس زهره قدسی که در انجام این تحقیق یاری نمودند، کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1. **Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen, Y.; Philips, H.A.; Richards, R I.; Mulley, J.C. and Sutherland, G.R., 1993.** Incisence and origin of 'null' alleles in the (AC)n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52:922-927 pp.
2. **Carvalho, G.R. and 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 pp.
3. **Chakraborty, R. and Leimar, O., 1987.** Genetic variation within a subdivided population. N. Ryman and F. M. Utter (Eds), Population Genetics and Fishery management. Washington: University of Washington. 89-120 pp.
4. **Coad, B.W., 2010.** [Website] http://www.briancoad.com (accessed 3 March, 2010).
5. **Crooijmans, R.P.M.A.; Bierbooms, V.A.F.; Komen, J.; Van der poal, J.J. and Groenen, M.A.M., 1997** Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio L.*). Animal genetics 28:129-134.
6. **Dahle, G.; Jorstad, K.E.; Rusaas, H.E. and Ottera, H., 2006.** Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morpha*) populations. Marine Science 63: 209- 215 pp.
7. **Dewoody, J.A. and Avise, J.C., 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadramous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56: 461-473 pp.
8. **Dixon, T.J.; Coman, G.J.; Arnold, S.J.; Sellars, M.J.; Lyons, R.E.; Dierens, D.; Preston, N.P. and 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 pp.
9. **Diz, P.A. and Presa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. 287: 278–285 pp.
10. **Dudgeon, D.; Arthington, A.H.; Gessner, M.O.; Kawabata, Z.I.; Knowler, D.J.; Lévêque, C.; Naiman, R.J.; Prieur-Richard, A.H.; Soto, D.; Stiassny, M.L.J. and Sullivan, C. A., 2006.** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. Biol. Rev. 81: 163-182 pp.
11. **Esmaeili, H.R.; Ebrahimi, M.; Ansari, T.H.; Teimory, A. and Gholamhosseini, G., 2009.** Karyotype analysis of Persian stone lapper, *Garra persica* Berg, 1913 (Actinopterygii: Cyprinidae) from Iran. Curr. Sci. 96: 959-962 pp.
12. **Fergusen, M., 1995.** The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. G.R. Carvalhoand, T. J. Pitcher (Eds.),

Western coastline of the Caspian Sea (Havigh River and GorganRoud River) using microsatellite markers. Taxonomy and Biosystematics, 5: 29 – 39 pp.

24. **Neigel, J.E., 1997.** A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology and Systematics. 28: 105-128 pp.
25. **Peakall, R. and Smouse, P.E., 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537-2539 pp.
26. **Rezaei, M.; Shabani, A.; Shabanpour, B. and Kashiri, H., 2010.** Genetic comparison of Caspian Sea *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) in Gorganroud and Cheshmekile (Tonekabon) rivers using microsatellite markers. Taxonomy and Biosystematics, 1: 1-15 pp.
27. **Rodzen, J.A. and May, B., 2002.** Inheritance of microsatellite loci in the polyploidy white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Genome. 54: 1064-1076 pp.
28. **Sambrok, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press. 743-745 pp.
29. **Sayili. M.; Akca. H.; Duman. T. and 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 pp.
30. **Skalla, A.; Hbyheim, B.; Glover, K. and Dahle, D., 2004.** Microsatteletie analysis in domesticated and wild Atlantic salmon. Aquaculture 240: 131-143 pp.
31. **Thorpe, J.P. and Sol-cava, A.M., 1994.** The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. Zoologica scripta. 23: 3-18 pp.
32. **Utter, F.M., 1991.** Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology. 39: 1-20 pp.
33. **Van Herwerden, L.V.; Mcllwain, J.; Al-Ouf, H.; Al-Amry, W. and Reyes, A., 2006.** Development and application of microsatellite markers for Scomberomorus commerson (Perciformes; Teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. Fish. Res. 79: 258-266 pp.
34. **Wright, B.S., 1951.** The genetical structure of populations. Annual Eugenics. 15: 323-354 pp.
35. **Wright, B.S., 1969.** Evolution and the Genetics of Population, Vol. 2: The theory of Gene frequencies. University of Chicago Press. Molecular Genetics in Fisheries. London: Chapman and Hall. 81-104 pp.
13. **Ghodsi, Z.; Shabani, A. and Shabanpour, B., 2011.** Genetic diversity of *Liza aurata* (Risso, 1810) in the coastal regions of Golstan province, using microsatellite marker. Taxonomy and Biosystematics 6: 35 – 47 pp.
14. **Hillis, D.M.; Mortiz, C. and Mable, B.K., 1996.** Molecular systematic. Sinauer Association Inc. Sunderland, MA. 655 pp.
15. **Kalinowski, S.T., 2005.** Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances. J. Hered. 94: 33-36 pp.
16. **Li, J.; Wang, G. and Bai, Z., 2009.** Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cuminggii*) estimated by microsatellite DNA. Aquaculture. 287: 286-291 pp.
17. **Li, D.; Kang, D.; Yin, Q.; Sun, Z. and Liang, L., 2007.** Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations. Genetics and Genomics 34: 984- 993 pp.
18. **Lind, C.U.; Evans, B.S.; Knauer, J.; Taylor, J.J.U. and Jerry, D.R., 2009.** Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture. 286: 12–19 pp.
19. **Lucentini, L.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Gigliarelli, L.; Natali, M. and Panara, F., 2006.** Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius*). Fisheries Research 80: 251-262 pp.
20. **Matura, R.; Sharma, S.; Barat, A.; Pande V. and Mahanta, P., 2011.** Development and characterization of microsatellite markers in *Garra gotyla* (Family: Cyprinidae, Pisces). Molecular Ecology 80: 251-262 pp.
21. **Magoulas, A., 2005.** Mitochondrial DNA. In Stock Identification Methods Applications in Fishery Science,: 311-330 pp.
22. **McQuown, E.; Krueger, C.C.; Kincaid, H.L.; Gall, G.A.E. and May, B., 2003.** Genetic comparison of Lake Sturgeon population: differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite Loci. Great Lakes Research 29: 3-13 pp.
23. **Mohamadian, S.; Rezvani Gilkolaei, S.; Kazemian, M.; Kamali, A.; Taghavi, M.; Rouholahi, Sh.; Laloei, F. and Nayerani, M., 2010.** The study of genetic diversity and population structure of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) populations in the Eastern and

36. **Yeh, F.C.; Yang, R.C. and 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.
37. **Yue, G.H.; Li, Y.; Lim, L.C. and Orban, L., 2004.** Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. Aquaculture 237, 89–102 pp.
38. **Zar, J.H., 1999**. Biostatistical analysis, 4th Ed, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
39. **Zhao, N.; Shao, Z.; Ai, W.; Zhu, B.; Brosse, S. and Chang, J., 2005.** Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. Ichthyology 21:7-13 pp.

Genetic diversity of *Garra rufa* (Heckel, 1843) in the Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province using microsatellite Markers

- **Ghasem Askari*:** Department of fishery, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box: 487-49175 Gorgan, Iran
- **Ali Shabani:** Department of fishery, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box:487-49175 Gorgan, Iran
- **Hamid Reza Rezaei:** Department of fishery, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box:487-49175 Gorgan, Iran

Received: August 2012 Accepted: November 2012

Key Words: *Garra rufa*, Genetic diversity, Microsatellite, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province

Abstract

The aim of present study was to investigate the genetic diversity of *Garra rufa* population in the Beshar and Kabgiyan rivers in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province by using six microsatellite loci. In this study fulfilled on 56 Garra individuals. According to the results, the F_{st} value was 0.024 which indicates the low genetic differentiation between the populations. The number of alleles, observed and expected heterozygosity were, 7-25, 0.000 – 1.000 (the average: 0.595) and 0.767 – 0.946 (the average: 0.855), respectively. Analysis of molecular variance showed there is low genetic variation among populations and most of the observed variation is within the populations. According to these analyses, it seems that, *Garra rufa* has desirable genetic diversity in investigated regions.

*Corresponding author's email: Askarighasem82@gmail.com