مقایسه ژنتیکی دو جمعیت ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*) در رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد گلستان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

- **لادن جهانگیری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی: ٤٣٦٤-٤١٦٣٥
- **علی شعبانی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی: ٤٣٦٤-٤١٦٣٥
- **حمیدرضا رضایی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی: ٤٣٦٤-٤١٦٣٥

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲

چکیده

ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii*) یک گونه رودخانه‌ای است که در حوزه جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتاً خوبی برخوردار می‌باشد، اما در بسیاری از آب‌های اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی این گونه با نشانگر ریزماهواره صورت نگرفته است. در این تحقیق، برای بررسی ساختار جمعیتی ماهی خیاطه در رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد استان گلستان تعداد ٥٦ نمونه (۲۸ نمونه از هر رودخانه) جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌ها به‌روش فنل- کلروفرم استخراج و با استفاده از ٦ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۰/۸۳۳ و ۰/۸۹۹ بوده و متوسط شاخص Fst، ۰/۰۱٦ می‌باشد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین رودخانه‌های مورد بررسی است. با بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، دو جایگاه در جمعیت تیل‌آباد در تعادل بوده و سایر جایگاه‌ها دارای انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ بودند ($P \leq ۰/۰۵$). آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیت‌ها وجود داشته (۱٪) و بخش عمده تنوع مشاهده‌شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد (۹۹٪).

کلمات کلیدی: ماهی خیاطه، تنوع ژنتیکی، تیل‌آباد، شیرآباد، ریزماهواره

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Ladan_jahangiri@yahoo.com

مقدمه

خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش دارند (Kirpichnikov، ۱۹۷۲). ماهی خیاطه با نام علمی *Alburnoides eichwaldii* (Bloch, 1782) یکی از گونه‌های کپورماهیان موجود در ایران می‌باشد. *Alburnoides bipunctatus* نامی بود که برای بیشتر جمعیت‌ها در اروپا و خاورمیانه از شمال فرانسه در کوه‌های آلپ به سمت شرق تا حوزه دریای سیاه، خزر و ارس به‌کار برده می‌شد، اما تحقیقات جدید نشان داد که تنوع بیش‌تری از لحاظ گونه‌ای وجود دارد و این نام‌گذاری یک دسته‌بندی اشتباه بود که به تمامی گونه‌های شناسایی‌شده این جنس داده شد (Coad، ۲۰۰۹). اهمیت ماهی خیاطه در شیلات، معمولاً به‌عنوان طعمه برای صید و از لحاظ تفریحی نگهداری در آکواریوم می‌باشد (Bogtskaya، ۱۹۹۷). Rothe (2008) ماهی خیاطه را یک گونه رودخانه‌ای معرفی کرد و بیان نمود که به‌علت فشارهای وارده انسان به رودخانه‌ها در اروپا و هم‌چنین کمیابی و اندازه کوچک جمعیت، این گونه در لیست قرمز گونه‌های در معرض خطر قرار گرفته و به‌شدت تحت حفاظت است.

تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند، بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی‌مدت یک گونه ضروری است (Bataillon و همکاران، ۱۹۹۶). به‌طورکلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است (Pujolar و همکاران، ۲۰۰۹).

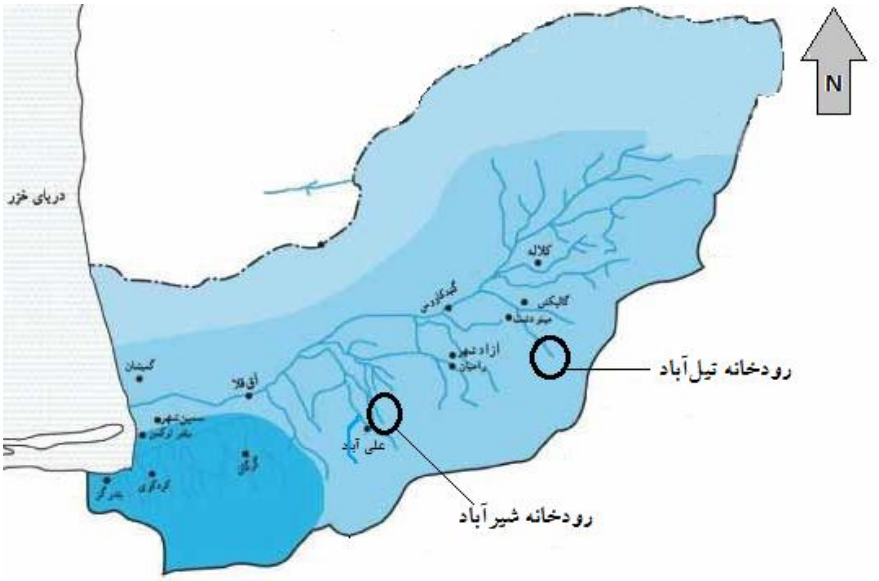
مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان دریای خزر نشان‌دهنده این واقعیت است که بسیاری از ماهیان روند گونه‌زایی را طی نموده و میکروپروسه ایجاد جمعیت‌ها هم‌چنان ادامه دارد به‌طوری که گونه‌های خزری و دریای سیاه-خزری، زیرگونه‌ها و جمعیت‌هایی را در مناطق مختلف دریای خزر تشکیل داده‌اند (رحمانی، ۱۳۸۵). احمدی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران بیان کردند که برای بررسی کامل‌تر جدایی جمعیتی، باید از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[1])، الکتروفورز و میکروستلایت[2] (ریزماهواره) استفاده نمود. هم‌اکنون کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا توجه محققان را به اعمال روش‌های دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب نموده است (Lin و همکاران، ۲۰۰۲). در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک[3] صورت می‌گرفت، اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و آثار منفی دستکاری در نشانه‌گذاری بر سلامت ماهیان و هم‌چنین، محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده از نشانگرهای مولکولی، هم‌چون ریزماهواره‌ها، آلوزایم و RAPD برای شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت (Verspoor و Jordan، ۱۹۸۹). با توجه به مطالعات وسیع انجام‌شده مشخص گردید که ریزماهواره‌ها در اکثر موجودات وجود دارند و در همه آن‌ها تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از خود نشان داده‌اند. یکی از کاربردهای ریزماهواره‌ها جداسازی جمعیت‌ها و ذخایر مختلف متعلق به یک گونه است (Hancock، ۲۰۰۰). در این تحقیق سعی شد با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه در رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۶ نمونه ماهی خیاطه از رودخانه‌های تیل‌آباد (۳۶ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی) و شیرآباد (۳۷ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی) در پاییز سال ۱۳۹۰ صید گردید (به‌طور متوسط ۲۸ نمونه از هر رودخانه) (شکل ۱). حدود ۳-۲ گرم از باله پشتی هر ماهی جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرار داده شد. استخراج DNA، به روش فنل-کلروفرم انجام پذیرفت (Hillis و همکاران، ۱۹۹۶). کیفیت و کمیت DNA استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹).

۶ جایگاه ریزماهواره LleA-071، LleC-090، Rser10، Ca3 (Dubut و همکاران، ۲۰۱۰)، MFW2 و MFW17 (Crooijmans و همکاران، ۱۹۹۷) از مطالعات انتشاریافته انتخاب شدند. عمل تکثیر برای هر یک از جایگاه‌ها انجام شد و بهترین دمای اتصال برای هر یک از آن‌ها به‌دست آمد (جدول ۱).

[1] polymerase chain reaction
[2] microsatellite
[3] meristic



شکل ۱ : موقعیت جغرافیایی رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد استان گلستان

جدول ۱ : خصوصیات جایگاه‌های به‌کار برده شده در این مطالعه

جایگاه‌ها	اندازه (جفت باز)	توالی پرایمر	دمای اتصال
LleA-۰۷۱	۳۱۲-۴۴۴	F:GTCTTAGATTGTGTAGCGGG R:ACTTCAGTTACTAAGAGATTAGTGA	۵۰
LleC-۰۹۰	۱۵۲-۳۸۴	F:TCAGACACAACTAACCGACC R:GGCGCTGTCCAGAACTGA	۵۵
Rser۱۰	۱۷۶-۲۴۸	F:TGCGTAATCGTGAAGCGGTG R:GCCACTAAAGCGCAGAAGCC	۶۰
Ca۳	۲۵۶-۳۶۰	F:GGACAGTGAGGGACGCAGAC R:TCTAGCCCCCAAATTTTACGG	۵۸
MFW۲	۱۸۰-۲۳۶	F:CACACCGGGCTACTGCAGAG R:GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	۶۱
MFW۱۷	۱۷۶-۲۲۸	F:CTCAACTACAGAGAAATTTCATC R:GAAATGGTACATGACCTCAAG	۵۰

حجم واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تکDNAپلیمراز، بافر (۱X) PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. هم‌چنین چرخه‌های حرارتی شامل ۳ سیکل: ۱ سیکل ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، درجه حرارت اتصال اختصاصی هر آغازگر (جدول ۱) به‌مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه (بسط)، و ۱ سیکل ۷۲ درجه‌ای به‌مدت ۳ دقیقه به‌عنوان مرحله بسط نهایی بود.

محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد (غیر یونیزه) جداسازی و ژل‌ها به‌روش نیترات نقره (Bassam و همکاران، ۱۹۹۱) رنگ‌آمیزی شدند.

پس از تهیه تصاویر ژل‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIORAD)، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای مختلفی هم‌چون Gel pro analyzer ۶/۰ (برای محاسبه طول قطعات)، GenAIEx ۶ (Peakall و Smouse، ۲۰۰۶) (محاسبه تعداد الل در هر جایگاه، الل موثر،

هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (Ho) و مورد انتظار (He))، آزمون ویلکاکسون غیرپارامتریک در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (Zar ، ۱۹۹۹) (برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، مورد انتظار و تنوع اللی)، GenPop (Raymond و Rousset، ۱۹۹۵) (برای تست انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ از مقایسه بین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار و هم‌چنین معنی‌دار بودن احتمال کسری هتروزیگوسیتی یا زیاد بودن هتروزیگوسیتی)، FSTAT (Goudet، ۲۰۰۱) (برای تعیین شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و سطح معنی‌داری آن)، آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم‌افزاری Genalex (به منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و هم‌چنین میزان تمایز بین جمعیتی بر اساس مدل اللی بی‌نهایت (F_{st})) و PopGen (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) (به‌منظور تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی Nei (1972) برآورد گردید. هم‌چنین برای تنظیم سطح معنی‌داری تست‌های تکرارشونده ضریب تصحیح بونفرونی استفاده شد (Rice، ۱۹۸۹).

نتایج

تعداد کل الل در سطح جایگاه‌ها در دامنه ۳۰-۹ به‌دست آمد، به‌طوری که جایگاه MFW۱۷ پایین‌ترین (۹) (در رودخانه تیل‌آباد) و جایگاه LleC-۰۹۰ بالاترین (۳۰) (در رودخانه تیل‌آباد) تعداد الل را نشان دادند. تعداد متوسط الل‌های مشاهده‌شده و موثر در تیل‌آباد به‌ترتیب ۱۶/۸۳۳ و ۱۱/۳۲۱ و در شیرآباد ۱۶/۱۶۷و ۱۱/۱۸۶ به‌دست آمد که از این نظر بین دو رودخانه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P\leq ۰/۰۵$). مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) به‌ترتیب در دامنه ۱-۰/۵ (متوسط: ۰/۸۳۳) و ۰/۹۵۷-۰/۸۴۹ (متوسط: ۰/۸۹۹) قرار داشت. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در سطح رودخانه‌ها نیز به‌ترتیب ۰/۸۲۱ و ۰/۸۴۵ برای تیل‌آباد و شیرآباد به‌دست آمد (جدول ۲). هم‌چنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، مشاهده نشد ($P\leq ۰/۰۵$).

در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، ۱۰ نمونه از ۱۲ تست مورد بررسی (۶ جایگاه × ۲ منطقه) به‌طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) انحراف از تعادل نشان دادند، اما پس از به‌کار بردن ضریب تصحیح بونفرونی ۸ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P \leq ۰/۰۰۸۳$). متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و جریان ژنی به‌ترتیب ۰/۰۷۱ و ۱۶/۱۶۰ را نشان دادند. در بررسی شاخص F_{is}، جایگاه Ca۳ و MFW۱۷ در رودخانه تیل‌آباد کسری هتروزیگوسیتی معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۰۲$) پس از اعمال ضریب تصحیح توسط نرم‌افزار FSTAT نشان داد (جدول ۲).

از نظر تمایز بین مناطق میزان شاخص F_{st} و R_{st} بر اساس آنالیز واریانس مولکولی، به‌ترتیب ۰/۰۱۳ و ۰/۰۵۱ به‌دست آمد. بررسی نتایج F_{st} حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹ درصد نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۹ درصد) درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (۱ درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد (شکل ۲).

بر اساس معیار فاصله ژنتیکی Nei میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه ۰/۷۱۷ و مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۳۳۳ به‌دست آمد.

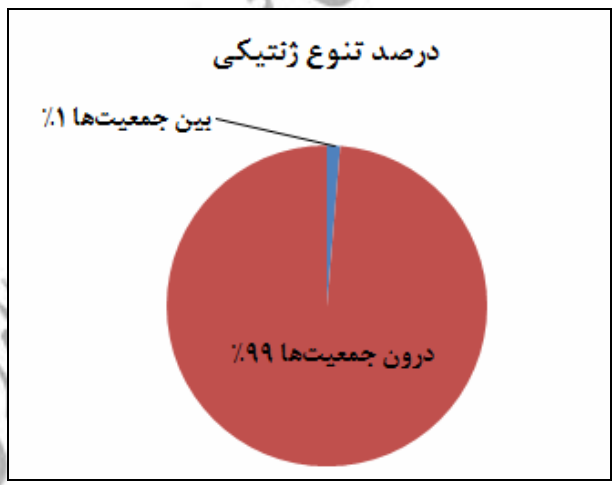
جدول ۲: تنوع ژنتیکی شش جایگاه مورد مطالعه در جمعیت‌های ماهی خیاطه

رودخانه	متغیر	LleA-۰۷۱	LleC-۰۹۰	Rser۱۰	Ca۳	MFW۲	MFW۱۷
تیل‌آباد	N_a	۱۹	۳۰	۱۵	۱۷	۱۱	۹
	N_e	۱۰/۰۵۱	۲۳/۰۵۹	۸/۶۱۵	۱۲/۶۴۵	۶/۶۱۶	۶/۹۳۸
	H_o	۰/۸۵۷	۰/۹۶۴	۱/۰۰۰	۰/۵	۰/۸۵۷	۰/۷۵۰
	H_e	۰/۹۰۱	۰/۹۵۷	۰/۸۸۴	۰/۹۲۱	۰/۸۴۹	۰/۸۵۶
	F_{is}	۰/۰۴۸	-۰/۰۰۸	-۰/۱۳۱	**۰/۴۵۷**	-۰/۰۱۰	**۰/۴۵۷**
	pHw	ns	ns	***	***	***	**
شیرآباد	N_a	۲۰	۲۳	۱۱	۱۶	۱۳	۱۴
	N_e	۱۵/۲۲۳	۱۴/۹۳۳	۷/۳۹۶	۱۱/۶۱۵	۸/۶۱۵	۹/۳۳۳
	H_o	۰/۹۶۴	۰/۸۵۷	۰/۷۵۰	۰/۶۰۷	۰/۹۶۴	۰/۹۲۹
	H_e	۰/۹۳۴	۰/۹۳۳	۰/۸۶۵	۰/۹۱۴	۰/۸۸۴	۰/۸۹۳
	F_{is}	-۰/۰۳۲	۰/۰۸۱	۰/۱۳۳	۰/۳۳۶	-۰/۰۹۱	-۰/۰۴۰
	pHw	*	***	***	***	***	*

N_a : تعداد الل، N_e : تعداد الل موثر، H_o : هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، H_e : هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F_{is} : ضریب درون‌آمیزی (مقادیر معنی‌دار به صورت پررنگ و زیرخط‌دار مشخص هستند)، 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 مورد استفاده

جایگاه‌ها	LleA-۰۷۱	LleC-۰۹۰	Rser۱۰	Ca۳	MFW۲	MFW۱۷	میانگین
Nm	۱۶/۳۴۷	۱۹/۲۴۰	۱۷/۳۵۴	۱۸/۶۸۲	۱۴/۰۰۵	۱۱/۳۳۱	۱۶/۱۶۰
F_{st}	۰/۰۱۵	۰/۰۱۳	۰/۰۱۴	۰/۰۱۳	۰/۰۱۸	۰/۰۲۲	۰/۰۱۶



شکل ۲: چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده با معیار F_{st}

جدول ۴: آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در R_{st}

	df	SS	MS	Est. var.	%	Stat	Value	Prob
بین جمعیت‌ها	۱	۵۱۶/۱۷۹	۵۱۶/۱۷۹	۶/۹۲۰	۵ درصد			
درون جمعیت‌ها	۱۱۰	۱۴۱۵۱/۰۷۱	۱۲۸/۶۴۶	۱۲۸/۶۴۶	۹۵ درصد	R_{st}	۰/۰۵۱	۰/۰۳۰

Df(درجه آزادی)، SS(مجموع مربعات)، MS(انحراف میانگین مربع)، Prob(معنی‌دار بودن انحراف بعد از ۹۹۹ جایگزینی تصادفی)

بحث

ریزماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که به‌صورت گسترده در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu و همکاران، ۲۰۰۹). این نشانگرها ارزش بالایی دارند؛ به‌طوری 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 نشانگرها نسبت داد و از طرفی، به‌دلیل هم‌بارز بودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر از سایر نشانگرها نشان می‌دهد (Liu و Cordes، ۲۰۰۴). در این بررسی از شش جایگاه استفاده شد که همگی دارای چندشکلی بودند. هتروزیگوسیتی و تعداد الل‌ها جزو شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از لحاظ رو به رو شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankham، ۲۰۰۸). هتروزیگوسیتی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیار دارد؛ زیرا هر هتروزیگوت ناقل الل‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (Diz و Presa، ۲۰۰۹). در این بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در سطح جمعیت‌های مورد بررسی نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین و رودکوچ (به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۶۸) (Dewoody و Avis، ۲۰۰۰) بالاتر بوده است. میانگین تعداد الل‌ها در هر جایگاه برای ماهیان آب شور ۱۹/۹ گزارش شده‌است (Dewoody و Avis، ۲۰۰۰) که بالاتر از میانگین تعداد الل‌ها در شش جایگاه مورد استفاده در این بررسی می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهند که غنای اللی برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به هتروزیگوسیتی مناسب‌تر است. هم‌چنین بالا بودن غنای اللی، نشان‌دهنده بالا بودن اندازه جمعیت موثر است (Diz و Presa، ۲۰۰۹). در این بررسی جمعیت هر دو رودخانه در اکثر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند، اما پس از به‌کار بردن ضریب تصحیح بونفرونی ۸ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P \leq ۰/۰۰۸۳$). جایگاه Ca۳ و MFW۱۷ در رودخانه تیل‌آباد کسری هتروزیگوسیتی بالایی را نشان داد. دلایل زیست‌شناختی این کسری به‌خوبی شناخته نشده است و عوامل زیادی هم‌چون اثر وهلاند، درون‌آمیزی، الل نول و به‌گزینی برای توضیح آن مطرح شده‌اند. جدا از دلایل بیولوژیک معمول در ایجاد کسری هتروزیگوسیتی، ریزماهواره‌ها به‌طور خاص مستعد این پدیده هستند (Diz و Presa، ۲۰۰۹). نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس F_{st} نشان داد تنها یک درصد از تنوع مشاهده‌شده مربوط به بین جمعیت‌هاست و از نظر فراوانی اللی تفاوت معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) میان مناطق مشاهده نشد. F_{st} به‌دست آمده براساس فراوانی (۰/۰۱۶) و براساس آنالیز واریانس مولکولی (۰/۰۱۳) پایین است که نشان‌دهنده تمایز بسیار پایین بین جمعیت‌هاست. براساس معیار Wright (1987) مقادیر F_{st} بین ۰/۰۵- ۰ نشان‌دهنده تمایز پایین میان نمونه‌هاست. با توجه به این که R_{st}، از اطلاعات مزبور به اندازه اللی استفاده می‌کند و وابسته به جهش نیست می‌تواند داده‌های بیولوژیک مناسب‌تری را نسبت به معیار F_{st} فراهم کند (Balloux و Moulin، ۲۰۰۲) (جدول ۴).

بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz و Presa، ۲۰۰۹). طبق پیراسنجه‌های عنوان‌شده توسط Thorp (۱۹۸۲) که مقدار شباهت ژنتیکی را بر اساس سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره‌داران محاسبه کرد، برای جمعیت‌هایی که به گونه‌های مشابه تعلق دارند، شباهت ژنتیکی بین ۰/۹۰-۰/۸۰ و در گونه‌های متعلق به جنس‌های مشابه بین ۰/۸۵-۰/۳۵ قرار دارد که مقدار به‌دست آمده در این بررسی (۰/۷۱۷) در محدوده گونه‌های متعلق به جنس‌های مشابه قرار دارد. نتایج این بررسی حاکی از وجود جریان ژنی بالا بین رودخانه‌های مورد بررسی است. در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز فاصله ژنتیکی نسبتاً پایینی بین مناطق مورد بررسی مشاهده شد.

با وجود این، ایجاد تدابیری در خصوص حفظ و تقویت تنوع مشاهده‌شده ضروری به‌نظر می‌رسد تا از دست رفتن تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی اتفاق نیفتد. در این خصوص بهترین روش، احیای محل‌های تخم‌ریزی طبیعی این گونه یعنی رودخانه‌هاست، زیرا دخالت بی‌رویه انسان در رودخانه‌ها (ایجاد سد بر روی رودخانه‌ها در راستای توسعه صنعت و کشاورزی، احداث کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی در حاشیه رودخانه، برداشت بی‌رویه شن و ماسه از بستر و حاشیه رودخانه) صدمات جبران‌ناپذیری را به گونه‌های رودخانه‌ای وارد می‌سازد. از آن جایی که ماهی خیاطه کم‌تر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است نیاز به مطالعات بیش‌تر در زمینه ژنتیک جمعیت این ماهی می‌باشد.

منابع

۱. **احمدی، س.ا؛ وثوقی، ع؛ وطن‌دوست، ص؛ قلیچی،ا. و صیدانلو، ز. ۱۳۹۰.** برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر ۲:۵، ۸۰-۶۵.

۲. **رحمانی، ح. ۱۳۸۵.** پویایی‌شناسی جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی شاه‌کولی *Chalcaburnus chalcoides* در رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود. رساله دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.۱۰۲ صفحه.

3. **Balloux, F., and Moulin, N., 2002.** The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Molecular Ecology; vol. 11, pp. 155-165.
4. **Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, G.M., 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry; vol. 84, pp. 680-683.
5. **Bataillon, T.M., David, J.L., Schoen, D.J., 1996.** Neutral genetic markers and conservation: simulated germplasm collections. Genetics; vol. 144, pp. 409-417.
6. **Bogtskaya, N.G., 1997.** Contribution of the knowledge of lencicsine fishes of Asia Minor. Mittehlungen aus dem Hamburghschen Zoologischen Museum und Institute; vol. 94, pp. 161-186.
7. **Coad, B, 2009.** Iranian freshwater fishes. Available from http://www.briancoad.com. Accessed 24th March 2009.
8. **Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der poal, J.J., Groenen, M.A.M., 1997.** Microsatellite markers in common carp *Cyprinus carpio* L. Animal genrtics; vol. 28, pp. 129-134.
9. **Dewoody, J. A., Avise, J. C., 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Fish biology; vol. 56, pp. 461-473.
10. **Diz, P. A., Presa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture; vol. 287, pp. 278-285.
11. **Dubut, V., Sinama, M., Martin, J.F., Meglecz, E., Fernandez, J., Chappaz, R., Gilles, A., Costedoat, C., 2010.** Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. BMC Research Notes, 3:135.
12. **Frankham, R., 2008.** Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology; vol. 17, pp. 325-333.
13. **Goudet, J., 2001.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Retrieved fromhttp://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. On: 22 June 2008.
14. **Hancock, J.M., 2000.** Microsatellite and other simple sequence. Oxford university press, London. 102 P.
15. **Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., Zimmer, E.A., 1996.** Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular systematics (eds. Hillis DM, Mortiz C, Mable BK) pp. 321-384. Sinauer Associates, Sunderland.
16. **Lin, Y. S., Poh, Y. P., Lin, S. M. and Tzeng, C. S., 2002.** Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological Studies; vol. 41, pp. 421-430.
17. **Liu, Z., Cordes, J. F., 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture; vol. 238, pp. 1-37.
18. **Liu, F., Xia, J. H., Bai, Z. H., Fu, J. J., Li, J. L. and Yue, G. H., 2009.** High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. Aquaculture; vol. 297, pp. 51-56.
19. **Kirpichnikov, V.S., 1972.** Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Russian Journal of Genetics; vol. 8, No. 1, pp. 65-72.
20. **Nei, M., 1972.** Genetic distance between populations. American Naturalist; vol, 106, pp. 283- 92.
21. **Peakall, R., Smouse, P.E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes; vol. 6, pp. 288-295.
22. **Pujolar, J.M., Deleo, G.A., Ciccotti, E., Zane, L., 2009.** Genetic composition of Atlantic and Mediterranean of European eel *Anguilla Anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. Journal of Fish Biology; vol. 74, pp. 2034-2046.
23. **Raymond, M., Rousset, F., 1995.** GENPOP (Version 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. Heredity; vol. 86, pp. 248-249.
24. **Rice, W.R., 1989.** Analyzing tables of statistical tests. Evolution; vol. 43, pp. 223-225.

25. **Rothe, U., 2008.** Der Shneider *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) erstmal in Brandenbug nachgewiesen. Zoosystematics and Evolution; vol. 78, No.1, pp. 183-185.
26. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989.** Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular cloning: A laboratory manual. (eds. Ford N, Nolan C, Fregusen, M.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 743-745.
27. **Thorp, J. P., 1982.** The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics; vol. 13, pp. 139-168.
28. **Verspoor, E. and Jordan, W. C., 1989.** Genetic variation at the Me-2 locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. Fish Biology; vol. 35, pp. 205-213.
29. **Wright, S., 1987.** Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. 125 P.
30. **Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1999.** POPGEN 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.
31. **Zar, J.H., 1999.** Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jwesey.

Genetic Comparison of two Spirlin Population *Alburnoides eichwaldii* (Bloch, 1782) in Tilabad and Shirabad streams (Golestan, Iran) using Microsatellite Markers

- **Ladan Jahangiri*:** Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran
- **Ali Shabany:** Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran
- **Hamidreza Rezaei:** Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran

Received: May 2013 Accepted: August 2013

Key words: *Alburnoides eichwaldii***,** Genetic diversity, Microsatellite, Shirabad, Spirlin, Tilabad

Abstract

Spirlin (*Alburnoides eichwaldii*) is a stream species that has a good abundance in southern basin of Caspian sea, but it is supposed to be extincted in many inland waters of Europe. There hasn't been any study about genetic diversity of this species yet. In this study, to investigate of Spirlin population structure in Tilabad and Shirabad streams in Golestan province 56 samples (28 samples from each stream) were collected. DNA was extracted by phenol-chloroform method and 6 microsatellite loci were used. Results of this study showed that observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.833 and 0.899, respectively and the F_{st} value was 0.016 which indicates a low genetic differentiation between the Tilabad, Shirabad and Kaboodwal populations. In examining deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, two loci in Tilabad population were balanced and other loci had a significant diviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P \leq 0.05$). According to the results, the F_{st} values were 0.020. Most of the loci showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Analysis of molecular variance showed there is low genetic variation among populations (1%) and most of the observed variation is within the populations (99%).

* Corresponding Author's email: Ladan_jahangiri@yahoo.com