



بررسی ساختار جمعیتی (*Oxynoemacheilus angorae* (Steindachner, 1897) در رودخانه‌های قشلاق (استان کردستان)، سفید برگ و گاماسیاب (استان کرمانشاه) با

استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

حدیثه کشیری^{۱*}، علی شعبانی^۱، زهره قدسی^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	سگ ماهی آنگورا، <i>Oxynoemacheilus angorae</i> ، از ماهیان آب شیرین و بومی ایران می‌باشد. در تحقیق حاضر به منظور بررسی ساختار جمعیتی سگ ماهی آنگورا در رودخانه‌های قشلاق (کردستان)، سفید برگ و گاماسیاب (کرمانشاه)، از شش نشانگر ریزماهوره استفاده شد که همگی پلی مورفیسم نشان دادند. متوسط تعداد الل و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۱۴/۳۳ و ۰/۸۲ به دست آمد که حاکی از غنای اللی و تنوع ژنتیکی مناسب این گونه در مناطق مورد بررسی می‌باشد. در بررسی انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ، ۱۰ مورد از ۱۸ تست مورد بررسی (سه جمعیت در شش جایگاه ژنی)، انحراف معنی دار پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی نشان دادند. در این راستا، در برخی جایگاه‌های مورد مطالعه کسری هتروزایگوسیتی معنی داری مشاهده شد. در بررسی شاخص‌های Fst (۰/۰۳۳) و Rst (۰/۰۴)، تمایز ژنتیکی پایینی بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی مشاهده شد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که بالاترین میزان تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. همچنین بالاترین میزان فاصله ژنتیکی بین مناطق سپید برگ و گاماسیاب مشاهده شد. نتایج حاصل از دندروگرام UPGMA و مقادیر فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که احتمالاً جمعیت‌های جدایی از سگ ماهی آنگورا در مناطق مورد بررسی وجود دارد.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۳/۱۲/۲۵	
اصلاح: ۹۴/۰۲/۲۳	
پذیرش: ۹۴/۰۲/۳۰	
کلمات کلیدی:	
پلی مورفیسم	
جمعیت	
ریزماهوره	

مقدمه

در بین ماهیان آب شیرین ایران، سگ ماهیان جویباری متعلق به خانواده Balitoridae با ۲۳ گونه، ۱۱ درصد جمعیت ماهیان آب شیرین را شامل می‌شود به طوری که بعد از خانواده کپورماهیان با ۸۱ گونه، عنوان دومین خانواده بزرگ آب شیرین کشور را به خود اختصاص داده است (Coad, 2013). اعضای این خانواده شامل ماهیانی کوچک با پراکنش محدود بوده که معمولاً در بستر آب‌های جاری یافت می‌شوند (Abdoli et al., 2010). سگ ماهی آنگورا با نام علمی *Oxynoemacheilus angorae* از گونه‌های بومی ایران می‌باشد. اطلاعات محدودی در خصوص زیستگاه و نیازهای اکولوژیکی این گونه در دسترس می‌باشد (Coad, 2013). به طور کلی، جمعیت سگ ماهیان جویباری بنا به دلایل مختلف از جمله سد سازی، ورود فاضلاب‌های تصفیه نشده، انحراف جریان رودخانه‌ها جهت آبیاری اراضی و برخی عوامل دیگر رو به کاهش می‌باشد (Abdoli et al., 2010). با در

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hadiskashiri@gmail.com

نظر گرفتن نقش اکولوژیکی این ماهیان در اکوسیستم‌های آب شیرین و همچنین اهمیت حفظ تنوع زیستی به عنوان شاخص مهمی از توسعه یافتگی کشورها، آگاهی از ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت این ماهیان امری ضروری به نظر می‌رسد. تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط سازمان حفاظت جهانی برای برنامه‌های مربوط به حفظ ذخایر طبیعی می‌باشد (Lucentini *et al.*, 2009). تنوع ژنتیکی که شامل هرگونه تغییر و تنوع در نوکلئوتیدها، ژن‌ها، کروموزوم‌ها و یا ژنوم کامل موجودات است (Wang *et al.*, 2009)، به عنوان اولین پیش نیاز جمعیت‌های وحشی به منظور حفظ سازگاری در شرایط محیطی در حال تغییر مطرح می‌باشد (Diz and Presa, 2009). در واقع، کمیت و کیفیت تنوع ژنتیکی می‌تواند اثرات مستقیمی بر پایداری جمعیت‌های طبیعی بگذارد. این در حالیست که چنین تاثیراتی بر جمعیت‌های کوچک ماهیان و همچنین جمعیت‌هایی که بنا به دلایل مختلف در معرض کاهش قرار دارند بسیار تشدید می‌گردد (Frankham *et al.* 2002; Reed and Frankham, 2003).

در ابتدا ارزیابی ساختار جمعیت‌ها، از طریق بررسی صفات مورفومتریک و مریستیک انجام می‌پذیرفت اما با در نظر گرفتن عواملی همچون حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و یا محدود بودن داده‌های حاصل از تفسیر آن، نشانگرهای مولکولی گوناگونی توسعه یافتند که ارزشمند بودن آن‌ها در مطالعات مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها اثبات شده است. در بین نشانگرهای موجود، ریزماهوره‌ها^۱ یا تکرارهای توالی ساده (SSRs) به عنوان ابزاری مناسب، دقیق و در عین حال ساده کاربرد گسترده‌تری در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌های مختلف ماهیان داشته‌اند (Verspoor and Jordan, 1989). ریزماهوره‌ها که نشان دهنده نوع منحصر به فردی از توالی‌های ژنومی تکراری پشت سر هم می‌باشند به فراوانی در سراسر ژنوم وجود داشته و سطوح بالای چندشکلی اللی را نمایان می‌سازند. این نشانگرها به راحتی قادر به تکثیر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشند. ویژگی‌های مذکور موجب شده تا ریزماهوره‌ها در مطالعات پایه و کاربردی گوناگون کاربرد موفقیت داشته باشند (Chistiakov *et al.*, 2006). Bartfai و همکاران (۲۰۰۳) نیز ریزماهوره‌ها را به عنوان کارآمدترین نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در بین سایر نشانگرها معرفی نمودند لذا در بررسی حاضر نیز از نشانگرهای ریزماهوره جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی سگ ماهی جویباری استفاده گردید. تاکنون در خصوص ارزیابی ساختار ژنتیکی سگ ماهی آنگورا در ایران اطلاعاتی گزارش نشده و بررسی‌های صورت گرفته در این زمینه محدود به برخی دیگر از گونه‌های سگ ماهیان بوده است. در این راستا، محققین تنوع ژنتیکی قابل قبولی را از نظر غنای اللی و هتروزیگوسیتی برای گونه‌های *Paraschistura nielseni* در رودخانه‌های شاپور (فارس)، دالکی و مند (بوشهر) (عمویی و همکاران، ۱۳۹۳) و *Turcinoemacheilus kossiwigi* در رودخانه‌های بریم (کهگیلویه و بویراحمد) و حیدرآباد (خوزستان) (عسگری و همکاران، ۱۳۹۳a) گزارش نمودند. همچنین در تحقیق دیگری توسط عسگری و همکاران (۱۳۹۳b)، سطح تمایز ژنتیکی و تنوع بین جمعیت پایینی برای گونه *Oxynoemacheilus kiabii* بین دو حوضه رودخانه گاماسیاب در استان‌های کرمانشاه و همدان گزارش گردید. در این راستا، با توجه به عدم وجود اطلاعات در خصوص ساختار ژنتیکی *O. angorae* که از گونه‌های بومی کشور محسوب می‌گردد، در بررسی حاضر به ارزیابی ساختار ژنتیکی این گونه در رودخانه‌های قشلاق (کردستان)، سفید برگ و گاماسیاب (کرمانشاه) که از مناطق عمده پراکنش این ماهی می‌باشند پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها و استخراج DNA

سگ ماهیان آنگورا *O. angorae* از رودخانه‌های قشلاق (استان کردستان)، سفید برگ و گاماسیاب (استان کرمانشاه) (جدول ۱) جمع آوری (شکل ۱) و بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر برای گونه مورد نظر (Coad, 2014) شناسایی شدند. حدود ۲ تا ۳ گرم از باله دمی یا سینه‌ای هر ماهی (۲۸ قطعه ماهی به ازای هر منطقه) جداسازی و تا زمان استخراج DNA در تیوب‌های حاوی الکل اتانول ۹۶٪ قرار داده شده و جهت انجام آزمایشات مولکولی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم (Hillis *et al.*, 1996)

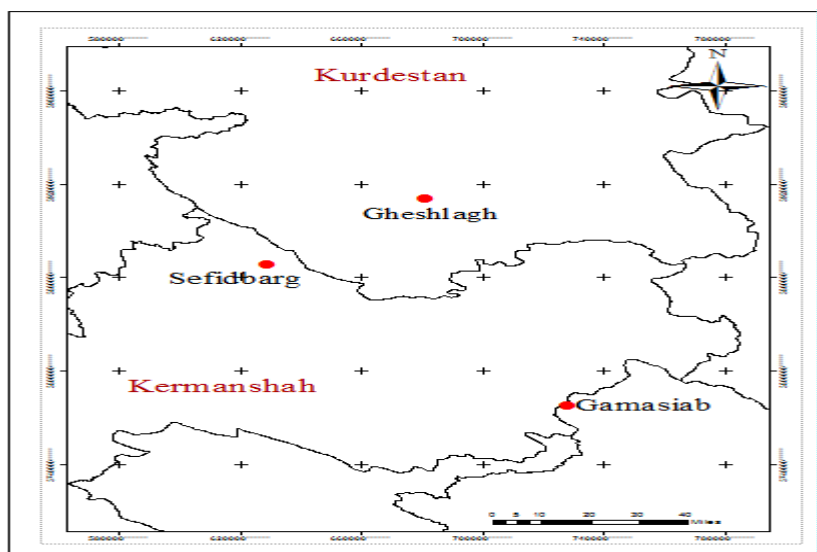
^۱ Microsatellites

^۲ simple sequence repeats

استخراج و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان شروع آزمایشات مولکولی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از بایوفتومتر و الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید (Sambrook *et al.*, 1989).

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی مناطق مورد بررسی

نام منطقه	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)
قشلاق	۳۵° ۱۸' ۷۹,۰۱"	۴۶° ۵۹' ۳۱,۱۱"
سفید برگ	۳۴° ۵۶' ۴۸,۶۱"	۴۶° ۲۴' ۲۴,۲۹"
گاماسیاب	۳۴° ۰۶' ۵۰,۳۴"	۴۷° ۲۸' ۲۴,۱۴"



شکل ۱. مناطق نمونه برداری *O. angorae*

تجزیه و تحلیل‌های ریزماهواره‌ای

از شش جفت آغازگر ریزماهواره‌ای IC487 و IC720 (Taylor *et al.*, 2001) Bbar3, Bbar7, Bbar8, Bbar11 (Bang *et al.*, 2009) جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد (جدول ۱). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز برای هر یک از آغازگرها انجام و بهترین دمای اتصال برای هر یک از آنها به دست آمد. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول (۲) آورده شده است. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل اکریل آمید ۱۰٪ (غیر یونیزه) جداسازی شدند. ژل‌های به دست آمده از الکتروفورز عمودی محصولات، به روش نیترا نقره رنگ آمیزی (Bassam *et al.*, 1991) و تصاویر آنها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD) ثبت گردید. در نهایت طول قطعات با استفاده از نرم افزار 3.0 Gel pro analyzer محاسبه گردید.

جدول ۱. خصوصیات جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی

جایگاه ژن	تعداد کل ال	دامنه طولی (جفت باز)	توالی	دمای اتصال (°C)
Bbar3	۲۶	۱۷۰-۲۴۷	F: TACCCTCCTAGGCTTGCTGA R: CTGGGGCTTTTCATTTTGAG	۵۵
Bbar7	۱۹	۱۰۰-۲۲۸	F: GAGCAACAGCTGCTGTAGGA R: GTCGGACCAACCTGAAAACCT	۵۶
Bbar8	۲۵	۹۶-۲۲۸	F: CTCCTGGATTACTCCCTGA R: AGCGCGTCTGTGAAGTTTCT	۵۶
Bbar11	۱۶	۱۴۰-۱۸۸	F: GCGGAGGAAGAGAAAACACAG R: CTATGCCATTGCCACACATC	۵۵
IC720	۱۱	۱۵۶-۲۱۲	F: CGCAATGCATTCTCCAATCTCAA R: GACCCCACTCATCACTGCCTCTC	۵۷
IC487	۱۸	۱۴۶-۲۰۰	F: GATTATGCCATGCCGTTGACTGT R: GCTGTTGAAAACCTCACCCCTGTG	۵۷

جدول ۲. سیکل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱ چرخه	واسرشت	۳ دقیقه	۹۴
۳۵ چرخه	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴°C
	اتصال	۳۰ ثانیه	درجه حرارت اتصال (جدول ۱)
۱ چرخه	تکثیر	۶۰ ثانیه	۷۲°C
	تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲°C

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار Microchecker 2.2.1 (Oosterhout *et al.*, 2004) جهت بررسی امکان وجود ال‌های نول، خطای دسته بندی و امکان از دست رفتن ال‌های بزرگ استفاده گردید. از بسته نرم افزاری GenAlex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) جهت تعیین تعداد ال‌ها در جایگاه‌ها، تعداد ال‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان F_{st} بر اساس مدل الی بی نهایت (IAM) و R_{st} بر اساس مدل جهش پله‌ای (SMM) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی استفاده شد. به منظور تست انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ نیز از نرم افزار GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 1995) استفاده گردید. این نرم افزار برای ارزیابی احتمال انحراف معنی دار از روش زنجیره مارکوف با استفاده از پارامترهای ذیل عمل می‌کند: عدم حفظ: ۱۰۰۰۰، تکرارها: ۱۰۰۰ و دسته‌ها: ۵۰۰. شاخص درون آمیزی (Fis) و سطح معنی داری آن نیز با استفاده از نرم افزار FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) تعیین گردید. همچنین مقادیر شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار PopGene (Yeh *et al.*, 1999) مشخص گردید. دندروگرام UPGMA بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی نیز با استفاده از همین نرم افزار ترسیم گردید.

نتایج

هر شش جایگاه مورد استفاده در این بررسی حالت چند شکلی نشان دادند. نتایج حاصل از نرم افزار Microchecker علایمی از وجود خطای دسته بندی یا از دست رفتن ال‌های بزرگ را نشان نداد اما امکان وجود ال‌های نول در جایگاه‌های ژنی Bbar7 و IC720 در نمونه‌های گاماسیاب کرمانشاه را تأیید نمود. اطلاعات مربوط به ال‌های مشاهده شده و مؤثر و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، در جدول ۳ آورده شده است. میزان متوسط ال‌های مشاهده شده در رودخانه‌های گاماسیاب، قشلاق و سپید برگ به ترتیب ۱۱/۸۳، ۱۵/۶۶ و ۱۵/۵۰ به دست آمد که در این میان بالاترین و پایین‌ترین میزان

متوسط به ترتیب در سطح جایگاه‌های Bbar3 (۱۹) و IC720 (۱۰) مشاهده شد. میزان الل‌های مؤثر نیز در محدوده ۰/۷-۱۵/۰۷-۵/۰۷ به دست آمد که بالاترین و پایین‌ترین میزان متوسط به ترتیب مربوط به جایگاه‌های Bbar3 (۱۳/۷۲) و IC720 (۵/۸۸) بود. مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) در محدوده ۰/۲۸-۱/۰۰ (میانگین: ۰/۸۲) قرار داشت به طوری که بالاترین مقدار متعلق به نمونه‌های رودخانه گاماسیاب (جایگاه‌های Bbar8 و IC487) و سفید برگ (جایگاه‌های Bbar3، IC720 و IC487) بود. در این راستا نمونه‌های رودخانه گاماسیاب در جایگاه Bbar7 پایین‌ترین میزان Ho را نشان دادند. هتروزایگوسیتی مورد انتظار نیز در محدوده ۰/۹۳-۰/۸۰ (میانگین: ۰/۸۸) به دست آمد که پایین‌ترین میزان مربوط به رودخانه گاماسیاب (جایگاه IC720) بود.

جدول ۳. تنوع ژنتیکی شش جایگاه ژنی مورد استفاده برای گونه *O. angorae*

IC487	IC720	Bbar11	Bbar8	Bbar7	Bbar3	منطقه/جایگاه
۱۰	۱۱	۹	۱۲	۱۲	۱۷	Na
۹/۳۸	۵/۰۷	۵/۶۲	۸/۲۹	۷/۳۲	۱۱/۴۴	Ne
۱/۰۰	۰/۳۲	۰/۷۵	۱/۰۰	۰/۲۸	۰/۸۹	Ho
۰/۸۹	۰/۸۰	۰/۸۲	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۹۱	He
***	***	ns	*	***	***	pHw
۱۴	۱۱	۱۶	۱۹	۱۴	۲۰	Na
۹/۲۷	۵/۴۴	۹/۸۶	۱۲/۶۴	۱۰/۵۲	۱۴/۶۵	Ne
۰/۹۶	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۹۲	۰/۷۵	۰/۸۹	Ho
۰/۸۹	۰/۸۱	۰/۸۹	۰/۹۲	۰/۹۰	۰/۹۳	He
***	***	ns	***	ns	ns	pHw
۱۷	۸	۱۲	۲۰	۱۶	۲۰	Na
۱۱/۹۶	۷/۱۲	۷/۱۶	۱۴/۲۵	۹/۸۰	۱۵/۰۷	Ne
۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۲	۰/۸۲	۰/۷۱	۱/۰۰	Ho
۰/۹۱	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۹۳	۰/۸۹	۰/۹۳	He
Ns	ns	ns	Ns	***	*	pHw

pHw: تست احتمال تعادل هاردی-وینبرگ پس از ضریب تصحیح بونفرونی (ns: عدم معنی داری، *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱)

انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ برای تمام ترکیبات جایگاه ژنی- جمعیت بررسی گردید (جدول ۳). در این خصوص، از بین ۱۸ تست مورد بررسی (سه جمعیت در شش جایگاه ژنی) ۱۰ مورد پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، انحراف معنی داری از تعادل نشان دادند. این در حالی بود که نمونه‌های رودخانه گاماسیاب در جایگاه ژنی Bbar11، قشلاق در جایگاه‌های Bbar3، Bbar7 و Bbar11 و همچنین سفید برگ در جایگاه‌های Bbar8، Bbar11، IC720 و IC487 در تعادل قرار داشتند. در بررسی ضریب درون آمیزی (Fis)، در جایگاه‌های ژنی Bbar7، Bbar11 و IC487 کسری هتروزایگوسیتی مشاهده شد که در این میان، جایگاه‌های Bbar7 و IC487 در منطقه گاماسیاب کسری معنی‌دار (P≤0.002) پس از اعمال ضریب تصحیح توسط نرم افزار Fstat نشان دادند. در این راستا، متوسط شاخص Fis، ۰/۰۷۰ به دست آمد به نحوی که جایگاه Bbar7 بالاترین میزان این شاخص را نشان داد (جدول ۴). در بررسی میزان جریان ژنی، متوسط شاخص Nm، ۴۰/۸ به دست آمد که بالاترین و پایین‌ترین میزان به ترتیب در جایگاه‌های Bbar3 و IC487 وجود داشت (جدول ۴). همچنین از نظر میزان جریان ژنی و تمایز ژنتیکی بین مناطق مورد بررسی بالاترین سطح جریان (۱۴/۵) و در عین حال پایین‌ترین سطح تمایز (۰/۰۱۷) بین نمونه‌های مناطق سفید برگ و قشلاق مشاهده شد (جدول ۵). متوسط میزان شاخص تمایز ژنتیکی (Fst) نیز بر اساس فراوانی الل‌ها، ۰/۳۳/۰ به دست آمد (جدول ۴). همچنین بررسی نتایج Fst حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز حاکی از وجود تنوع ژنتیکی

بالا در درون جمعیت‌ها بود به طوری که تنها ۳ درصد تنوع مشاهده شده در بین جمعیت‌ها وجود داشت. نتایج حاصل از تست Rst نیز مبین تنوع درون جمعیتی بالا و تنوع بین جمعیتی پایین در مناطق مورد بررسی بود.

جدول ۴. شاخص درون آمیزی (Fis)، تمایز ژنتیکی (Fst) و جریان ژنی (Nm) در سطح شش جایگاه مورد بررسی

میانگین	IC720	IC487	Bbar11	Bbar8	Bbar7	Bbar3	
۰/۰۷۰	-۰/۰۹۷	۰/۱۶۴	۰/۰۱۸	-۰/۰۰۷	۰/۳۴۴	-۰/۰۰۳	Fis
۰/۰۳۳	۰/۰۲۶	۰/۰۵۲	۰/۰۴۷	۰/۰۳۳	۰/۰۲۲	۰/۰۱۹	Fst
۸/۴۰	۹/۲۳	۴/۵۹	۵/۰۹	۷/۴۱	۱۱/۲۳	۱۲/۸۶	N _m

جدول ۵. میزان Nm و Fst بر اساس فراوانی برای مناطق مورد بررسی

مناطق نمونه برداری	گاماسیاب	قشلاق	سفید برگ
گاماسیاب		۱۰/۵۱	۷/۰۹
قشلاق	۰/۰۲۳		۱۴/۱۵
سفید برگ	۰/۰۳۴	۰/۰۱۷	

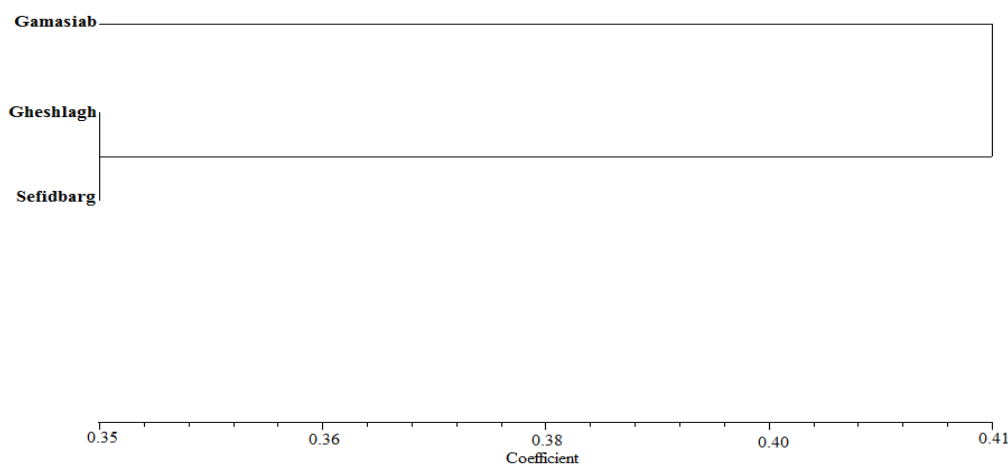
اعداد بالا و پایین قطر به ترتیب نشان دهنده جریان ژنی و تمایز ژنتیکی می باشد

در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی، بالاترین و پایین‌ترین میزان فاصله ژنتیکی به ترتیب بین نمونه‌های مناطق گاماسیاب با سفید برگ و قشلاق با سفید برگ مشاهده گردید (جدول ۵). طبق دندروگرام UPGMA بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز جمعیت رودخانه‌های قشلاق و سفید برگ در گروهی جدا از جمعیت رودخانه گاماسیاب قرار گرفتند (شکل ۲).

جدول ۶. ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی

مناطق نمونه برداری	گاماسیاب	قشلاق	سفید برگ
گاماسیاب		۶۶/۰	۴۹/۰
قشلاق	۰/۴۱		۶۹/۰
سفید برگ	۰/۷۱	۰/۳۶	

اعداد بالای و پایین قطر به ترتیب نشان دهنده شباهت و تفاوت ژنتیکی می باشد



شکل ۲. دندروگرام UPGMA برای نشان دادن روابط فیلوژنتیک بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی در گونه *O. angorae*

بحث

ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌های مختلف ماهیان در طبیعت می‌تواند با گذشت زمان تحت تاثیر برخی عوامل فیزیکی و زیستی همچون تخریب زیستگاه، آلودگی‌های محیطی، درون آمیزی، جهش در سطوح مختلف و عواملی از این قبیل دستخوش تغییراتی گردد (Nasren et al., 2009). در این راستا، تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از شاخص‌های مهم وضعیت اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی و به عنوان ابزاری منحصر به فرد و توانمند جهت ارزیابی و مدیریت جوامع زیستی مطرح می‌باشد (Zhou et al., 2004; Avise, 2000). لذا، آگاهی از وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های مربوط به گونه‌های مختلف ماهیان به ویژه گونه‌هایی که در معرض کاهش جمعیت قرار دارند از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این خصوص، نشانگرهای ریزماهوره در ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیکی، کاربرد گسترده‌تری نسبت به سایر نشانگرها دارند (Liu and cordes, 2004). متأسفانه گونه *O. angorae* فاقد جایگاه ژنی اختصاصی بوده و جایگاه‌های مورد استفاده در این بررسی از مطالعات انجام شده روی گونه‌های *Iksookimia choii* (Bang et al., 2009) و *Barbatula barbatula* (Taylor et al., 2001) انتخاب شدند. هر شش جایگاه مورد استفاده در این تحقیق، پلی مورفیسم نشان دادند. تعداد متوسط ال‌ها و همچنین میزان هتروزیگوسیتی به عنوان شاخص‌هایی مهم در ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها مطرح می‌باشند. با این وجود، تحقیقات نشان داده که غنای اللی که بالا بودن آن نشان دهنده بالا بودن اندازه جمعیت موثر است، معیار مناسب‌تری نسبت به هتروزیگوسیتی در ارزیابی سطح تنوع نمونه‌ها بوده و هتروزیگوسیتی بیشتر مبتنی بر تغییرات تصادفی در فراوانی ژنی می‌باشد (Diz and Presa, 2009). مطالعات پیشین توسط Dewoody and Avise (2000) نشان داده که روندی افزایشی در میزان هتروزیگوسیتی و غنای اللی از ماهیان آب شیرین به سمت ماهیان آنادروموس و سپس دریایی وجود دارد. محققین مربوطه با ارزیابی تنوع ریزماهوره‌ای ۷۸ گونه از ماهیان آب شیرین، متوسط تعداد ال و هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۷/۵ و ۰/۴۶ گزارش نمودند. در بررسی حاضر تعداد ال و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب در محدوده ۸-۲۰ (میانگین: ۳۳/۱۴) و ۰/۱-۲۸/۰ (میانگین: ۸۲/۰) به دست آمد. در ارزیابی نمونه‌های متعلق به مناطق مختلف نیز مقادیر هتروزیگوسیتی و تعداد ال مشاهده شده برای رودخانه‌های گاماسیاب، قشلاق و سپید برگ، بالاتر از مقادیر گزارش شده برای ماهیان آب شیرین (Dewoody and Avise, 2000) بوده است بنابراین می‌توان ادعا داشت که گونه *O. angorae* از غنای اللی و سطح تنوع ژنتیکی قابل قبولی در هر یک از مناطق مورد بررسی برخوردار می‌باشد. شاید بتوان یکی از دلایل احتمالی سطح بالای تنوع مشاهده شده در این بررسی را مقاومت نسبی این گونه به آلودگی (IUCN, 2014) در نظر گرفت. در این خصوص، Knapen و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تنوع ژنتیکی سگ ماهی *Barbatula barbatula* در سیستم‌های رودخانه‌ای مختلف در شمال بلژیک، تنوع نسبتاً بالایی (متوسط ال: ۵/۹، متوسط هتروزیگوسیتی: ۷۶/۰) را در مقایسه با مقادیر مطرح شده برای ماهیان آب شیرین گزارش نمودند. محققین مقاومت بالای این گونه به آلودگی و انعطاف پذیری اکولوژیکی آن را به عنوان یک دلیل احتمالی تنوع موجود در مناطق مورد بررسی مطرح نمودند (Knapen et al., 2009). در تحقیقی دیگر، Askari و Shabani (۲۰۱۳) سطح مطلوبی از تنوع ژنتیکی (متوسط ال: ۱۳، متوسط هتروزیگوسیتی: ۵۶/۰) را برای سگ ماهی *Paraschistura bampurensis* در رودخانه‌های شاپور و بریم گزارش نمودند. به طور کلی اطلاعات محدودی در خصوص زیستگاه و نیازهای اکولوژیکی سگ ماهی آنگورا در دسترس می‌باشد (Coad, 2013). در این راستا طباطبایی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی فاکتورهای محیطی مؤثر در پراکنش سگ ماهی آنگورا در رودخانه کردان بیان داشتند که دو فاکتور سرعت جریان آب و بستر رودخانه می‌تواند اهمیت بالایی در تراکم و پراکنش این گونه داشته باشد. مناطق مورد بررسی در این تحقیق به ویژه رودخانه قشلاق نیز با مسابلی از قبیل کاهش میزان آب و تغییر بافت بستر ناشی از عواملی همچون بروز خشکسالی، سد سازی و برداشت شن و ماسه مواجه می‌باشند. از طرف دیگر هر سه رودخانه مذکور مستعد ورود آلودگی‌های مختلف ناشی از فعالیت‌های صنعتی و یا گردشگری بومی و غیربومی می‌باشد لذا ممکن است علی رغم سطح تنوع اللی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این بررسی و همچنین مقاومت نسبی این گونه به حضور آلودگی‌های خفیف ارگانیک، افزایش بیش از پیش ورود آلاینده‌های مختلف به داخل رودخانه‌های مذکور تنوع ژنتیکی این گونه بومی را در دراز مدت تحت تأثیر قرار دهد. در واقع، حضور آلاینده‌های مختلف می‌تواند با اثر بر قابلیت تولید مثلی ماهی، فراوانی برخی ژنوتیپ‌ها را دستخوش تغییراتی نموده و در نهایت منجر به حذف برخی ال‌ها و کاهش تنوع ژنتیکی

گردد. از طرف دیگر برخی آلاینده‌ها با افزایش احتمال وقوع جهش می‌توانند در کوتاه مدت باعث افزایش تنوع ژنتیکی در جمعیت گردند اگر چه بسته به نوع جهش در دراز مدت ممکن است اثرات زیانباری را برای جمعیت پدید آورند به طوری که در برخی تحقیقات کاهش تنوع ژنتیکی، در برخی افزایش و در برخی دیگر تغییری مشاهده نشده است (Hilborn *et al.*, 2003). در بسیاری از جمعیت‌های ماهیان مختلف در طبیعت می‌توان انتظار انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ را داشت (Lucentini *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای در راستای ارزیابی تنوع ژنتیکی سگ ماهی *Paraschistura bampurensis*، انحراف از تعادل معنی داری در نمونه‌های متعلق به رودخانه‌های بریم و شاپور مشاهده شد که محققین علت عمده آن را ناشی از کسری هتروزایگوسیتی عنوان نمودند (Askari and Shabani, 2013). در تحقیق حاضر نیز ۱۰ مورد از ۱۸ تست مورد بررسی (جمعیت×جایگاه ژنی)، انحراف معنی داری از تعادل هاردی-وینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی نشان دادند. در بررسی علل و عوامل انحراف از تعادل، دلایل گوناگونی مطرح می‌باشد. در این میان، کسری هتروزایگوسیتی می‌تواند به عنوان عاملی مهم در انحراف از تعادل مشاهده شده نقش داشته باشد. نتایج حاصل از نرم افزار FSTAT نیز حاکی از وجود کسری هتروزایگوسیتی در برخی از جایگاه‌های مورد بررسی بود. دلایل زیستی این کسری به خوبی شناخته نشده و عوامل زیادی می‌تواند در به وجود آوردن آن نقش داشته باشد. در این خصوص، ال‌های نول به عنوان یکی از عوامل عمده در نظر گرفته می‌شوند. نتایج حاصل از نرم افزار Microchecker، امکان وجود ال‌های نول در جایگاه‌هایی که کسری هتروزایگوسیتی معنی دار نشان داده بودند را تأیید نمود. در واقع، وجود ال‌های نول پدیده‌ای عادی بوده و در توارث ریزماهورها در ماهیان مورد تأیید قرار گرفته است (Rodzen and May, 2002). در این بررسی در برخی جایگاه‌ها افزایش هتروزایگوسیتی نیز مشاهده گردید که البته افزایش مشاهده شده در هیچ‌یک از جایگاه‌ها معنی دار نبود. در افزایش هتروزایگوسیتی نیز عوامل متعددی همچون خطای PCR، اشتباه در هنگام خواندن ال و یا انحراف تصادفی می‌تواند نقش داشته باشد. نتایج حاصل از نرم افزار Microchecker احتمال خطا هنگام خواندن را رد نمود. همچنین با توجه به بهینه بودن شرایط تکثیر جایگاه‌های مورد نظر، امکان بروز خطای PCR نیز ضعیف به نظر می‌رسد. در ارزیابی شاخص درون آمیزی نیز متوسط میزان Fis، ۰/۰۷۰ به دست آمد که با توجه به مثبت بودن عدد مذکور، می‌توان احتمال وجود آمیزش خویشاوندی و اختلاط جمعیت‌ها را در نظر گرفت. آمیزش خویشاوندی به عنوان خطری مهم می‌تواند با کاهش هتروزایگوسیتی منجر به کاهش شایستگی بقای ماهیان در طبیعت و همچنین به مخاطره انداختن جمعیت‌های بومی گردد (Ferguson, 1995). در بررسی حاضر در ارزیابی شاخص Nm، جریان ژنی نسبتاً بالایی (Nm: ۸/۴۰) در سطح جایگاه‌های مورد استفاده مشاهده شد. در صورت عدم وجود جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها، تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای ایجاد می‌گردد (Chakraborty and Leimar, 1987). در این راستا پایین‌ترین میزان تمایز ژنتیکی (۰/۰۱۷) بین نمونه‌های مناطق قشلاق و سفید برگ مشاهده شد که با توجه به جریان ژنی بالای مشاهده شده (۱۴/۱۵) بین مناطق مذکور به سادگی قابل توجیه می‌باشد چرا که هرچه تبادلات بین افراد بیشتر باشد، تمایز ژنتیکی بین آن‌ها نیز کمتر خواهد بود (Beacham and Macconachi, 2004). به طور کلی، متوسط شاخص Fst بر اساس فراوانی ۰/۳۳/۰ به دست آمد که علی‌رغم پایین بودن می‌تواند بیان‌گر تمایز ژنتیکی مهمی باشد (Hartl and Clark, 1997). در تحقیقی دیگر روی سگ ماهی *Barbatula barbatula* در سیستم‌های رودخانه‌ای مختلف شمال بلژیک مقادیر Nm و Fst به ترتیب بالاتر از ۷ و ۰/۷/۰ گزارش گردید. در بررسی مذکور، محققین بیان نمودند که این میزان پایین تمایز می‌تواند شاخص مهمی از تمایز ژنتیکی، کمی بالاتر از میزان Fst بود. بررسی‌های پیشین نشان داده که میزان Rst برای ریزماهورها تحت مدل جهش پله‌ای بالاتر از میزان Fst می‌باشد (Slatkin, 1995). اگرچه تحت شرایط نرخ بالای مهاجرت و کوتاه بودن زمان جدایی جمعیت‌ها که منجر به مستقل شدن تمایز از مدل جهش می‌شود، این دو شاخص می‌توانند مشابه یکدیگر باشند (Rousset, 1996). نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که بخش بالایی از تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها بخش کوچکی از تنوع مشاهده شده (۳ درصد) در بین جمعیت‌ها وجود داشته است. در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز، بالاترین و پایین‌ترین میزان فاصله به ترتیب بین نمونه‌های مناطق گاماسیاب با سفید برگ (۷۱) و قشلاق با سفید برگ (۳۶) مشاهده شد که با توجه به طبقه‌بندی صورت گرفته توسط Thorpe and Solcava (۱۹۹۴) بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی Nei (۱۹۷۲)، در محدوده گونه‌های هم جنس (۰/۳-۰/۶۱) تا هم خانواده (۰/۵۸-۰/۲۱) قرار دارد. بر اساس مقادیر

فاصله ژنتیکی و دندروگرام UPGMA به دست آمده می‌توان عنوان داشت که احتمالاً بیش از یک جمعیت از گونه *O. angorae* در مناطق مورد بررسی وجود دارد. در این راستا، عمویی و همکاران (۱۳۹۳) در ارزیابی تنوع ژنتیکی سگ ماهی *Paraschistura nielsenii* عنوان داشتند که دو جمعیت جدا بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی به دست آمده در استان‌های فارس و بوشهر وجود دارد (عمویی و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین در بررسی صورت گرفته روی گونه *Paraschistura bampurensis* مقادیر شباهت و فاصله ژنتیکی به ترتیب ۴۰٪ و ۶۶٪ گزارش و دو گروه متعلق به رودخانه‌های بریم و شاپور با ترسیم دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی از هم جدا شدند (Askari and Shabani, 2013). به طور کلی عواملی از قبیل بروز خشکسالی، احداث سد و کاهش سرعت جریان آب، شکل‌گیری لایه‌های میکروبی در بستر، برداشت شن و ماسه بستر و همچنین ورود آلاینده‌های مختلف ناشی از فعالیت‌های صنعتی، شهری و گردشگری بومی و غیربومی که رودخانه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر با آن مواجه می‌باشند، می‌تواند در دراز مدت روی بقا و سطح تنوع ژنتیکی مشاهده شده سگ ماهی آنگورا تاثیر گذار باشد که مستلزم تحقیقات بیشتر است. در واقع، کمبود اطلاعات کافی در مورد زیست‌شناسی و اکولوژی سگ ماهی آنگورا از یک سو و دستکاری رو به افزایش رودخانه‌ها از سوی دیگر، لزوم شناخت هرچه بیشتر نیازهای این گونه بومی و همچنین بررسی وضعیت تنوع ژنتیکی در فواصل زمانی مناسب را دوجندان می‌سازد.

منابع

طباطبایی، س. ن.، ایگدری، س.، کابلی، م.، جوانشیر، آ.، هاشم زاده سقرلو، ا.، زمانی، م. ۱۳۹۲. بررسی فاکتورهای محیطی موثر در پراکنش سگ ماهی جویباری (*Oxynoemacheilus bergianus*) در رودخانه کردان. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران. سال دوم، شماره ۶۶، صفحات ۱۷۱-۱۵۹.

عسگری، ق.، کلنگی میاندره، ح.، شعبانی، ع. ۱۳۹۳ا. ساختار ژنتیکی جمعیت سگ ماهی جویباری (*Turcinoemacheilus kossiwigi*) (Banarescu and Nalbant, 1964) در رودخانه بریم (کهگیلویه و بویراحمد) و خیرآباد (خوزستان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله منابع طبیعی ایران. سال دوم، شماره ۶۷، صفحات ۲۸۵-۲۷۵.

عسگری، ق.، شعبانی، ع.، قدسی، ز.، نوفرستی، ه. ۱۳۹۳ب. مقایسه ژنتیکی سگ ماهی جویباری (*Oxynoemacheilus kiabii*) (Golzaripour, Abdoli and Frehof, 2011) رودخانه گاماسیاب در دو استان کرمانشاه و همدان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. ژنتیک نوین. سال سوم، شماره ۹، صفحات ۳۹۰-۳۸۷.

عمویی، ا.، شعبانی، ع. و کلنگی، ح. ۱۳۹۳. بررسی تنوع ژنتیکی سگ ماهی جویباری *Paraschistura nielsenii* در رودخانه‌های شاپور (استان فارس)، دالکی و مند (استان بوشهر) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله بوم‌شناسی آریزان. سال دوم، شماره ۴، صفحات ۷۹-۷۱.

- Abdoli, A., Golzaripour, K., Kiabi, K. H., Patimar, R. 2010. Status of the endemic loaches of Iran, International Loach Conference 2010, 31 August to 3 September. Prague, Czech Republic (abstract).
- Askari, G.H., Shabani, A. 2013. Genetic diversity evaluation of *Paraschistura bampurensis* (Nikolskii, 1900) in Shapour and Berim Rivers (Iran) using microsatellite markers. *Journal of Cell Biology and Genetics*. 3(2): 29-34.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography-the history and formation of species*. Harward university press. USA. 447 P.
- Bang, I., Kim, W.J., Rolee, I. 2009. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Miho spine loach (*Iksookimia choii*) and cross- species amplification within the Cobitidae family. *Molecular Ecology Research*. 9: 281-284.
- Bartfai, R., Egedi, S., Yue, G.H., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L., Orban, L. 2003. Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*. 219: 157-167.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, G.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Review of Biochemistry*. 84: 680-683.
- Beacham, T.D., Macconachi, C. 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. *Journal of Fish Biology*. 61: 1021-1032.

- Chakraborty, R., 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.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255: 1-29.
- Coad, B.W. 2013. Freshwater fishes of Iran. Available at <http://www.braincoad.com>.
- Coad B.W. 2014. Freshwater Fishes of Iran. Available at <http://www.briancoad.com>.
- Dewoody, J.A., Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other. *Animal Journal of Fish Biology*. 56: 461-473.
- Diz, P.A., Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*. 287: 278-285.
- Ferguson, M. 1995. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. Carvalhoand, G.R., Pitcher, T.J. (eds.). *Molecular Genetics in Fisheries*. London: Chapman and Hall. pp. 81-104.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Ambridge. UK: Cambridge University Press. 617 p.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hilborn, R., Quinn, T.P., Schindler, D.E., Rogers., D.E. 2003. Biocomplexity and fisheries sustainability. National Academy Sciences. 100: 5668-6564.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. 1996. Molecular systematic. 2nd edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland. 125 p.
- IUCN, 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved from <http://www.redlist.org>.
- Knapen, D., Knaepkens, G., Bervoets, L., Verheyen, E., Ens, M. 2009. High microsatellite genetic variability of the stone loach, *Barbatula barbatula*, in anthropogenically disturbed watercourses. *Fisheries Management and Ecology*. 16: 112-120.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 238(1-4): 1-37.
- Lucentini, L., Palomba, A., Gigliarelli, L., Sgaravizzi, G., Lancioni, H., Lanfaloni, L., Natali, M., Panara, F. 2009. Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox lucius*) population. *Fisheries Research*. 96: 139-147.
- Nasren, S.H., Islam, M.N., Quader Khan, M.G., Islam, M.D.S., Alam, M.D.S. 2009. Genetic variation and differentiation in the Stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch), population assessed by heterologous microsatellite DNA markers. *Indian Journal of Biotechnology*. 8: 85-90.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283- 92.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 535-538.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (VERSION 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
- Reed, D.H., Frankham, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*. 17(1): 230-237.
- Rodzen, J.A., May, B. 2002. Inheritance of microsatellite loci in the polyploidy white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genome*. 54: 1064-1076.
- Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation patterns. *Genetics*. 142: 1357-1362.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde: *Molecular Cloning*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press. pp. 743-745.

- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Taylor, M., Blust, R., Verheyen, E. 2001. Characterization of microsatellite loci in stone loach, *Barbatula barbatula* L. *Molecular Ecology Notes*. 1: 96-97.
- Thorpe, J.P., Solcava, A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematic. *Zoologica Scripta*. 23: 3-18.
- Verspoor, E., Jordan, W.C. 1989. Genetic variation at the Me-2locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. *Fish Biology*. 35: 205-213.
- Wang, M.L., Barkley, N.A., Jenkins, T.M. 2009. Microsatellite Markers in Plants and Insects, Part I: Applications of Biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics*. 3(1): 54-67.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Windows Freeware for population Genetic Analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.
- Zhou, J.F., Wu, Q. J., Ye, Y.Z., Tong, J.G. 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*. 40(10): 1144-1148.