



مطالعه تنوع ژنتیکی سگ ماهی جویباری

Paraschistura nielseni (Nalbant and Bianco, 1998) رودخانه‌های شاپور

(استان فارس)، دالکی و مند (استان بوشهر) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

الهه عمویی خوزانی^{۱*}، علی شعبانی^۲، حامد کلنگی میاندره^۲^۱ گروه تولید و بهره‌برداری، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان^۲ گروه تکثیر و پرورش آبزبان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	هدف تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی سگ ماهی جویباری <i>Paraschistura nielseni</i> رودخانه های شاپور (فارس)، دالکی و مند (بوشهر) با استفاده از نشانگر ریزماهوره (IC230، IC228، IC654، Bbar4 و Bbar7) بود. تعداد ۹۰ قطعه ماهی (۳۰ عدد از هر رودخانه) نمونه‌برداری شد. از پنج جایگاه ژنی در مجموع تعداد ۱۲۴ آلل برای هر سه رودخانه به دست آمد. متوسط آلل مشاهده شده (N_a) در رودخانه‌های شاپور، دالکی و مند به ترتیب ۸/۴، ۸/۴ و ۸ به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد که میزان متوسط H_o ۰/۴۲۶ بود که مقدار متوسط آن در رودخانه های شاپور، دالکی و مند به ترتیب ۰/۴۶۱، ۰/۴۵۲ و ۰/۳۶۵ به دست آمد. متوسط هتروزیگوسیتی H_e و H_o برای تمامی مناطق به ترتیب ۰/۴۲۶ و ۰/۸۱۷ محاسبه گردید. بیشترین و کمترین میزان H_o به ترتیب برای جایگاه های IC654 (۰/۷۳۹) دالکی و IC228 (۰/۱۷۴) مند مشاهده شد. بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در رودخانه های شاپور در سه جایگاه IC230، IC654 و Bbar7، دالکی جایگاه IC230 و مند جایگاه IC654 تعادل برقرار بوده و در سایر جایگاه ها انحراف معنی داری مشاهده شد. شاخص F_{st} تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا (۰/۹۸) و میزان تمایز بین جمعیتی پایینی (۰/۲) را نشان داد. دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی ترسیم شده و جمعیت های رودخانه های شاپور و دالکی از هم جدا نشده اما احتمالا جمعیت رودخانه مند از جمعیت های دو رودخانه دیگر جدا شده است.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۳/۰۲/۱۰ اصلاح: ۹۳/۰۵/۰۲ پذیرش: ۹۳/۰۶/۱۷	
کلمات کلیدی:	
تنوع ژنتیکی	
ریزماهوره	
چند شکلی	
سگ ماهی جویباری	

مقدمه

آگاهی از تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از اساسی‌ترین شاخص‌های لازم برای حفظ و بقای یک گونه جهت سازگاری با محیط‌هایی است که تحت تأثیر فشارهای زیست‌محیطی مختلف قرار دارند، زیرا تصور بر این است که تنوع ژنتیکی بالا باعث بهبود توانایی افراد و افزایش شانس بقای افراد جمعیت‌ها می‌شود (Zhang *et al.*, 2009; Hall and Bardley, 1995). عوامل متعددی همچون انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی، مهاجرت، پراکنش، جفت‌گیری (McRae *et al.*, 2005)، تخریب و تکه‌تکه شدن زیستگاه (Reiley *et al.*, 2006; Keller and Largiader, 2002)، اثرات bottleneck و کاهش جمعیت‌ها اهمیت بسزایی در ایجاد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی دارد. تنوع ژنتیکی بیان‌کننده تفاوت در تعداد و نوع آلل‌های موجود در لوکوس‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: e.amooee67@gmail.com

کروموزومی است و نیازمند توجه ویژه بوده و طی چند سال اخیر علاقه‌مندان زیادی را به دلیل نقش کلیدی در ساختار ذخایر طبیعی به خود جلب کرده است. لذا بررسی ژنتیک جمعیت ذخایر می‌تواند کمک شایانی به برنامه‌های ارزیابی ذخایر و مدیریت حفاظتی گونه‌ها نماید (Waldman *et al.*, 1999). جهت ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت تا به امروز از نشانگرهای مختلفی همچون AFLP، RFLP و... استفاده شده است که از میان این نشانگرها امروزه ریزماهورها (SSRs) یکی از پرکاربردترین نشانگرها می‌باشند (Crooijmans *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2007). نشانگرهای ریزماهورها می‌توانند چندان شگلی قابل قبولی را در بین افراد نشان می‌دهد. این نشانگر کاربرد وسیعی در ارزیابی تنوع ژنتیکی، مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها و محاسبه جریان ژنی بین گونه‌ها دارند (Balloux and Lugon-Moulin, 2002; Kohn *et al.*, 1999). در میان ماهیان آب‌های داخلی ایران، خانواده سگ ماهی جویباری با ۲۳ گونه و ۱۱٪ فراوانی رتبه دوم فون ماهیان ایران را به خود اختصاص داده‌اند (Coad, 2012). از لحاظ زیستگاهی، سگ ماهیان، قسمت‌های فوقانی و میانی رودخانه‌ها با بستر سنگلاخی و قله‌های سنگی (آب‌های سرد و غنی از اکسیژن) را برای زیستن ترجیح داده و در هنگام روز در زیر سنگ‌ها مخفی شده و گونه‌هایی شب فعال می‌باشند (Cihar, 1976; Abdoli, 1999). گونه *Paraschistura nielseni* از جنس *Paraschistura* و خانواده Nemacheilidae می‌باشد. این گونه بومی ایران بوده و پراکندگی آن مربوط به حوضه آبریز خلیج فارس می‌باشد. اطلاعات محدودی در خصوص تنوع ژنتیکی این گونه در ایران وجود دارد. بنابراین در این مطالعه تلاش شده است تا تنوع ژنتیکی سه جمعیت این گونه در دو استان فارس و بوشهر مورد بررسی قرار گیرد. تاکنون در خصوص معرفی نشانگرهای اختصاصی برای مطالعات ژنتیکی این گونه گزارشی منتشر نشده است. در نهایت، باتوجه به متنوع بودن عوامل اکولوژیکی مانند عمق، جنس بستر و شدت جریان در رودخانه‌های مورد مطالعه و از سوی دیگر پراکنش بالای گونه مورد مطالعه در حوضه خلیج فارس، تنوع ژنتیکی ماهی *Paraschistura nielseni* با استفاده از نشانگر ریز ماهوره مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA

در مهر ماه سال ۱۳۹۲ تعداد ۹۰ قطعه ماهی (۳۰ قطعه برای هر منطقه) در سه رودخانه شاپور دالکی و مند نمونه برداری گردید. از هر ماهی باله دمی را گرفته و تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از روش فنول-کلروفرم صورت پذیرفت (Hillis *et al.*, 1990). به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر (Eppendorf AG, Bio photometer 8.5mm, Germany) استفاده شد. DNA استخراجی تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیز مولکولی

جهت بررسی تنوع ژنتیکی سگ ماهی جویباری *Paraschistura nielseni* پنج جفت نشانگر ریزماهوره (IC228، IC230، IC654، Bbar4 و Bbar7) که دارای تعداد آلل بالا و دامنه وزنی مناسبی بودند و حالت پلی‌مورفیسم از خود نشان داده بودند، (Bang *et al.*, 2009, Taylor *et al.*, 2001) انتخاب گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD, MJ Mini Thermal Cycler, USA) درون میکروتیوپ‌های مخصوص PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA استخراجی، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر مستقیم (F) و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر معکوس (R)، چهارصدم میکرولیتر از نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تگ DNA پلی‌مرز (Fermentas, Thermo fisher, Lithuania)، بافر ۱۰ X PCR (Fermentas, Thermo fisher, Lithuania)، ۵/۱ میلی‌مولار کلریدمنیزیم و اضافه نمودن آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم

۲۵ میکرولیتر انجام شد. مراحل انجام واکنش زنجیره پلی مرز به این صورت بود: در واسرشتگی اول، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه تا پنج دقیقه اعمال و DNA دو رشته از هم جدا گردید (Denaturation)، در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، دمای الحاق دو رشته DNA باز شده به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و در بسط نهایی سه تا پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. سپس محصول PCR بر روی ژل اکریل امید شش درصد در دستگاه الکتروفورز لود شد. از نشانگر (Ladder DNA 100 bp Fermentas, Thermo fisher, Lithuania) به عنوان معیار جهت تعیین اندازه آلل‌ها استفاده گردید. بعد از اتمام کار دستگاه الکتروفورز، ژل‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نیترا نقره طی مراحل رنگ‌آمیزی شدند (Bassam *et al.*, 1991). پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل تصویر مناسبی از ژل جهت انجام مراحل بعدی و آنالیزها تهیه شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل پرو آنالایزر (Gel pro analyser 3.0. Gene, USA) وزن باندهای مشاهده شده در باند اصلی مشخص گردید.

جدول ۱. جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در این مطالعه و خصوصیات آن‌ها (Bang *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2001)

دمای مناسب اتصال	پرایمر	تعداد ال	طول (جفت باز)	جایگاه ژنی
۴۸	F: AATACGAACTACTTGGTAATGGC R: GTGAAAAGGTCCAGTAAAAGC	۷	۱۷۲ - ۲۴۴	IC228
۴۸	F:GGGTATAGGTGAAAAGGTCC R:ATACGAACTACTTGGTAATGGC	۹	۱۷۶-۲۶۰	IC230
۴۹	F:TGAGCCGACACTAGAAACAGAGC R:GACAAAAGTGCAGGCACAGAATG	۱۱	۱۵۶-۲۰۸	IC654
۵۵	F: ATAATCACAGCCCCGCAGAG R: GGGTGGTGGGAATATATTGGAAA	۶	۸۰ - ۱۲۰	Bbar4
۵۰	F: GAGCAACAGCTGCTGTAGGA R: GTCGGACCAACCTGAAAAC	۸	۳۲۰ - ۳۹۶	Bbar7

آنالیز آماری

جهت ارزیابی تعداد آلل در هر یک از لوکوس‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت در رودخانه‌های مورد مطالعه و همچنین به منظور تست آزمون انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ از نرم افزار GenAlex 6.41 (Peakall and Smouse, 2006) استفاده شد. وجود و یا عدم وجود آلل پوچ^۱، خطاهای دسته‌بندی و یا از دست دادن آلل بزرگ، از نرم افزار Microchecker 2.2.1 (Oosterhout *et al.*, 2004) استفاده گشت. به منظور تعیین تفاوت در مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) و همچنین مشخص نمودن تنوع آللی از آزمون ویلکاکسون غیر پارامتریک (Zar, 1999) در نرم‌افزار SPSS ver 19 استفاده شد. آنالیز غنای آللی، میزان ضریب درون آمیزی (Fis) و سطح معنی‌داری آن با استفاده از نرم افزار FSTAT (ver 2.9.3) مشخص گردید (Goudet, 2001). میزان تنوع درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین مناطق بر اساس معیار مدل آللی بی‌نهایت (Fst) توسط آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در نرم افزار GenAlex محاسبه شد (Peakall and Smouse, 2006). همچنین میزان آلل واقعی (Na)، آلل مؤثر (Ne)، جریان ژنی (Nm)، مقادیر فاصله ژنتیکی (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei, 1978) نیز در همین نرم‌افزار به دست آمد. در نهایت مقادیر

¹. Null alleles

مربوط به غنای آلی و هتروزیگوسیتی بر اساس مقادیر ارایه شده برای ماهیان آب شیرین مورد مقایسه قرار گرفتند (Dewody and Avise, 2000).

نتایج

در این تحقیق از پنج جایگاه ژنی ریزماهواره استفاده شد که تمامی این جایگاه‌ها حالت پلی‌مورفیسم نشان دادند (جدول ۱). تعداد آل‌های مربوط به هر یک از جایگاه‌های ژنی پلی‌مورف در جدول ۲ ارایه شده است. از پنج جایگاه ژنی ریزماهواره استفاده و در مجموع تعداد ۱۲۴ آل برای هر سه رودخانه به دست آمد. متوسط تعداد آل مشاهده شده در سطح هریک از جایگاه‌های ژنی ۸ آل در هر لوکوس محاسبه شد و گستره آن در جایگاه‌های ژنی از ۱۲-۵ آل بود.

جدول ۲. تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در مناطق مورد بررسی

IC654	IC230	IC228	Bbar7	Bbar4		
۹	۱۱	۷	۱۰	۵	N_a	رودخانه شاپور
۷/۱۴۹	۹/۱۲۱	۴/۴۲۷	۷/۳۹۹	۳/۳۵۹	N_e	
۰/۵۶۵	۰/۶۰۹	۰/۳۴۸	۰/۵۲۲	۰/۲۶۱	H_o	
۰/۸۶۰	۰/۸۹۰	۰/۷۷۴	۰/۸۶۵	۰/۷۰۲	H_e	
۰/۳۴۳	۰/۳۱۶	۰/۵۵۱	۰/۳۹۷	۰/۶۲۹	F_{IS}	
ns	ns	***	ns	***	pHw	
۱۲	۸	۷	۷	۸	N_a	رودخانه دالکی
۷/۵۰۴	۶/۴۵۱	۴/۸۳۱	۵/۰۱۴	۵/۵۱۰	N_e	
۰/۷۳۹	۰/۵۶۵	۰/۳۴۸	۰/۲۶۱	۰/۳۴۸	H_o	
۰/۸۶۷	۰/۸۴۵	۰/۷۹۳	۰/۸۰۱	۰/۸۱۹	H_e	
۰/۱۴۷	۰/۳۳۱	۰/۵۶۱	۰/۶۷۴	۰/۵۷۵	F_{IS}	
***	ns	***	***	***	pHw	
۱۱	۹	۷	۸	۵	N_a	رودخانه مند
۵/۹۷۷	۵/۵۳۹	۴/۶۸۱	۵/۸۷۸	۴/۳۱۸	N_e	
۰/۵۶۵	۰/۴۳۵	۰/۱۷۴	۰/۳۹۱	۰/۲۶۱	H_o	
۰/۸۳۳	۰/۸۱۹	۰/۷۸۶	۰/۸۳۰	۰/۷۶۸	H_e	
۰/۳۲۱	۰/۴۶۹	۰/۷۷۹	۰/۵۲۸	۰/۶۶۱	F_{IS}	

N_a : تعداد آل، N_e : تعداد آل موثر، H_o : هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_e : هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F_{IS} : ضریب درون آمیزی، pHw: تست احتمال هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی داری، $*P \leq 0.05$ ، $**P \leq 0.01$ ، $***P \leq 0.001$).

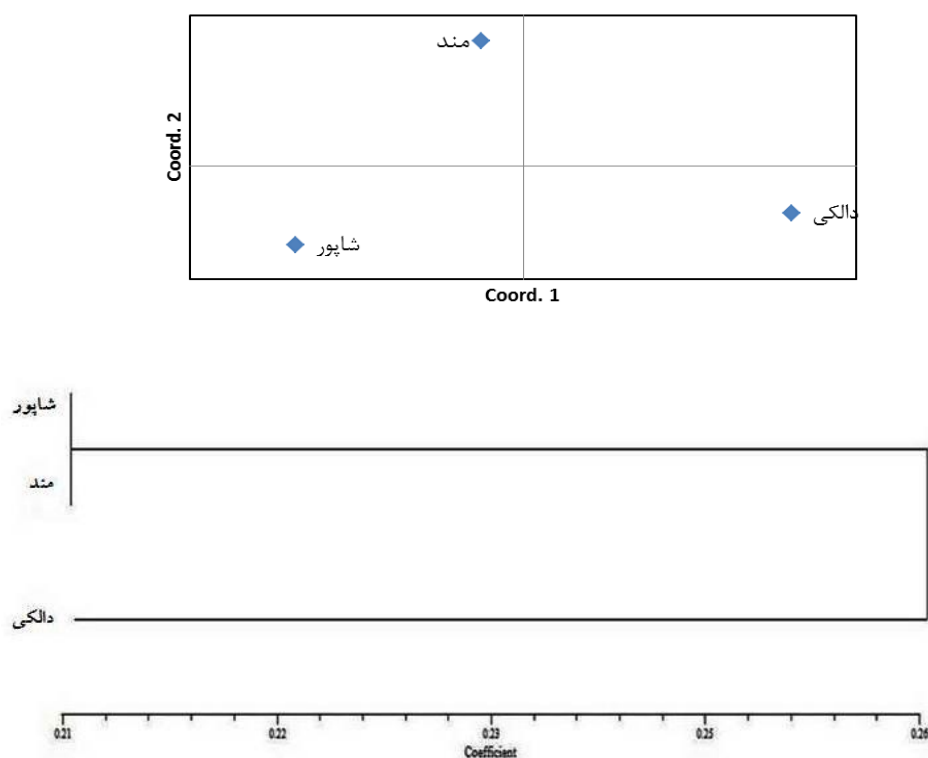
متوسط تعداد آل واقعی و مؤثر در رودخانه‌های شاپور، دالکی و مند به ترتیب ۸/۴، ۶/۳ و ۸/۴، ۵/۸۷ و ۵/۲۷ بود و از این حیث به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر در سطح ۵ درصد نشان ندادند ($p > 0.05$). کمترین تعداد آل در جایگاه Bbar4، ۵ آل در دو رودخانه شاپور و مند و بیشترین تعداد آل در جایگاه IC654 ۱۲ آل در رودخانه شاپور مشاهده گردید. متوسط آل مشاهده شده (Na) در رودخانه‌های شاپور، دالکی و مند به ترتیب ۸/۴، ۸/۴ و ۸ به دست آمد. میزان آل مشاهده شده (Na)، آل مورد انتظار (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO)، مورد انتظار (He) و شاخص درون آمیزی در جدول ۲ نشان داده شده است. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۴۲۶ و ۰/۸۱۷ به دست آمد. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در رودخانه‌های شاپور، دالکی و مند به ترتیب ۰/۴۶۱، ۰/۴۵۲ و ۰/۳۶۵ به دست آمد. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب برای جایگاه‌های IC654 (۰/۷۳۹) رودخانه دالکی و IC228 (۰/۱۷۴) رودخانه مند مشاهده شد. در بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، در جمعیت رودخانه شاپور در سه جایگاه IC230، IC654 و Bbar7، در جمعیت رودخانه دالکی جایگاه IC230 و در جمعیت رودخانه مند جایگاه IC654

تعادل برقرار بوده و در سایر جایگاه ها انحراف معنی داری برقرار بود (جدول ۲). متوسط شاخص درون آمیزی $0/486$ بود. متوسط جریان ژنی (N_m) در بین مناطق $8/58$ ، کمترین و بیشترین میزان آن به ترتیب برای جایگاه های Bbar4 ($5/117$) و Bbar7 ($12/857$) محاسبه گردید (جدول ۳). بر اساس شاخص PCA سه جمعیت در سه ناحیه متفاوت از نمودار همبستگی قرار گرفتند (شکل ۱). نتایج آنالیز واریانس مولکولی و شاخص F_{st} در سطح ۹۹ درصد نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸ درصد) در درون جمعیت ها و تنوع پایینی (۲ درصد) در بین جمعیت ها وجود دارد. بر اساس دندروگرام UPGMA سه جمعیت مورد بررسی در دو شاخص اصلی قرار گرفتند. جمعیت های رودخانه های شاپور و مند در یک شاخص و جمعیت رودخانه دالکی در شاخه ای مجزا قرار گرفت (شکل ۲).

جدول ۳. میزان جریان ژنی (N_m) و تمایز (F_{st}) در سطح سه جایگاه ژنی مورد استفاده

میانگین	IC654	IC230	IC228	Bbar7	Bbar4	جایگاه ژنی
$8/580$	$9/626$	$9/429$	$5/873$	$12/857$	$5/117$	N_m
$0/032$	$0/025$	$0/026$	$0/041$	$0/019$	$0/047$	F_{st}

میزان همبستگی



شکل ۲. مقایسه فاصله ژنتیکی سه جمعیت *Paraschistura nielsenii* بر اساس ترسیم دندروگرام UPGMA

بحث

مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت آبزیان از مهم ترین و اساسی ترین اصول لازم جهت حفاظت و مدیریت منابع آبی جهت بقا و تکامل موجودات می باشد (Diz and Presa, 2009). همچنین مطالعه افراد یک جمعیت در اکوسیستم های آبی از نظر تکاملی، بوم شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی، بهره برداری از ذخایر و پرورش آنها حائز اهمیت است (Mostafavi, 2006). اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبی پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه ها،

مورد مطالعه قرار گرفته و اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد. این امر از نظر مدیریت شیلاتی و برنامه ریزی‌های حفاظتی گونه‌ها حائز اهمیت است (Coad, 1980). تنوع ژنتیکی برای فرآیندهای تکاملی محیط زیست و اکولوژیکی در محدوده عملکرد اکوسیستم‌ها بسیار مهم و حیاتی می‌باشد (Rezvani Gilkolaei et al., 2012). امروزه بی‌نظمی و عدم قانونمندی در میزان صید و وجود عوامل استرس‌زای فراوان و همچنین دیگر عوامل محیطی همچون آلودگی‌های محیطی سبب کاهش اندازه جمعیت مؤثر شده و در نهایت قابلیت جمعیت را برای حفظ تنوع کاهش می‌دهد و بقای آن‌ها را به خطر می‌اندازد. پارامترهای متعددی همچون میزان هتروزیگوسیتی و تعداد آلل (واقعی و مؤثر) در مطالعات ژنتیک جمعیت مورد بررسی قرار می‌گیرد و در این گونه‌ها از مطالعات نمی‌توان به تنهایی براساس یک پارامتر قضاوت صحیحی در ارتباط با افزایش یا کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت ماهیان داشت. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که میزان تنوع اللی نسبت به هتروزیگوسیتی از اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشد هر گونه تغییر در میزان آن می‌تواند نشان دهنده تغییرات در سبب جمعیت مؤثر گونه مورد مطالعه باشد (Diz and Presa, 2009). نشانگرهای متعددی در ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده می‌گردد؛ یکی از پرکاربردترین نشانگرها ریزماهورها هستند که به صورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شود (Liu et al., 2009). گونه *Paraschistura nielsenii* فاقد جایگاه ژنی اختصاصی بوده و جایگاه ژنی مورد استفاده در این بررسی از مطالعات صورت گرفته توسط Taylor و همکاران (۲۰۰۱) بر روی گونه *Barbatula barbatula* و توسط Bang و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گونه *Iksookimia choii* انتخاب شدند. با وجود غیراختصاصی بودن هر ۵ جایگاه ژنی دارای چند شکلی بودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان متوسط تعداد الل و هتروزیگوسیتی مشاهده شده ($H_o = 0.426$, $N_a = 8$) با میانگین گزارش شده برای ماهیان آب شیرین ($H_o = 0.46$, $N_a = 7.5$) همخوانی دارد (Dewoody and Avise, 2000). نتایج به دست آمده با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالایی در درون جمعیت‌های مورد بررسی و تنوع پایینی در بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. با این حال هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین نشان دهنده وضعیت نه چندان مناسب ساختار ژنتیکی جمعیت *Paraschistura nielsenii* در رودخانه‌های مورد بررسی می‌باشد (اثر Wahlund). اثر Wahlund به این نکته اشاره داشته که زمانی که در یک جمعیت دو یا تعداد بیشتری زیر جمعیت با فراوانی اللی متفاوت وجود دارند در نهایت باعث کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده کلی در جمعیت می‌گردند. هر چند ممکن است زیر جمعیت‌ها در تعادل هاردی واینبرگ نیز قرار گیرند. از دلایل ایجاد این زیر جمعیت‌ها می‌توان به موانع جغرافیایی و رانش ژنتیکی اشاره نمود. برخی از جایگاه‌های ژنی در هر سه جمعیت انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند. با توجه به اینکه تعادل هاردی- واینبرگ بر اساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت است، در صورت بزرگ بودن بیش از حد 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. بنابراین انتظار انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت‌های وحشی وجود دارد (Dixon et al., 2008). جمعیت‌های طبیعی زیادی از ماهیان انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان داده‌اند (Castric et al., 2002؛ Yue et al., 2004؛ Lucentini et al., 2006؛ Bang et al., 2009؛ Askari and Shabani, 2013). بر اساس آنالیزهای صورت گرفته الل‌های نول در هر سه منطقه نشان داده شدند. هتروزیگوسیتی ممکن است در جمعیت‌های طبیعی از طریق همخونی، نمونه برداری غیر تصادفی، ساختار درون جمعیتی (Castric et al., 2002)، رانش ژنتیکی، الل نول (Angel et al., 2006)، فشار صید بی‌رویه (Bergh and Getz, 1989) و یا ترکیبی از عوامل فوق‌ترخ دهد. در این رودخانه‌ها شاید ترکیبی از عوامل فوق‌دلیل اکثر هتروزیگوسیتی و انحراف از تعادل هاردی واینبرگ باشد.

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) معیاری مناسب برای بررسی ساختار جمعیت، تعیین میزان تمایز و شباهت ژنتیکی بین جمعیت ها می باشد (Grassi *et al.*, 2004). شاخص F_{st} بیانگر میزان تمایز ژنتیکی جمعیت ها در سطوح مختلف می باشد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر اساس شاخص F_{st} تنوع ژنتیکی پایینی، معادل ۲ درصد را بین جمعیت ها نشان داد. همچنین شاخص جدایی F_{st} میزان ۰/۳۲ را نشان داد. هرگاه میزان F_{st} از ۰/۰۵ کمتر باشد نشان دهنده تمایز ژنتیکی اندک می باشد (Balloux *et al.*, 2002). بر اساس گزارش Li و همکاران (۲۰۰۷) هرگاه $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی عامل اصلی در تمایز ژنتیکی بوده و هر گاه $Nm < 1$ باشد، رانش ژنی عامل اصلی تمایز ژنتیکی می باشد که میزان جریان ژنی بالایی در جمعیت ها (۸/۵۸۰) مشاهده شد که این جریان ژنی بالا می تواند عامل مهمی در تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت ها در این تحقیق باشد. همچنین میزان شباهت ژنتیکی به دست آمده در این مطالعه ۰/۹۰ بود. طبق معیار استاندارد تعریف شده توسط (Thorpe ۱۹۸۲)، بر اساس شباهت و فاصله ژنتیکی، میزان شباهت ژنتیکی بین ۰/۹۰ - ۰/۸۰ در ارتباط با جمعیت هایی است که به یک گونه تعلق دارند که با نتایج حاصل از این تحقیق تطابق دارد.

مطالعه حاضر به عنوان اولین تحقیق پایه برای جنس *Paraschistura* در رابطه با ساختار ژنتیکی آن ها می باشد. متأسفانه با توجه به نبود اطلاعات قبلی از ساختار ژنتیکی گونه *P. nielsenii* در این مناطق نمی توان درباره افت داشتن یا نداشتن تنوع ژنتیکی این گونه در چند سال اخیر قضاوتی داشت اما با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان بیان نمود که ماهی *P. nielsenii* در حال حاضر در مناطق مورد بررسی دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی نبوده و با توجه به اهمیت اکولوژیکی این گونه در پالایش رودخانه ها حفظ تنوع ژنتیکی آن در مناطق مورد بررسی لازم و ضروری به نظر می رسد. پیشنهاد می شود به منظور دستیابی به اطلاعات دقیق تر در ارتباط با این گونه با ارزش بومی ایران در آینده مطالعاتی بر روی ژنوم میتوکندریایی این گونه صورت گیرد.

منابع

- Abdoli, A. 1998. Freshwater fishes of Iran. Museum of Nature and Wildlife Iran. 378 p.
- Angel, P., Mercedes, G., Philippe, L., Concepcion, M., Jose, A. 2006. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biological Conservation*. 129: 244-255.
- 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.
- Balloux, F., Goudet, J. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology*. 11: 711-783.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, G.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 84: 680-683.
- Bergh, M.O., Getz, W.M. 1989. Stability and harvesting of competing populations with genetic variation in life history strategy. *Genetic*. 113: 939-965.
- Castric, V., Bernatchez, L., Belkhir, K., Bonhomme, F. 2002. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity*. 89: 27-35.
- Cihar, J. 1976. A color guide to familiar freshwater fishes. Octopus Books limited London. 165p.
- Coad, B.W. 2012. Freshwater fishes of Iran. www.briancoad.com.
- Coad, B.W. 1980. Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. *Biological conservation*. 10: 51-80.

- Crooijmans, R.P.M. A., Poel, J. J., Groenen, M. A. M., Bierbooms, V.A. F. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics*. 28: 129-134.
- Diz, P.A., Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*. 287: 278-285.
- Dewoody, J.A., Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish biology*. 56: 461-473.
- Dixon, T.J., Coman, G.J., Arnold, S.J., Sellars, M.J., Lyons, R.E., Dierens, D., Preston, N.P., Li, Y. 2008. Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) monitored using two multiplexed microsatellite systems. *Journal of Aquaculture*. 283: 1-6.
- Goudet, J. 2001. Fstat, a program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). Retrieved from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. On: 17 June 2008.
- Grassi, F., Imazio, S., Gomarasca, S., Citterio, S., Aina, R., Sgorbati, S., Sala, F., Patrignani, G., Labra, M. 2004. Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. *Journal of Plant Science*. 166: 1437-1441.
- Hall, S.J.G., Bradley, D.G. 1995. Conserving livestock breed biodiversity. *Trends Ecology and Evolution*. 10: 267-270.
- Hillis, D.M., Mortiz, C., Mable, B.K. 1990. Molecular systematic. Signature associated. 4: 201-210.
- Keller, I., Lurgiader, C.R. 2002. Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss beetles. *Proceeding of the royal society of London of genetic variability in ground biological sciences*. 270: 417-423.
- Kohn, M.H., York, E.C., Kamradt, D.A., Haught, G., Sauvajot, R.M., Wayne, R.K. 1999. Estimating population size by genotyping faces. *Proceedings of the Royal Society London Biology*. 266: 657-663.
- 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.
- Liu, F., Xia, J.H., Bai, Z.H., Fu, J.J., Li, J.L., Yue, G.H. 2009. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*. 297: 51-56.
- 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.
- McRae, B.H., Beier, P., Dewald, L.E., Huynh, L.Y., Keim, P. 2005. Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. *Molecular Ecology*. 14: 1965-1977.
- Mostafavi, H. 2006. Biodiversity of Talar River fishes in Mazandaran Province. *Environmentology Journal*. 40: 127-135.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetic*. 89: 583-590.
- 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.
- Reiley, S.P.D., Pollinger, J.P., Sauvajot, R.M. 2006. A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology*. 15: 1733-1741.
- Rezvani Gilkolaei, S., Kavan, S.L., Safari, R. 2012. A Study of Genetic Structure of *Rutilus frisii kutum* in Anzali Lagoon, Using Microsatellite Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 14: 327-337.

- Askari, G., Shabani, A., Moradi, A. 2013. Genetic variation of *Garra rufa* (Heckel, 1843) in Kermanshah and Bushehr provinces (Iran) using SSR (microsatellite) markers. *Molecular Biology Research Communications*. 2(3): 81-88.
- Taylor, M., Blust, R., Verheyen, E. 2001. Characterization of microsatellite loci in the stone loach (*Barbatula barbatula* L.). *Molecular Ecology Note*. 1: 96-97.
- Thorpe, J.P. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 13: 139-168.
- Waldman, D.A., Yammarino, F.J. 1999. CEO charismatic leadership: levels-of-management and levels-of-analysis effects. *Academy of Management Review*. 24: 266-285.
- Yue, G.H., Li, Y., Lim, L.C., Orban, L. 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. *Aquaculture*. 237: 89-102.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th edition. Prentice Hall. New Jersey. 718 p.
- Zhang, X.Y., Zhou, M.L., Zhang, X.H., Wu, D.J. 2009. Study on population genetic structure of Liangshan semi-wool sheep using microsatellite markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11: 2423-7.