



ساختار ژنتیکی سویه‌های مختلف گونه تایگر بارب (*Puntius tetrazona*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

سید ایمان فاضل^۱، غلامرضا داشاب^{۲*}، مهدی وفای واله^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۰۴

*نویسنده مسئول: dashab@uoz.ac.ir

چکیده:

تنوع، ساختار ژنتیکی و میزان تفرق چهار سویه از ماهی زیتنی بارب، *Puntius tetrazona* شامل تایگر، رزی، آلبینو و گرین بارب با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای بررسی شد. استخراج DNA از ۱۶۰ قطعه ماهی (هر سویه ۴۰ قطعه) از بافت باله پشتی با استفاده از کیت دنا-زیست آسیا و پروتکل شرکت انجام گردید. واکنش تکثیر ۴ نشانگر با استفاده از آغازگرهای Sm17، Sm25، Ma106 و Ma109 انجام و بر روی ژل آکریل امید ۸ درصد الکتروفورز شد. نتایج بیانگر چندشکلی بودن تمام جایگاه‌های مورد مطالعه بود. تعداد آلل‌های مشاهده شده چهار جایگاه در تمام جمعیت برابر با ۲۱ آلل بود. میانگین تعداد آلل به‌ازای هر نشانگر در تمام جمعیت برابر با ۵/۲۵ و در دامنه ۳ تا ۶ آلل قرار داشت. متوسط تعداد آلل مشاهده شده هر سویه به‌ترتیب تایگر، گرین، آلبینو و رزی بارب برابر ۳/۲۵، ۳/۲۵، ۴ و ۳/۲۵ آلل بودند. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در تمام جمعیت به‌ترتیب برابر با ۰/۲۴ و ۰/۴۹ بودند. اکثر جایگاه‌ها در جمعیت‌های مختلف انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند. تجزیه داده‌های مولکولی نشان داد که بخش قابل توجهی از تنوع افراد (۹۷ درصد) در درون سویه‌ها است. مقدار F_{ST} در مطالعه حاضر برابر با ۰/۰۳ بود که نشان از تفرق پایین جمعیت‌ها است. تجزیه کلاستری UPGMA براساس فاصله ژنتیکی Nei تفرق بسیار کمی در بین سویه‌های مختلف تایگر بارب نشان داد. بنابراین، هر چند نشانگرهای ریزماهورهای استفاده شده در مطالعه ساختار ژنتیکی سویه‌ها مناسب بودند، اما درجه تفرق سویه‌ها بسیار کم و حاکی از درجه خویشاوندی بالای آنها است.

کلید واژگان: ماهیان زیتنی، تنوع ژنتیکی، ریزماهوره، تجزیه کلاستری

مقدمه

ماهی بارب از جمله ماهیان زینتی و متعلق به خانواده سیپرینیده^۱ است. باربها ماهیانی با اندازه کوچک بوده که منشأ آنها در مالزی، اندونزی و مناطق اطراف آن است. تنوع رنگ، زیبایی و همچنین نگهداری آسان باعث شده افراد زیادی به پرورش آنها علاقه‌مند شوند (Li et al., 2007). تایگر بارب یکی از گونه‌های محبوب ماهیان زینتی بوده و دو جهش طبیعی باعث ایجاد دو سویه گرین و آلبینو از آن شده است (Froese and Pauly, 2011).

مطالعات مختلفی به منظور بررسی میزان تنوع و تفرق ژنتیکی گونه‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای انجام شده است، اما متأسفانه تحقیقاتی درباره بررسی تاریخچه ماهیان زینتی و درجه تفرق آنها با نشانگرهای مولکولی در دسترس نیست. از این رو در مطالعه حاضر برای بررسی نقش و اهمیت نشانگرهای ریزماهورهای در مطالعات ساختار ژنتیکی و درجه تفرق گونه‌ها از مطالعات مشابهی که بر روی سایر گونه‌ها انجام گرفته، استفاده شده است. در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس‌ماهی چینی^۲ که از ۲۵ نشانگر ریزماهورهای استفاده گردید، تعداد ۱۰ نشانگر تنوع بالا را نشان دادند و استفاده از این نشانگرها در مقایسه با آلوزایم‌ها در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس‌ماهی چینی در جمعیت رودخانه یانگ تسه سودمندتر گزارش شد (Zhu et al., 2002). در بررسی ۱۷ جایگاه ریزماهورهای در ماهی اسپرینچوس^۳ تعداد ۵ تا ۶ آلل در هر جایگاه گزارش شدند و میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت برای جایگاه‌های مختلف در محدوده ۰/۳۳ تا ۰/۹۳ بودند و با توجه به سطوح متوسط تنوعی که در بین جمعیت‌ها مشاهده شد، نشانگرهای ریزماهورهای به‌عنوان ابزار مفیدی برای مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در مقیاس‌های زیست محیطی و نشر جمعیت‌ها معرفی گردید (Joshua and Bernie, 2010).

تنوع ژنتیکی را می‌توان به صورت تنوع توالی DNA ژنومی بین دو موجود یا دو جمعیت از موجودات تعریف کرد؛ یکی از راه‌های افزایش تنوع ژنتیکی تولید نژادهای مختلف از یک گونه و سپس تلاقی آنها است؛ این نژادها دارای آلل‌های منحصر به فرد هستند و تلاقی آنها باعث تولید ژنوتیپ متفاوت از والدین می‌گردد. تنوع درون گونه‌ای پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است، ولی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای را نمی‌توان به راحتی بازسازی کرد (Barker and Soller, 1987; Dekkers and Hospital, 2002).

نشانگرهای مولکولی یک توالی خاصی از DNA هستند که به راحتی آشکار می‌شوند و توارث آنها به سادگی قابل رؤیت است و به طور مستقیم می‌توانند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند. هدف اصلی از مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت برای توصیف و محاسبه میزان تنوع ژنتیکی داخل گونه‌ها است (Ferguson et al., 1995).

نشانگرهای ریزماهورهای دسته خاصی از DNAهای تکراری متوالی هستند که به سرعت در حال جایگزینی یا تکمیل نشانگرهای دیگر هستند و دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی می‌باشند. این نشانگر در همه کروموزوم‌ها و در بیشتر نواحی بین ژنومی وجود دارد. نشانگرهای ریزماهورهای به علت تنوع پذیری بالایی که دارند، به عنوان نشانگر مولکولی توانمند، کاربردهای فراوانی در مباحثی چون ژنتیک جمعیت‌ها، حفظ منابع طبیعی و مدیریت منابع بیولوژیکی دارند (Zane et al., 2002). همچنین، در مطالعات ژنتیکی پیشرفته‌تر برای تعیین ساختار ژنتیک جمعیت، روابط خویشاوندی نسبی و غیرنسبی و مطالعه فیلوژنتیکی جمعیت معرفی می‌شوند (Zhang et al., 2003).

1. Cyprinidae
2. Acipenser Sinensis Gray
3. Spirinchus Thaleichthys

از آنجا که هیچ‌گونه مطالعه‌ای درباره تنوع ژنتیکی و بررسی مولکولی جمعیت‌های ماهیان زینتی انجام نشده، از این رو تحقیق حاضر با هدف مطالعه ساختار ژنتیکی و جمعیتی سویه‌های مختلف گونه ماهیان تایگر بارب و تعیین میزان تفرق یا درجه خویشاوندی آنها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای انجام شده است.

مواد و روش

جمعیت مورد مطالعه و نمونه

در بررسی حاضر ابتدا از چهار سویه ماهیان بارب شامل رزی^۱، گرین^۲، تایگر^۳ و آلبینو^۴ از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در شهر مشهد تهیه گردید و پس از تلاقی و ایجاد دو نسل خالص‌سازی (حدود ۶ ماه)، از هر سویه تعداد ۴۰ بچه ماهی به‌طور تصادفی انتخاب و به میزان ۰/۲ گرم از بافت باله پستی نمونه بافت برای استخراج DNA برداشت شد. نمونه‌ها در داخل الکل ۷۵ درصد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج نگهداری شدند.

شرایط پرورش

از ۱۳ آکواریوم به طول ۵۰، عرض ۳۰ و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر با گنجایش ۵۰ لیتر استفاده گردید که برای خالص‌سازی جنس‌ها، انجام تلاقی‌ها و همچنین، برای ماهیان ذخیره یا جایگزین (در صورت بیماری یا تلفات)، هر کدام ۴ آکواریوم و ۱ عدد هم برای قرنطینه اختصاص داده شد. در تمام آکواریوم‌ها تعداد ۲۰ ماهی مولد با نسبت جنسی ۳ نر و ۲ ماده به تانک تخم‌ریزی انتقال داده شدند. طول مدت روشنایی ۱۴ و تاریکی ۱۰ ساعت در نظر گرفته شد. برای تصفیه آب از فیلتر بیوشیمی برای هر آکواریوم و تعویض ۲۵ درصد با آب تازه استفاده شد. ماهیان در طول دوره

آزمایش با آرتمیای زنده، کرم خونی منجمد و بیومار فرانسه تغذیه شدند و داروهای مورد استفاده متیلن بلو، کپسول تتراسایکلین و داروی ضد قارچ بود. تمامی شرایط از نظر نگهداری، تعداد وعده (سه وعده در شبانه‌روز در طی ساعت‌های ۷ صبح، ۱ بعدازظهر و ۸ شب) و میزان غذایی در تمامی آکواریوم‌ها کاملاً یکسان انجام گرفت. خالص‌سازی از آمیزش درونی هر سویه در طی دو نسل (حدود ۶ ماه) صورت گرفت. دمای آب در طول مراحل پرورش ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در مرحله تلاقی به ۲۹ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. همچنین، PH آب در تمام مراحل یکسان و برابر با ۰/۲ ± ۷/۶ بود. از آنجایی‌که ماهیان بارب تخم‌ها خود را می‌خورند از توری‌های مشبک برای جداسازی تخم‌ها از ماهیان مولد استفاده شد.

استخراج DNA و واکنش تکثیر

نمونه‌ها پیش از شروع استخراج هر یک جداگانه در ازت مایع هموژنیزه شد. بدین ترتیب که مقدار ۰/۲ گرم از بافت باله پستی در داخل آون و ازت مایع کاملاً همگن و سپس با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) ۵۰۰ میکرولیتر بافر DGI (کیت استخراج دنا زیست)، به مدت ۱۲ ساعت داخل بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد هضم گردید. استخراج DNA از بافت هموژنیزه با کیت استخراج از بافت شرکت دنا زیست آسیا (DenaZyst Co.) انجام شد و کیفیت و کمیت DNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

واکنش زنجیره‌ای تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل اپندورف کشور آمریکا) در حجم ۲۰ میکرولیتر و جفت آغازگرهای اختصاصی انجام شد (Li et al., 2011; Rueda et al., 2007). ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در مطالعه حاضر برای تکثیر چهار جایگاه ریزماهواره‌ای در جدول ۱ ارائه شده است.

1. *Puntius conchonius*
2. *Puntius tetrazona*, Moss-band Barb
3. *Puntius tetrazona*
4. *Puntius tetrazona*, Albino Tiger Barb

جدول ۱ ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در مطالعه حاضر برای تکثیر ۴ جایگاه ریزماهورهای در سوبه‌های مختلف تایگر بارب

جایگاه	توالی (5'-3')	دمای اتصال	طول قطعه
Sm17	F:TCAACTGATGACGATTTTT R:GGTCAGTGTTTTCTCTCA	۴۹/۵	۲۳۴-۱۹۶
Ma106	F:TATCAGTGGATCTGCCACCA R:CAGGAGATCAGCCATAAA	۵۸	۲۰۶-۱۲۱
Sm25	F:CCTGATTGTGCTTCTCT R:AAGTAATGTCATCCACAA	۵۰	۲۱۵-۱۶۷
Ma109	F:GCCCAGATGATACAAGTC R:TGGGAGAAAGGAAGCACAAAG	۵۵	۲۷۹-۱۹۵

اجزای واکنش و غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش تکثیر چهار جایگاه ریزماهورهای مطابق با جدول ۲ است. محصولات تکثیر جایگاه‌ها بر روی ژل آکریل امید ۸ درصد الکتروفورز و با نیترا نقره رنگ‌آمیزی شدند و براساس اندازه و تعداد باندها انواع الگوهای ژنوتیپی ماهیان تعیین گردید.

جدول ۲ متابولیت‌ها، مقدار و غلظت اولیه و نهایی آنها در واکنش تکثیر جایگاه‌های ریزماهورهای

متابولیت‌های واکنش	غلظت اولیه	مقدار مورد استفاده (میکرولیتر)	غلظت نهایی (۲۰ میکرولیتر)
Buffer PCR	10 X	۲	۱X
MgCl ₂	100 µl	۱/۵	۳۰ میلی مول
DNA Template	-	۲	۵۰ نانوگرم
Primer	100 pmol	۳	۱۰ پیکومول
dNTP	10 µl	۲	۲۵۰ میکرومول
Taq DNA	5U/ µl	۰/۵	۲/۵ واحد
DmsO	-	۱	-
H ₂ O	-	۸	-

آنالیز آماری و نرم‌افزارهای مورد استفاده

برای تعیین اندازه و تعداد قطعات حاصل از واکنش پلیمرز از نرم‌افزار Photocap version 12.4 استفاده گردید. محاسبه ساختارهای ژنتیکی و جمعیتی شامل فراوانی آلی و ژنوتیپی، میزان هتروزیگوسیتی، آماره‌های F و تعادل و عدم تعادل جایگاه‌ها در جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار POPGENE3.2 (Yeh et al., 1999) انجام گرفت و میزان محتوای اطلاعات ژنتیکی هر جایگاه با نرم‌افزار (Liu and Muse, 2005) PowerMarker Version 3.25 محاسبه شد. آنالیز تجزیه

واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) به منظور تعیین میزان تنوع درون و بین سوبه‌های مختلف با نرم‌افزار GENALEX 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) محاسبه شد.

نتایج

ساختارهای ژنتیکی جمعیت-فراوانی آلی

تعداد آلل‌ها در چهار جایگاه ژنی و چهار جمعیت مورد مطالعه در دامنه بین ۳ تا ۶ آلل قرار داشت (جدول ۳). تعداد کل آلل‌ها در ۴ جایگاه ژنی شامل Sm17، Sm25،

Ma106, Ma109 در کل جمعیت به ترتیب برابر با ۵، ۶، ۵ و ۵ بودند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب ۶ و ۲ در مکان ژنی Ma106 در جمعیت گرین بارب بود. میانگین تعداد کل آلل‌ها در ۴ جایگاه ژنی ۵/۲۵ آلل برآورد شد (جدول ۳).

جدول ۳ فراوانی آللی جایگاه‌های مختلف ریزماهورهای مورد مطالعه در بررسی سویه‌های مختلف ماهیان تایگر بارب

فراوانی آلل‌های مشاهده شده						تعداد آلل	جایگاه ژنی	جمعیت ماهی
F	E	D	C	B	A			
-	-	-	۰/۰۵	۰/۱	۰/۸۵	۳	SM25	رزی بارب
-	۰/۱۵	۰/۱۵	-	۰/۰۵	۰/۶۵	۴	SM17	
-	۰/۱۵	-	-	۰/۶۵	۰/۲	۳	Ma106	
-	-	-	۰/۰۵	۰/۳	۰/۶۵	۳	Ma109	
-	۰/۱	-	-	۰/۴	۰/۵	۳	SM25	گرین بارب
۰/۰۵	۰/۲	۰/۰۵	-	۰/۲۵	۰/۴۵	۵	SM17	
-	-	-	۰/۲	۰/۸	-	۲	Ma106	
-	-	۰/۰۵	-	۰/۴	۰/۵۵	۳	Ma109	
-	۰/۱	-	-	۰/۲	۰/۷	۳	SM25	تایگر بارب
-	-	۰/۱	۰/۱۵	۰/۱	۰/۶۵	۴	SM17	
-	۰/۰۵	-	۰/۱	۰/۸۵	-	۳	Ma106	
-	-	-	۰/۰۵	۰/۲	۰/۷۵	۳	Ma109	
-	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	-	۰/۸۵	۴	SM25	بارب آلبینو
-	۰/۱	۰/۱۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۵	۵	SM17	
-	۰/۱	۰/۱	-	۰/۸	-	۳	Ma106	
-	-	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۳	۰/۵	۴	Ma109	

معیارهای چندشکلی

شود؛ یعنی جایگاه‌هایی چندشکل هستند که فراوانی معمول‌ترین آلل در آنها، کمتر از ۰/۹۹ یا کمتر از ۰/۹۵ باشد. هر دوی این حدود اختیاری است ولی اگر اندازه نمونه کافی باشد (تقریباً ۱۰۰ فرد یا بیشتر)، ۰/۹۹ بیشتر استفاده می‌شود (Navani et al., 2002). مطابق این تعریف هر ۴ جایگاه مورد بررسی چندشکل بوده ولی به‌طور معمول از این معیار برای بیان میزان چندشکلی

از جمله معیارهای تعیین میزان چندشکلی، فراوانی آلل‌ها، تعداد آلل واقعی^۱ و تعداد آلل مؤثر^۲ هستند. روشی علمی برای تعریف چندشکلی این است که یک حد آستانه برای فراوانی آلل‌های معمول در نظر گرفته

1. Na
2. Ne

تایگر و بارب آلبینو به ترتیب ۳/۲۵، ۳/۲۵، ۳/۲۵ و ۴ بودند. همچنین، کمترین و بیشترین میزان آلل‌ها به ترتیب در جایگاه‌های Ma106 (۲/۸ آلل) و Sm17 (۴/۵ آلل) بودند. آلل‌های مؤثر نیز در محدوده ۲/۳۱ - ۱/۷۵ قرار داشتند که در این میان پایین‌ترین میزان در جایگاه Ma106 (۱/۷۵ آلل) و بالاترین آن در جایگاه Sm17 (۲/۳۱ آلل) بود.

در جایگاه‌هایی با چندشکلی زیاد، همچون ریزماهوره‌ها کمتر استفاده می‌شود. معیار دیگری که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود، تعداد آلل واقعی و تعداد آلل مؤثر است. دامنه تعداد آلل‌ها بین ۲-۶ بود. جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده و آلل‌های مؤثر مربوط به جایگاه Sm17 و کمترین آنها مربوط به جایگاه Ma106 است. متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت‌های رزی، گرین،

جدول ۴ تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و مؤثر (Ne) در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای در چهار سویه ماهیان زبیتی بارب

جایگاه ژنی	جمعیت مورد مطالعه ماهیان زبیتی							
	رزی بارب		گرین بارب		تایگر بارب		آلبینو بارب	
	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne
Sm25	۳	۱/۳۶	۳	۲/۳۸	۳	۱/۸۵	۴	۱/۳۷
Sm17	۴	۲/۱۲	۵	۳/۲۲	۴	۲/۱۵	۵	۳/۱۷
Ma106	۳	۲/۰۶	۲	۱/۴۷	۳	۱/۳۶	۳	۱/۵۱
Ma109	۳	۱/۹۴	۳	۲/۱۵	۳	۱/۶۵	۴	۲/۷۴
میانگین	۳/۲۵	۱/۹۳	۳/۲۵	۲/۳۱	۳/۲۵	۱/۷۵	۴	۲/۲۰

هتروزیگوسیتی جایگاه‌های ریزماهوره‌ای

تنوع درون جمعیتی با تعیین معیارهایی شامل هتروزیگوسیتی مورد انتظار^۱ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده^۲ بررسی می‌شود. فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار چهار جایگاه ریزماهوره‌ای در چهار سویه از ماهیان تایگر بارب در جدول ۵ ارائه شده است.

دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه‌ها مورد مطالعه در محدوده ۰/۳ - ۰/۱۶ محاسبه شد، به نحوی که کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب مربوط به جایگاه Mal06 و Sm17 در جمعیت گرین بارب بود. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار نیز ۰/۴۹ به دست آمد که بالاترین (۰/۵۶) و پایین‌ترین (۰/۴۳) میزان آن به ترتیب در جایگاه‌های Sm17 و Mal06 مشاهده شد.

1 Expected Heterozygosity
2 Observed Heterozygosity

جدول ۵ هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده نشانگرهای ریزماهوره‌ای در چهار سویه از ماهیان زینتی بارب

جایگاه	زری بارب		گرین بارب		تایگر بارب		آلبینو بارب	
	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
Sm25	۰/۱	۰/۲۸	۰/۲	۰/۶۱	۰/۲	۰/۴۸	۰/۳	۰/۲۸
Sm17	۰/۴	۰/۵۸	۰/۶	۰/۷۳	۰/۱	۰/۵۶	۰/۳	۰/۷۲
Mal06	۰/۳	۰/۵۴	۰	۰/۳۴	۰/۱	۰/۲۸	۰/۴	۰/۳۶
Mal09	۰/۱	۰/۵۱	۰/۱	۰/۵۶	۰/۱	۰/۴۲	۰/۲	۰/۶۷
میانگین	۰/۲۶	۰/۴۷	۰/۲۶	۰/۵۶	۰/۱۶	۰/۴۳	۰/۳	۰/۵۰

شاخص شانون

(۴/۷۲) است که با توجه به برتری تعداد آلل این جمعیت منطقی به نظر می‌رسد. کمترین مقدار نیز مربوط به جایگاه Mal06 (۲/۵۴) است که با توجه به اینکه این جایگاه کمترین تعداد آلل را دارد، قابل توجه است. نتایج نشان می‌دهد که در اکثر موارد با افزایش تعداد آلل، هتروزیگوسیتی و شاخص شانون افزایش می‌یابد. کمترین و بیشترین میانگین شاخص شانون به ترتیب مربوط به جمعیت تایگر بارب (۰/۷۶) و بارب آلبینو (۰/۹۷) بودند. از این رو در مطالعه حاضر جمعیت آلبینو دارای بیشترین هتروزیگوسیتی و شاخص شانون به ترتیب، (۰/۹۴، ۰/۳) و جمعیت تایگر دارای کمترین این مقادیر (۰/۰، ۰/۱۶) بودند.

مقادیر شاخص شانون جایگاه‌های ریزماهوره‌ای در چهار سویه از ماهیان گونه تایگر بارب در جدول ۶ ارائه شده است. کمترین و بیشترین مقدار شاخص شانون در جمعیت‌های زری بارب و آلبینو بارب به ترتیب مربوط به جایگاه‌های Sm17 (۰/۹۹ و ۱/۳۷) و Sm25 (۰/۵۱ و ۰/۵۸) بودند. همچنین، بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین مقدار شاخص شانون در جمعیت‌های گرین و تایگر بارب مربوط به جایگاه‌های Sm17 (۱/۳۲ و ۱/۰۲) و Mal06 (۰/۵ و ۰/۵۱) است. با مقایسه شاخص شانون در بین چهار جایگاه، بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه Sm17

جدول ۶ مقادیر شاخص شانون (i) جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مورد مطالعه در بررسی چهار سویه از ماهیان زینتی گونه تایگر بارب

جایگاه	آلبینو بارب	تایگر بارب	گرین بارب	زری بارب
Sm25	۰/۵۸	۰/۸۰	۰/۹۴	۰/۵۱
Sm17	۱/۳۷	۱/۰۲	۱/۳۲	۰/۹۹
Mal06	۰/۶۳	۰/۵۱	۰/۵	۰/۸۸
Mal109	۱/۱۴	۰/۶۸	۰/۸۴	۰/۷۹
میانگین	۰/۹۴	۰/۷۶	۰/۹۰	۰/۸۰

شاخص‌های جمعیتی - تعادل هاردی-واینبرگ

که به جز جمعیت‌های بارب آلبینو در جایگاه‌های Sm25 و Mal06 و زری بارب در جایگاه Sm17، سایر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($p < 0.05$).

برای بررسی میزان انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ از هر دو آزمون مربع کا^۱ و نسبت درست‌نمایی^۲ استفاده شد که نتایج هر دو مشابه هم بودند (جدول ۷). نتایج نشان داد

1. XT2
2. GT2

جدول ۷ مقادیر نتایج دو آزمون مربع کا و درست‌نمایی جایگاه‌های ریزماهوره‌ای در چهار سویه از ماهیان زیتنی گونه تایگر بارب

جمعیت	جایگاه ژنی	کای اسکور		حداکثر درست‌نمایی	
		مقدار	سطح احتمال	مقدار	سطح احتمال
رزی بارب	Sm25	۳	۱۹/۰۶	*۰/۰۰	۷/۸۹
	Sm17	۶	۱۳/۱۴	*۰/۰۴	۱۱/۶۳
	Ma106	۳	۱۳/۱۴	*۰/۰۰	۱۱/۶۳
	Ma109	۳	۱۱/۶۳	*۰/۰۰	۱۳/۳۲
گرین بارب	Sm25	۳	۱۱/۴۱	*۰/۰۰	۱۵/۲۰
	Sm17	۱۰	۹/۶۳	*۰/۰۰	۱۱/۲۰
	Ma106	۱	۱۲/۸	*۰/۰۰	۱۱/۱۷
	Ma109	۳	۱۱/۲۲	*۰/۰۱	۱۴/۵۵
تایگر بارب	Sm25	۳	۱۲/۹۰	*۰/۰۰	۱۱/۳۱
	Sm17	۶	۴۳/۵۹	*۰/۰۰	۱۸/۵۸
	Ma106	۳	۱۹/۰۶	*۰/۰۰	۷/۸۹
	Ma109	۳	۱۱/۱۷	*۰/۰۰	۱۲/۸
بارب آلبینو	Sm25	۶	۰/۲۰	۰/۹۹	۰/۳۵
	Sm17	۱۰	۳۳/۱۷	*۰/۰۰	۱۸/۷۵
	Ma106	۳	۰/۴۵	۰/۹۲	۰/۷۶
	Ma109	۳	۱۷/۰۲	*۰/۰۰	۱۶/۲۶

*انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در سطح احتمال ۵ درصد

آماره‌های F

بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را در تمامی جمعیت‌ها

نشان داد.

میانگین ضریب آمیزش خویشاوندی^۱ در تمامی جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مثبت بود و دامنه آنها بین ۰/۴۳ در جایگاه (Sm17) تا ۰/۷۶ در جایگاه (Ma109) بود (جدول ۸). مقادیر مثبت F_{is} نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی است. جایگاه Sm17 با کمترین میزان F_{is}

1 Fis

جدول ۸ مقادیر آماره‌های F و جریان ژنی (Nm) مربوط به جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مورد مطالعه در بررسی چهار سویه ماهیان

زبنتی بارب

نام جایگاه	Nm	F_{st}	F_{it}	F_{is}
Sm25	۱/۳۷	۰/۱۵	۰/۵۷	۰/۴۹
Sm17	۶/۰۲	۰/۰۴	۰/۴۵	۰/۴۳
Ma106	۲/۶۰	۰/۰۶	۰/۴۸	۰/۴۴
Ma109	۷/۱۹	۰/۰۳	۰/۷۶	۰/۷۶
میانگین	۳/۳۷	۰/۰۷	۰/۵۷	۰/۵۳

محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC)

نادر نیز بستگی دارد و جایگاه‌هایی با تعداد کل آلل و تعداد آلل نادر بیشتر، PIC بالا خواهند داشت. با توجه به نتایج به دست آمده، آغازگر Sm17 با چند شکلی ۰/۶۰، بیشترین شاخص چندشکلی را نشان داد (جدول ۱۰)، در نتیجه این آغازگر نیز بهتر از سایر آغازگرها توانست فاصله ژنتیکی افراد را مشخص کند.

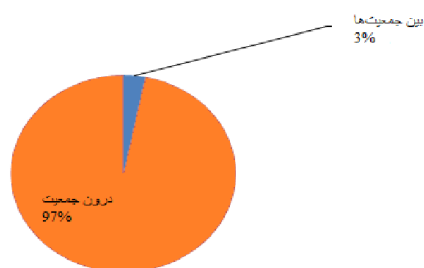
محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نیز معیار دیگری برای انتخاب بهترین جایگاه در مطالعات پیوستگی ژنتیکی است. PIC بالا نشان‌دهنده چندشکلی بالا و وجود آلل‌های نادر در یک مکان ژنی است که می‌تواند در تمایز مؤثر نمونه‌ها استفاده شود. PIC شاخص نشان-دهنده میزان چندشکلی یک آغازگر است که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چقدر این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد و فراوانی زیاد چندشکلی برای آن مکان ژنی در جمعیت است (Botstein et al., 1980).

در مطالعه حاضر کمترین میزان PIC برای جایگاه Ma106 با مقدار میانگین ۰/۳۷ و بیشترین آن مربوط به جایگاه Sm17 با مقدار ۰/۶۰ است. این در حالی است که میانگین اطلاعات چندشکلی برای کل جمعیت‌ها و جایگاه‌های مورد مطالعه ۰/۴۶ محاسبه شد (جدول ۹). بررسی تعداد کل آلل‌ها و نیز تعداد آلل‌های نادر در هر مکان ژنی نشان می‌دهد که مقدار PIC نه تنها به تعداد کل آلل در هر مکان، بلکه به تعداد آلل‌های

جدول ۹ محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرهای ریزماهورهای استفاده شده در بررسی چهار سویه از ماهیان زینتی گونه تایگر بارب

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)

گونه ماهی	میانگین	Sm25	Sm17	Ma106	Ma109
بارب آلبینو	۰/۴۵	۰/۲۶	۰/۶۵	۰/۳۱	۰/۵۷
گرین بارب	۰/۴۶	۰/۴۹	۰/۶۴	۰/۲۷	۰/۴۳
تایگر بارب	۰/۳۷	۰/۴۱	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۳۵
رزی بارب	۰/۴۰	۰/۲۵	۰/۴۹	۰/۴۶	۰/۴۴
کل جمعیت	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۶۰	۰/۳۷	۰/۴۶



شکل ۱ چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده با معیار F_{ST}

آنالیز واریانس داده‌های ژنوتیپی

میزان F_{ST} و جریان ژنی (Nm) بین جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۰۳ و ۷/۷۴ محاسبه شد. با توجه به مقدار F_{ST} حاصل از آزمون^۱ AMOVA تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها معنادار نبوده و تمایز و تفکیک بین جمعیت‌ها پایین است. براساس معیار Wright (۱۹۷۸) میزان F_{ST} بین صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز و تفکیک جمعیتی پایین است. از این رو گفتنی است دو گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه وجود دارد. شکل ۱ تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. همچنین، نتایج براساس AMOVA نشان داد که ۹۷ درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها و تنها ۳ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها بود.

1 Analysis of molecular variance

جدول ۱۰ آنالیز واریانس مولکولی مربوط به جایگاه‌های ریزماهورهای مورد مطالعه در بررسی چهارسویه از ماهیان زیتنی گونه تایگر بارب

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مؤلفه واریانس	درصد تنوع
بین جمعیت‌ها	۳	۱۲/۰۲	۴/۰۰	۰/۰۱	۳
درون جمعیت‌ها	۳۶	۱۰۹/۱۰	۳/۰۳	۳/۰۳	۹۷
کل	۳۹	۱۲۱/۱۲	۳/۱۰		

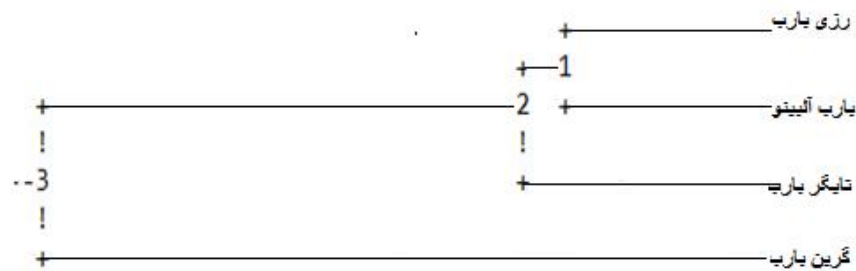
فاصله ژنتیکی

است که بر مبنای توده کردن داده‌ها و یا خوشه‌بندی سلسله مراتبی برای ساخت درخت فیلوژنیک در بیوانفورماتیک به کار می‌رود. این روش نرخ تکامل را ثابت در نظر می‌گیرد (Legendre and Legendre, 1998).

برای گروه‌بندی بین جمعیت‌ها، براساس مقدار فاصله ژنتیکی از رابطه Nei و روش UPGMA استفاده گردید. نتایج حاصل از فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها در جدول ۱۱ نشان داده شده است. این روش یکی از روش‌های ساده‌ای

جدول ۱۱ شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) مربوط به جایگاه‌های ریزماهورهای مورد مطالعه در بررسی چهار سویه ماهیان زیتنی تایگر بارب

جایگاه	آلبینو بارب	تایگر بارب	گرین بارب	رزی بارب
Sm25	۰/۲۷	۰/۴۶	۰/۵۸	۰/۲۶
Sm17	۰/۶۸	۰/۵۳	۰/۶۹	۰/۵۳
Ma106	۰/۳۴	۰/۲۶	۰/۳۲	۰/۵۱
Ma109	۰/۶۳	۰/۳۹	۰/۵۳	۰/۴۸
میانگین	۰/۴۸	۰/۴۱	۰/۵۳	۰/۴۴



شکل ۲ دندروگرام UPGMA نشان‌دهنده روابط بین چهار سویه رزی، گرین، تایگر و بارب آلبینو براساس روابط Nei

شکل ۲ ارجاع در متن ندارد

۰/۶۱ و برای جنس‌های هم‌خانواده در دامنه ۰/۵۸ - ۱/۲۱ است (Botstein et al., 1980). میزان فاصله ژنتیکی به‌دست آمده در بررسی حاضر در محدوده جنس‌های هم-

محققان گزارش کرده‌اند که مقادیر فاصله ژنتیکی (Nei 1997) برای جمعیت‌هایی با گونه‌های مشابه و گونه‌های هم‌جنس به ترتیب در محدوده ۰/۰۲ - ۰/۰۷ و ۰/۰۳ -

خانواده قرار دارد. براساس نتایج حاصل سویه‌های رزی، تایگر و بارب آلبینو در یک گروه و سویه گرین بارب در گروه جداگانه و مجزا از دیگران واقع شده است و نشانگر دو گروه ژنتیکی قابل تمایز است (شکل ۲).

بحث

کاهش در ذخایر ماهیان زینتی یکی از مشکلات مهم این صنعت است که دلیل عمده آن فعالیت‌های انسانی است که از طریق افزایش تکثیر مصنوعی انجام می‌گیرد و سبب یکسان‌سازی ژنتیکی می‌شود. از آنجایی که بسیاری از این ذخایر به صورت ترکیب هستند؛ یکی از مهم‌ترین ابزارها برای شناسایی این گونه‌ها نشانگرهای مولکولی هستند. نشانگرهای ریزماهورای به دلیل اینکه از هر دو والد به ارث می‌رسند و دارای سرعت جهش بالا می‌باشند، به عنوان مهم‌ترین نشانگر برای بررسی تنوع و مطالعات رده‌بندی و تاریخچه گونه‌ها شناخته شده است. در مطالعه حاضر هر ۴ جایگاه مورد بررسی به راحتی تکثیر و چندشکلی نشان دادند. تکثیر موفق حاکی از حفاظت‌شدگی جایگاه‌های ریزماهورای است. استفاده از ریزماهوراها در گونه‌هایی که با هم خویشاوندی نزدیک دارند، متداول و معمولاً موفقیت‌آمیز است، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن جایگزینی بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری ریزماهوراها است که محل باند شدن با آغازگر است. تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه برای نمونه‌های مورد بررسی یک شاخص از تنوع ژنتیکی است (Nevo, 1978). میانگین کل تعداد آلل‌ها در چهار جایگاه ریزماهورای در مطالعه حاضر از میانگین تعداد آلل گزارش شده برای نشانگرهای Sm17 و Sm25 در جمعیت ماهی *Salminus brasiliensis* پایین‌تر است (Rueda et al., 2011). همچنین، در جمعیت ماهی

Monopterus albus تعداد آلل در هر جایگاه شامل Ma106 و Ma109 به ترتیب ۱۳ و ۱۲ گزارش شد که از مطالعه حاضر بالاتر است (Li et al., 2007). متوسط هتروزیگوسیتی در چهار سویه مورد مطالعه در دامنه ۰/۱۶ تا ۰/۳۰ مشاهده شد. تحقیقات نشان داده است که غنای آلی برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به هتروزیگوسیتی مناسب‌تر است. همچنین، بالا بودن غنای آلی نشان‌دهنده بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر است (Grassi et al., 2004). در بررسی تنوع ژنتیکی تاس‌ماهی آتلانتیک^۱ تعداد آلل در جایگاه‌های مورد مطالعه را ۴ تا ۷ آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در دامنه ۰/۶۴-۰/۴۴ گزارش کردند (Wirgin et al., 2002). در مطالعه‌ای سه جمعیت ماهی خیاطه تعداد آلل‌ها برای نشانگرهای مورد مطالعه در دامنه بین ۸ تا ۳۰ آلل گزارش شد (Jahangiri et al., 2012). آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی به شدت تحت تأثیر اندازه نمونه بوده و به همین دلیل ممکن است که در آزمایش‌های گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت تعداد آلل‌های مختلفی برای یک جایگاه معین به دست آید (Peakal and Smouse, 2012). مطالعه تنوع زیستی در جوامع مشخص‌کننده وسعت تنوع ژنی آن جامعه است. اندازه‌گیری فراوانی ژنوتیپ‌ها و از جمله هتروزیگوت‌ها از این جهت اهمیت دارد که ناقل آلل‌های متفاوتی است که بیانگر وجود تنوع است. هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده در این بررسی کمی پایین‌تر از هتروزیگوسیتی‌های گزارش شده برای نشانگرهای Mal06 و Mal09 در ماهی (*Monopterus albus*) بود (Li et al., 2007). علت اصلی این امر را می‌توان به وجود آلل‌های نول^۲ نسبت داد. وجود این آلل‌ها در

1. *Acipenser oxyrinchus mitchilli*
2. Null allele

تنگناهای ژنتیکی ممکن است به واسطه آمیزش‌های خویشاوندی، از بین بردن مولدها پس از یک دوره کوتاه پرورش و نبود ارتباط ژنتیکی بین مولدها در ایستگاه‌های مختلف پرورش ماهیان زیتتی باشد.

مدل هاردی - واینبرگ ثبات فراوانی آلل‌ها را در نسل-های مختلف پیش‌بینی می‌کند در نتیجه این مدل برای بیان رابطه بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها و دستیابی به نتیجه معقول در رابطه با فرایندهای مؤثر بر جوامع مناسب است. اکثر جایگاه‌های ریزماهورای مورد مطالعه در چهار سویه از ماهیان زیتتی گونه تایگر بارب در تحقیق حاضر انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند. علت این امر می‌تواند عدم تلاقی‌های تصادفی، عدم تبادل ژنتیکی بین سویه‌ها و نحوه نمونه‌گیری از جمعیت‌های اولیه باشد. با توجه به اینکه تعادل هاردی - واینبرگ براساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت بنا می‌گردد بنابراین، عدم انتظار تعادل در جمعیت به‌گزینی شده و همچنین جمعیت‌های پرورشی وجود دارد (Dixon et al., 2008).

شاخص F_{st} نشان‌دهنده وجود تمایز در بین سویه‌ها در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی است. برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار آن بین صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا است (Wright, 1978). در مطالعه حاضر بیشترین مقدار F_{st} مربوط به جایگاه Sm25 با مقدار ۰/۱۵ و کمترین آن مربوط به جایگاه Ma109 با مقدار ۰/۰۳ بودند و میانگین F_{st} در جامعه برابر با ۰/۰۷ و معناداری ($p < ۰/۰۵$) بود. با توجه به گزارش رایت هرگاه میزان F_{st} به دست آمده بیش از ۰/۰۵ باشد، بیانگر وجود تمایز متوسط در بین جمعیت‌ها است، هرچند مقدار کم F_{st} نیز می‌تواند

ماهیان می‌تواند امری کاملاً عادی باشد، البته کسری هتروزیگوت‌ها علاوه بر فرضیه آلل‌های نول می‌تواند تحت تأثیر عوامل دیگری همچون به‌گزینی، آمیزش خویشاوندی و به تبع آن افزایش خلوص ژنتیکی نیز باشد (Barroso et al., 2005). در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهیان گزارش شده است که گونه‌های دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین‌تری نسبت به گونه‌های آب شیرین دارند و این تنوع بالا به اندازه بزرگ جمعیت مؤثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیط‌های دریایی و اندازه کوچک جمعیت مؤثر و جریان ژنی محدود در جمعیت‌های آب شیرین نسبت داده شده که این مسئله در ماهیان اکواریومی شدیدتر است (et al., 2005, Birgitte). همچنین، در مطالعه حاضر متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۹ بود. در مطالعه ماهی *Larus argentatus* با نشانگرهای زیرماهورای میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۶۱ و متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۰ گزارش شد (Ma et al., 2012). مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار چهار جایگاه پایین‌تر از ۰/۸ بودند که کمتر از حد مورد انتظار برای جایگاه‌های بسیار چندشکل همچون ریزماهوراها هستند. بنابراین، این تحقیق نشان می‌دهد که تنوع بین سویه‌های مورد مطالعه در حد مطلوبی قرار ندارد (Ma et al., 2012). در مطالعه دیگر میانگین هتروزیگوسیتی در ماهیان آب شیرین، شور و آنادراموس به ترتیب ۰/۴۶، ۰/۷۹، ۰/۶۸ گزارش شدند (Dewoody and Avise, 2000). در مطالعه حاضر فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار نشان‌دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌ها است. علت این کاهش

نشانگرهای استفاده شده نمی‌توان گفت که تفرق مناسب در بین سویه‌ها ایجاد شده است.

منابع

- Balloux, F., Brunner, H. and Lugon-Moulin, N. 2002.** "The estimate of population differentiation with microsatellite markers". *Molecular Ecology*, 11:321-323.
- Balloux, F., Brunner, H., Lugon-Moulin, N., Hausser, J. and Goudet, J. 2000.** "Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study". *Evolution*, 54: 1414-1422.
- Barker, J.S. and Soller, M. 1987.** "Molecular markers in the genetic improvement of farm animals". *Biotechnology*, 5:573.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H. and Traub-Cseko, Y.M. 2005.** "Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites". *Aquaculture*, 247: 51– 65.
- Birgitte, J., Hansen, M., and Loeschke, V., 2005.** "Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox luciosus* L.) population: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species". *Biological Journal of the Linnaean Society*, 84: 1-11.
- Botstein, D. White, R. L. Skolink, M. and Davis, R. W. 1980.** "Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism". *Journal of human Genetic*, 32: 314-331.
- Dekkers JC, Hospital F. 2002.** "The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations". *Nature Revolution Genetic*, 3(1): 22-32.
- Dewoody, J.A., and 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. 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.

حتی نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی مهمی در بین جمعیت‌ها باشد (Balloux et al., 2002). البته، اثر چند-شکلی نیز میزان F_{st} را کاهش می‌دهد (Balloux et al., 2000). وجود دامنه‌های متفاوت F_{st} در بین جمعیت‌ها را می‌توان بیشتر به علت وجود جریان ژنی (Nm)، تأثیر رانش ژنی و جدایی جغرافیایی دانست (Li et al., 2007).

براساس گزارش‌های محققان، هرگاه $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی، اصلی‌ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $Nm < 1$ باشد، رانش ژنی، عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود (Li et al., 2007). از این رو، نتایج حاضر نشان می‌دهد که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها جریان ژنی است که میانگین آن ۳/۳۷ است. مقادیر ضرایب درون‌آمیزی و جریان ژنی در سطح جایگاه‌های ژنی محاسبه گردید که جایگاه Mal09 بالاترین میزان F_{is} و نیز بیشترین مقدار جریان ژنی را نشان داد. نتایج آزمون AMOVA نشان داد که در سویه‌های مورد مطالعه ۹۷ درصد تنوع مربوط به درون سویه‌ها و تنها ۳ درصد تنوع در بین سویه‌ها وجود دارد و حاکی از تمایز پایین آنها است.

نتیجه‌گیری

تمامی جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مورد مطالعه چندشکل بوده و تعداد آلل‌ها در دامنه ۲ تا ۶ قرار دارد. هتروزیگوسیتی و سایر شاخص‌های تنوع در حد متوسط است. آنالیز داده‌های مولکولی نشان می‌دهد که ۹۷ درصد تنوع در درون سویه‌ها و ۳ درصد بین سویه‌ها است، هر چند تنوع درون گونه‌ها برای بقا و تولیدمثل و مقاومت به انگل‌ها باید در سویه‌ها وجود داشته باشد اما براساس

argentatus". *Biochemical Systematic and Ecology*, 43: 159-162.

Navani, N., Jain, P.K., Gupta, S., Sisodia, B.S. and Kumav, S. 2002. "Asset of cattle microsatellite DNA markers for Genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*)". *Animal Genetics*, 33(2): 149-154.

Nevo, E. 1978. "Genetic variation in natural population patterns and theory". *Theoretical population Biology*, B: 121177-121978.

Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. "GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research". *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

Rueda EC et al. 2011. "Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish *Salminus brasiliensis*". *Journal of Fish Biology*, 79: 1370-75.

Wirgin, I., Waldman, J.R., Stabile, J., Lubinski, B., and King, T. 2002. "Comparison mitochondrial DNA control region sequence and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*". *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 313-319.

Wright S. 1978. Evolution and the genetics of population. Vol 4, variability within and among natural population. University of Chicago press, Chicago, USA.

Yeh, FC., Yang, R., and Boyle, T. 1999. "POPEGENE. Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta. Edmonton. yokohamae indicated by AFLP markers". *Biochemical Systematics and Ecology*, 44 (2012) 102-108.

Zane, L., Borgelloni, L and Patariollo, T. 2002. "Strategies for microsatellite isolation: a review". *Molecular Ecology*. 11: 1-16.

Zhang De-Xing and Godfry M.H. 2003. "Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects". *Molecular Ecology*, 12: 563-584.

Zhu, B., Zhou, F., Cao, H., Shao, Z., Zhao, N., and May, B. 2002. "Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population". *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 301-306.

Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. and Hynes, R. A. 1995. "The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations whit special reference to *Salmo*". *Fish Biology*, 47:103-126.

Froese, R. and Pauly, D. 2011. "FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>, version (02/2011) (Accessed 30 April 2011).

Grassi F, Imazio S, Gomasasca S, Citterio S, Aina R, Sgorbati S, Sala F, Patrignani G and Labra M. 2004. "Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations". *Plant Science*, 166: 1437-1441.

Jahangiri, L., Shabany, A. and Rezaei, H.R. 2012. "Analysis of the population genetics of three *Spiralin* (*Alburnoides bipunctatus*) populations in Golestan Province using microsatellite marker". *Genetic Novin*, 8(4): 423-434. (In Farsi)

Joshua, A. and Bernie M. 2010. "Characterization and evaluation of polymorphic microsatellite markers in the anadromous fish *Spirinchus thaleichthys* Conservation". *Genetic Resource*, 2: 227-230.

Legendre, P. and Legendre, L. 1998. "Numerical Ecology. Second English Edition. Developments in Environmental Modelling 20". *Elsevier, Amsterdam*.

Li, J., Wang, G. and Bai, Z. 2009. "Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA". *Aquaculture*. 287: 286-291.

Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, X., and Liang, L. 2007. "Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations". *Journal of Genetics and Genomics*, 34(11): 984-993.

Liu, K. and Muse, S.V. 2005. "PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis". *Bioinformatics*, 21: 2128-2129.

Ma, C.H., Ma, H., Xu, Z., Ma, L., Shen, A., and Feng, N. 2012. "Isolation and characteristics of polymorphic microsatellite markers in *Pennahia*



Genetic structure of different strains of ornamental barb (*Puntius tetrazona*) by microsatellite markers

Syed Iman Fazel¹, Gholam Reza Dashab^{2*}, Mehdi Vafa Valleh²

1-M.Sc. Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2-Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received : 21/06/2015 Accepted : 24/11/2015

*Corresponding author: Dashab@uoz.ac.ir

Abstract:

The genetic structure, diversity and population kinship of four strains of ornamental barb, *Puntius tetrazona*, viz. tiger, green, albino and rose barb, was studied through microsatellite markers. Genomic DNA was extracted from dorsal fin tissue of 160 individuals (40 per strain) using kit and its protocol from Denazist Co. PCR amplification was performed using four pairs of microsatellite primers (Sm17, Sm25, Ma106 and Ma109). PCR products were electrophoresed on 8% acrylamide gel and stained with silver nitrate. The results showed that all loci were polymorphic. A total of 21 alleles for four markers in four strains was found. The mean number of alleles per locus at the population level was 5.25, and the number of alleles per polymorphic locus varied between 3 and 6. Average number of the observed alleles in tiger, green, albino and rose barb strains were 3.25, 3.25, 4 and 3.25, respectively. The observed and expected heterozygosity averages were 0.24 and 0.49, respectively. Most cases significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p \leq 0.01$). The analyses of molecular variance showed high genetic diversity (97%) within populations. The F_{st} value was 0.03 which indicates the low genetic differentiation between populations. UPGMA cluster analysis based on Nei genetic distance showed two different populations inhabiting the regions. Therefore, the microsatellite markers used in this study were found suitable for the different strains, and the degree of diversity was very low between strains, indicating a high degree of kinship.

Keywords: Ornamental fish .Genetic diversity .Microsatellite .UPGMA