شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

صفحات ۲۷۳-۲۶۵

تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) در استان کردستان با استفاده از نشانگرهای بین ریز ماهواره‌ای

بهروز میرزایی[۱]، ابراهیم علیزاده دوغیکلایی[۲]، برزان بهرامی کمانگر*[۳]، علی ارشدی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل

۲. دانشیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل

۳. استادیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان

۴. استادیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۱۶

چکیده

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار (Capoeta trutta) در دو حوزه آبریز واقع در استان کردستان از نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای استفاده گردید. از شش آغازگر دی‌نوکلئوتیدی مورد استفاده، تنها در سه آغازگر (AG)9C، (GA)9C و (AC)9T باندهای واضح، تکرارپذیر و قابل امتیازدهی در شرایط واکنش PCR مورد استفاده مشاهده گردید. این سه آغازگر در مجموع تعداد ۵۶ باند تکرار پذیر در شش جمعیت مورد مطالعه تولید نمودند که درصد پلی‌مورفیسم در جمعیت رودخانه‌های سیروان، گاوه رود، قشلاق، از حوزه سیروان و رودخانه‌های چومان، گرماب و شوی از حوزه چومان به ترتیب ۸۰/۰۰، ۸۲/۹۸، ۸۲/۶۱، ۸۵/۷۱، ۷۹/۶۰ و ۸۰/۴۹ تعیین گردیدند. میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مورد بررسی متوسط تا زیاد برآورد گردید. شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در جمعیت چومان به طور معنی‌دار بیشتر از سایر جمعیت‌های مورد مطالعه بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که حدود ۸۹ درصد تنوع ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها ۱۱ درصد آن مربوط به تنوع بین جمعیتی می‌باشد. مقدار شاخص تثبیت (Fst) محاسباتی نشان‌دهنده میزان تمایز کم تا متوسط در شش جمعیت مورد بررسی است. با این وجود نتایج آزمون صحت، تمایز معنی‌داری بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان نداد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شرایط زیست و حفظ تنوع ژنتیکی برای گونه سیاه ماهی خالدار در دو زیستگاه سیروان و چومان در حد متوسط می‌باشد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی، نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای، سیاه ماهی خالدار، کردستان

* نویسنده مسئول مکاتبه Email: bbkamangar@uok.ac.ir

۱. مقدمه

بررسی تنوع ژنتیکی در ارزیابی جمعیت‌ها می‌تواند از اهمیت زیادی برخوردار باشد. وجود سطوحی از تنوع ژنتیکی میتواند اطلاعاتی در خصوص گذشته جمعیت‌ها و ساختار آنها ارائه دهد. بعلاوه در مدیریت گونه‌ها، اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای پتانسیلی برای ارزیابی خطر انقراض گونه‌ای است (Hedrick, 2001). همچنین اطلاع در خصوص ساختار ژنتیکی گونه‌های ماهیان می‌تواند در بهبود مدیریت شیلاتی و پرورش ماهیان مورد استفاده قرار گیرد (Barman *et al.*, 2003). از آنجائیکه دامنه وسیعی از سطوح تنوع ژنتیکی در مدیریت جمعیت‌های طبیعی و همچنین برای تولید مولدین مناسب در فعالیت‌های آبزی‌پروری لازم است، شاید بتوان گفت که تعیین سطوح تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های ماهیان مهمترین گام در مدیریت منابع شیلاتی و برنامه‌های اصلاح نژاد در آبزی‌پروری است (Ferguson, 1995; Thai *et al.*, 2007). این در حالی است که اطلاعات موجود در زمینه ذخایر ژنتیکی ماهیان ایران بویژه ماهیان آب‌های داخلی محدود می‌باشد. در سال‌های اخیر مطالعاتی در خصوص تعیین میزان تنوع و ساختار ژنتیکی برخی از گونه‌های ماهیان انجام شده است (Keyvanshokooh and Kalbassi, 2006; Samaee *et al.*, 2006; Rahmani *et al.*, 2009; Anvari Far *et al.*, 2010; Mohamadian *et al.*, 2010; Mohamadian *et al.*, 2011). با این وجود بیشتر این مطالعات محدود به گونه‌های حوزه دریای خزر می‌باشد.

جنس *Capoeta* از خانواده کپور ماهیان دارای پراکنش وسیعی از شرق اروپا تا جنوب غربی آسیا می‌باشد (Banarescu and Coad, 1991). این جنس دارای ۲۴ گونه می‌باشد که تا کنون ۱۲ گونه آن در ایران گزارش شده است (Abdoli, 2000; Alwan *et al.*, 2016; Zareian *et al.*, 2016). سیاه ماهی خالدار (*Capoeta trutta*) یکی از مهمترین گونه‌های جنس *Capoeta* در حوزه رودخانه‌های دجله و فرات است. این گونه به طور گسترده‌ای در استان کردستان پراکنش دارد و تاکنون مطالعاتی در زمینه تنوع ژنتیکی آن صورت نگرفته است. این گونه برای ماهی‌گیری در آب‌های داخلی، مقاصد آبزی‌پروری، صید ورزشی و مطالعات جغرافیای جانوری دارای اهمیت است (Kiabi *et al.*, 1999; Danabas *et al.*, 2011).

استان کردستان با دارا بودن منابع آبی فراوان، بستر مناسبی برای زیست بسیاری از گونه‌های ماهی می‌باشد. براساس تقسیمات جغرافیای جانوری، فون ماهیان استان کردستان در انطباق با دو منطقه جانوری سارمات[1] و بین‌النهرین می‌باشد (Armantrout, 1980). فعالیت‌های انسانی در سال‌های اخیر موجب تخریب و تغییر بسیاری از زیستگاه‌های گونه‌های آبزیان گردیده است. احداث سد، انتقال‌های بین حوزه‌ای آب و همچنین بهره برداری از منابع آبی استان موجب گردیده زیستگاه بسیاری از گونه‌های ماهی تخریب گردد. با توجه به اهمیت اکولوژیک و اقتصادی گونه سیاه ماهی خالدار، تعیین اطلاعات در خصوص ساختار ژنتیکی و وضعیت تنوع ژنتیک جمعیت‌های موجود آن می‌تواند در برنامه‌های حفاظتی و پرورشی آتی مورد استفاده قرار گیرد.

نشانگرهای بین ریز ماهواره‌ای[2] (ISSR) نشانگرهایی هستند که بر پایه سیستم ریز ماهواره‌ها اصلاح و توسعه یافته‌اند (Zietkiewicz *et al.*, 1994). این نشانگر دارای مزایای بسیار زیادی است که از آن جمله می‌توان: نیاز به مقادیر کم DNA، عدم نیاز به اطلاعات ژنومی برای ساخت پرایمر، توزیع تصادفی در سرتاسر ژنوم، تکثیر و توزیع باندهای فراوان با اطلاعات مفید از هر واکنش اشاره کرد. همچنین قدرت آن در مطالعات تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در مقایسه با سایر نشانگرهای غالب بیشتر است (Liu *et al.*, 2009). لذا در این تحقیق ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار در استان کردستان با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

---

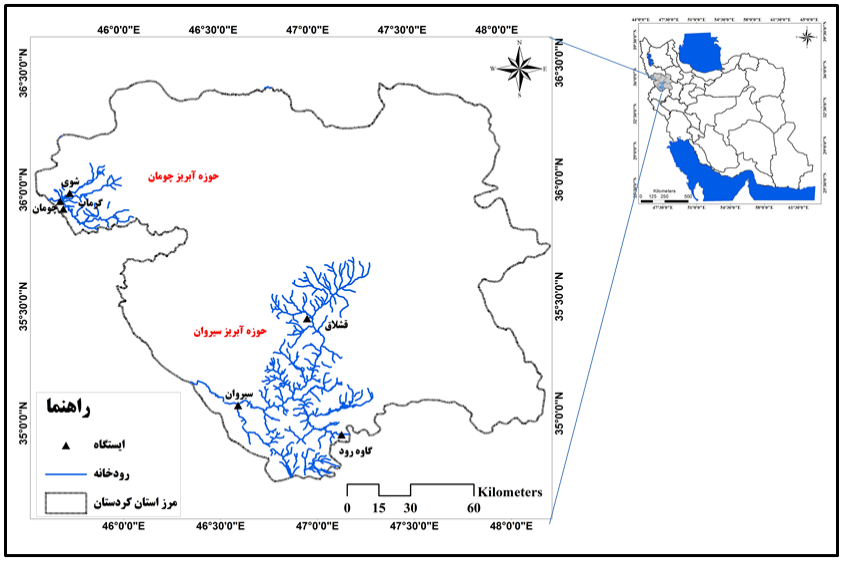
[1] Sarmatian

[2] Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

۲. مواد و روشها

برای انجام این تحقیق از شش رودخانه قشلاق، گاوه‌رود و سیروان در حوزه آبریز سیروان، شوی، گرم‌آب و چومان از حوزه آبریز چومان که از شاخه‌های اصلی حوزه دجله واقع در استان کردستان می‌باشند، تعداد ۱۱۵ قطعه سیاه ماهی خالدار طی بهار ۱۳۸۹ صید گردیدند (شکل ۱). این دو حوزه به ترتیب در جنوب و غرب استان کردستان واقع بوده و هر دو حوزه، براساس تقسیمات جغرافیای جانوری در منطقه جانوری بین‌النهرین قرار دارند. نمونه برداری با استفاده از تور سالیک با اندازه چشمه‌های ۱۵ و ۴۵ میلیمتری انجام گرفت. در هر یک از رودخانه‌ها، صید ماهی در طول حدود ۳ کیلومتر و با پرتاب‌های متعدد تور انجام گرفت. نمونه‌های صید شده بلافاصله پس از شناسایی اولیه در کنار یخ نگهداری شدند. از بافت عضله نمونه‌های ماهی برای استخراج DNA استفاده گردید. استخراج DNA بر اساس روش استخراج نمکی انجام گرفت (Zilberman *et al.*, 2006). غلظت DNA استخراجی بر روی ژل آگاروز ۱٪ و در مقایسه با غلظت مشخص فاژ لامبدا مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بسط قطعات بین ریزماهواره‌ای از شش آغازگر دی‌نوکلئوتیدی(AG)9C، (GA)9C، (GT)9C، (CA)9C، (AC)9T و (GT)9C استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از کیت شرکت سیناژن (Master Mix 2X PCR) انجام گرفت. به منظور تعیین بهترین شرایط حرارتی برای انجام واکنش‌های PCR چرخه‌های حرارتی مختلفی مورد استفاده قرار گرفت و بهترین حالت با ۳۵ چرخه حرارتی شامل: یک چرخه واسرشته سازی اولیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴ دقیقه) و ۳۵ چرخه (واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه) و در ادامه یک چرخه بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از الکتروفورز محصولات PCR برروی ژل اکریل آمید ۸٪ استفاده گردید. رنگ‌آمیزی ژل بر اساس روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام گرفت (Ji *et al.*, 2007).

تجزیه و تحلیل داده‌ها مبتنی بر دو فرض انجام گرفت: ۱) نشانگر ISSR یک نشانگر غالب است که در آن آلل‌ها به صورت وجود یا عدم وجود مشاهده می‌شوند. ۲) باندهایی که به یک اندازه مهاجرت می‌نمایند، لوکوس‌های مشابه هستند. براساس وزن مولکولی باندهای حاصل از واکنش PCR در نمونه‌های مورد بررسی، ماتریس صفر و یک با توجه به حضور (۱) و عدم حضور (۰) هر باند در یک جایگاه ژنی و در افراد مورد مطالعه تعیین گردید. سپس ماتریس بدست آمده در تعیین شاخص‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. میزان تنوع ژنتیکی درون هریک از جمعیت‌های مورد بررسی با توجه به شاخص‌های تعداد باند مشاهده شده، تعداد باند پلی‌مرف، درصد باندهای پلی‌مرف (Brown and Feldman, 1981)، هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی نئی (Nei, 1978) و شاخص شانون توسط نرم‌افزار Popgen 1.31 تعیین گردیدند. مقایسه این شاخص‌ها بین هر دو جمعیت با استفاده از آزمون t استیودنت و در سطح ۵٪ انجام گرفت. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس شاخص‌های فاصله ژنتیک نااریب نئی، میزان مشابهت ژنتیکی و دندروگرام حاصل براساس فاصله ژنتیکی، تنوع بین جمعیتی (G_{st}) و برآورد میزان جریان ژنی (N_m) (Nei, 1978) با استفاده از نرم‌افزار Popgen 1.31 تعیین گردیدند. از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 به منظور مطالعه ساختار جمعیت‌ها استفاده گردید (Excoffier *et al.*, 2005). همچنین مقایسه جفت جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از شاخص تثبیت (F_{st}) و با استفاده از ۱۰۰۰ جای‌گشت انجام گرفت. بررسی وجود تمایز بین جمعیت‌ها با استفاده از آزمون صحت (exact test) مورد ارزیابی قرار گرفت (Raymond and Rousset, 1995).



شکل ۱. مشخصات جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری در دو حوزه مورد مطالعه استان کردستان

۳. نتایج

از شش آغازگر دی‌نوکلئوتیدی مورد استفاده تنها سه آغازگر (AG)9C، (GA)9C و (AC)9T باندهای واضح، تکرارپذیر و قابل امتیازدهی در شرایط واکنش PCR مورد استفاده تولید نمودند. از میان این سه آغازگر، بیشترین تعداد باند توسط آغازگر (GA)9C و کمترین توسط آغازگر (AC)9T تولید گردید. این سه آغازگر در مجموع تعداد ۵۶ باند تکرار پذیر در شش جمعیت مورد مطالعه تولید نمودند (جدول ۱). باندهای حاصله با آغازگر (AG)9C در دامنه ۴۵۰ تا ۳۷۰۰، آغازگر (GA)9C در دامنه ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ و آغازگر (AC)9T در دامنه ۵۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز مشاهده گردیدند. باندهای خارج از این دامنه بعلت ضعیف بودن و عدم تکرارپذیری در تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار نگرفت.

نتایج شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها در شش جمعیت مورد مطالعه شامل، تعداد باند پلی‌مورف، درصد باند پلی‌مورف، هتروزیگوسیتی و شاخص شانون در هر جمعیت و در کل جمعیت‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. در میان جمعیت‌های مورد بررسی سیاه ماهی خالدار، درصد پلی‌مرفیسم به نسبت بالا و بین ۷۹/۶۰ تا ۸۵/۷۱ درصد تعیین گردید (جدول ۱). نتایج شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل هتروزیگوسیتی، شاخص شانون در جمعیت‌های مورد بررسی نشان دهنده وجود تنوع متوسط تا بالا در جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد. بیشترین مقادیر این شاخص‌ها در جمعیت چومان از حوزه چومان مشاهده گردید (جدول ۱). مقایسه این شاخص‌ها در بین جمعیت‌های مورد بررسی با آزمون t در سطح ۵ درصد نشان داد که شاخص‌های یاد شده در جمعیت چومان به طور معنی‌دار از سایر جمعیت‌ها بیشتر می‌باشد. با این وجود تفاوت معنی‌داری بین مقادیر این شاخص‌ها در سایر جفت مقایسه‌های انجام شده مشاهده نگردید. مقادیر همسانی ژنتیکی محاسبه شده در جدول ۲ ارائه گردیده است. مقادیر بدست آمده نشان دهنده وجود همسانی ژنتیکی بالا در جمعیت‌های مورد بررسی دو حوزه سیروان و چومان دارد. دندروگرام حاصل به روش UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی ناریب نئی بین جمعیت‌ها (Nei, 1978) در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این دندروگرام جمعیت سیروان از حوزه سیروان به تنهایی در یک شاخه و سایر جمعیت‌ها از هر دو حوزه در شاخه دیگر قرار می‌گیرند. همچنین جمعیت‌های قشلاق و گرم‌آب نسبت به سایر جمعیت‌ها در شاخه‌های نزدیک‌تری قرار گرفته‌اند. این درحالی است که الگوی دندروگرام حاصل تطابق کامل با الگوی فاصله جغرافیایی جمعیت‌های مورد مطالعه ندارد. برآورد مقادیر تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، تنوع کل و تنوع بین جمعیتی (G_{st}) در جدول ۳ ارائه گردیده است. مقدار تنوع بین جمعیتی در جمعیت‌های مورد

مطالعه معادل ۰/۱۱ می‌باشد. به عبارتی تنها ۱۱ درصد تنوع مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها بوده و ۸۹ درصد آن مربوط به وجود تنوع درون جمعیت‌ها است. همچنین میزان جریان ژنی برآورد شده معادل ۳/۹۲ تعیین گردید.

جدول ۱. شاخص‌های تنوع ژنتیکی در شش جمعیت سیاه ماهی خالدار استان کردستان

حوزه	جمعیت	تعداد نمونه	تعداد باند مشاهده شده	تعداد باند پلی‌مرف	درصد پلی‌مرفیسم	شاخص شانون (I ± sd)*	هتروزیگوسیتی (h ± sd)*
	چومان	۲۰	۵۶	۴۸	۸۵/۷۱	۰/۳۵ ± ۰/۲۰	۰/۲۲ ± ۰/۱۴
چومان	گرم‌آب	۲۰	۴۹	۳۹	۷۹/۶۰	۰/۲۷ ± ۰/۲۰	۰/۱۶ ± ۰/۱۴
	شوی	۲۰	۴۱	۳۳	۸۰/۴۹	۰/۲۳ ± ۰/۱۹	۰/۱۳ ± ۰/۱۳
	گاوه‌رود	۲۰	۴۷	۳۹	۸۲/۹۸	۰/۲۶ ± ۰/۱۹	۰/۱۵ ± ۰/۱۳
سیروان	قشلاق	۲۰	۴۶	۳۸	۸۲/۶۱	۰/۲۶ ± ۰/۱۸	۰/۱۵ ± ۰/۱۲
	سیروان	۱۵	۴۵	۳۶	۸۰/۰۰	۰/۲۵ ± ۰/۱۹	۰/۱۴ ± ۰/۱۳
	کل	۱۱۵	۵۶	۴۸	۸۵/۷۱	۰/۲۷ ± ۰/۱۷	۰/۱۵ ± ۰/۱۲

* میانگین ± انحراف معیار

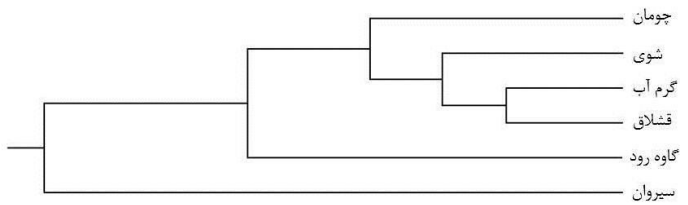
جدول ۲. مقادیر همسانی ژنتیکی جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار مورد برررسی در استان کردستان

جمعیت	چومان	گرم‌آب	شوی	گاوه‌رود	قشلاق	سیروان
چومان	۰/۰۰					
گرم‌آب	۰/۹۷۵	۰/۰۰				
شوی	۰/۹۸۴	۰/۹۷۶	۰/۰۰			
گاوه‌رود	۰/۹۸۸	۰/۹۸۸	۰/۹۸۹	۰/۰۰		
قشلاق	۰/۹۸۹	۰/۹۸۴	۰/۹۹۲	۰/۹۹۴	۰/۰۰	
سیروان	۰/۹۶۸	۰/۹۶۰	۰/۹۶۹	۰/۹۷۵	۰/۹۷۹	۰/۰۰

جدول ۳. نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی نئی در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار مورد مطالعه

تعداد نمونه	تنوع ژنتیکی درون جمعیتی (H_s) ± sd*	تنوع ژنتیکی کل (H_t) ± sd*	تنوع بین جمعیتی G_{st}
۱۱۵	۰/۱۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۱

* انحراف معیار



شکل ۲. دندروگرام جمعیت‌های مورد بررسی سیاه ماهی خالدار در شش حوزه بر اساس فاصله نااریب نئی به روش UPGMA.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان دهنده وجود ساختار جمعیتی مشخص و معنی‌دار، هر چند متوسط در جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد (جدول ۴). زمانیکه تمامی جمعیت‌های مورد بررسی به عنوان زیر جمعیت‌هایی از یک جمعیت اولیه در نظر گرفته شدند مقدار شاخص تثبیت (F_{st} =

(0.112, P = 0.001) کمی بیشتر از مقدار شاخص تثبیت بدست آمده در حالتی است که جمعیت‌های مورد بررسی به عنوان جمعیت‌های موجود در دو حوزه مستقل مورد تجزیه قرار گیرند (F_{st} = 0.108, P = 0.001). در حالت اخیر جزء واریانس محاسباتی برای دو حوزه بسیار کم و منفی بدست آمد (جدول ۴). مقایسه دو به دو شاخص تثبیت (F_{st}) جمعیت‌های مورد بررسی نشان دهنده وجود فاصله متوسط آنها بوده و این مقادیر به طور معنی‌داری (P < 0.05) از صفر بیشتر می‌باشند (جدول ۵). با این وجود نتایج آزمون صحت نشان دهنده عدم تمایز بین جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد (Exact P value = 1).

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس مولکولی در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار مورد مطالعه

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	اجزا واریانس	درصد واریانس
بین دو حوزه	۱	۱۸/۱۹	-۰/۰۶	-۰/۸۷
بین جمعیت‌های درون حوزه‌ها	۴	۸۵/۷۷	۰/۸۰	۱۱/۷۴
درون جمعیت‌ها	۱۰۹	۶۶۴/۸۷	۶/۱۰	۸۹/۱۳
کل	۱۱۴	۷۶۸/۸۲	۶/۸۴	
(F_{ST} = ۰/۱۰۸ (P = ۰/۰۰۰ بر اساس ۱۰۲۳ جایگشت				
بین جمعیت‌ها	۵	۱۰۳/۹۵	۰/۷۷	۱۱/۱۸
درون جمعیت‌ها	۱۰۹	۶۶۴/۸۷	۶/۱۰	۸۸/۸۲
کل	۱۱۴	۷۶۸/۸۲	۶/۸۷	
(F_{ST} = ۰/۱۱۲ (P = ۰/۰۰۰ بر اساس ۱۰۲۳ جایگشت				

جدول ۵. مقایسه شاخص تثبیت (F_{ST}) جفت جمعیت‌های مورد بررسی در دو حوزه مورد مطالعه. تعداد جایگشت ۱۰۲۳

جمعیت	چومان	گرم‌آب	شوی	گاوه‌رود	قشلاق	سیروان
چومان	۰/۰۰					
گرم‌آب	۰/۱۱۰	۰/۰۰				
شوی	۰/۱۵۳	۰/۱۳۸	۰/۰۰			
گاوه‌رود	۰/۱۴۵	۰/۱۵۹	۰/۱۸۳	۰/۰۰		
قشلاق	۰/۰۹۵	۰/۰۶۵	۰/۰۹۶	۰/۰۸۶	۰/۰۰	
سیروان	۰/۰۹۸	۰/۰۴۶	۰/۱۲۵	۰/۱۵۲	۰/۰۵۷	۰/۰۰

۴. بحث و نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها نقش مهمی در تداوم حیات آنها ایفا نموده و توانایی گونه را برای سازگاری با تغییرات زیست محیطی تضمین میکند. از طرف دیگر جدایی جمعیت‌ها و در انزوا قرار گرفتن آنها برای مدت طولانی باعث فرسایش ژنتیکی شده و توانایی آنها را برای رویارویی با بحران‌های محیطی کاهش میدهد. بنابراین تنوع ژنتیکی بالا در میان گونه‌ها شانس بقای بیشتری در اختیار آنها قرار داده، زیرا می‌تواند پایداری آنها را در برابر بیماری‌ها و حوادث طبیعی افزایش داده و احتمال ایجاد اختلال و یا جهش‌های خطرساز ژنتیکی را در میان آنها کاهش دهد (Hedrick, 2001; Barman *et al.*, 2003).

بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار مورد مطالعه نشان دهنده وجود تنوع متوسط تا زیاد در این جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که میانگین هتروزیگوسیتی در شش جمعیت مورد بررسی در محدوده بین ۰/۱۳ تا ۰/۲۲ است. در بین جمعیت‌های مورد بررسی، جمعیت سیاه ماهی خالدار رودخانه چومان دارای بالاترین مقادیر شاخص‌های تنوع درون جمعیتی بود. میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بستگی به تعادل بین جهش ژنتیکی، رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی دارد. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های وحشی جانوران توسط جهش بوجود آمده و توسط

رانش ژنتیکی، در نتیجه کاهش اندازه جمعیت تنزل پیدا می‌نماید (Frankham, 1996). وجود تنوع ژنتیکی بالاتر در جمعیت چومان می‌تواند ناشی از بزرگ‌تر بودن اندازه جمعیت سیاه ماهی در این رودخانه باشد. رودخانه چومان رودخانه‌ای دائمی است که در خروجی حوزه مورد بررسی قرار دارد. بعلاوه رودخانه‌های شوی و گرم‌آب به درون این رودخانه تخلیه می‌گردند. بنابراین امکان مهاجرت اجباری جمعیت‌های شوی و گرم‌آب در فصول کم‌آب به طرف رودخانه چومان وجود دارد. بجز جمعیت رودخانه چومان، سایر جمعیت‌های مورد بررسی دارای مقدار تنوع ژنتیکی متوسط بوده و مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی آنها تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) را نشان ندادند. وضعیت هیدرولوژیکی حوزه سیروان از نظر ارتباط رودخانه‌های مورد بررسی مشابه با حوزه چومان است. از این نظر که رودخانه قشلاق پس از ارتباط با رودخانه گاوه رود تشکیل رودخانه سیروان را می‌دهد. با این وجود تفاوت اصلی که می‌تواند موجب کوچک شدن زیستگاه و اندازه جمعیت‌های رودخانه‌های این حوزه گردد، وجود دو سد قشلاق و گاوشان به ترتیب بر روی رودخانه‌های قشلاق و گاوه رود است. نمونه‌های جمعیت قشلاق و گاوه رود هر دو از پشت مخازن سدهای احداث شده صید گردیدند. وجود این موانع انسان ساخت می‌تواند موجب محدودیت زیستگاه و کوچک شدن اندازه جمعیت سیاه ماهی در این رودخانه‌ها گردد.

از طرف دیگر میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی (H_s) و تنوع ژنتیکی کل (H_t) محاسبه شده در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار بالاتر از مقادیر متوسط گزارش شده این شاخص‌ها برای ماهیان آب شیرین است (Ward *et al.*, 1994). مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار مورد بررسی با گزارش‌های موجود در زمینه تنوع ژنتیکی در برخی از گونه‌های خانواده کپور ماهیان در ایران نشان دهنده وجود تفاوت‌ها و شباهت‌هایی می‌باشد. نتایج گزارش شده در پنج جمعیت سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) رودخانه‌های حوزه دریای خزر با استفاده از نشانگرهای RAPD درصد پلی‌مرفیسم مشابهی با مقادیر بدست آماده در سیاه ماهی خالدار را نشان می‌دهد (Samaee *et al.*, 2006). از طرف دیگر میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و کل در دو جمعیت سیاه ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) با استفاده از روش RAPD بیشتر و میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها کمتر از مقادیر بدست آمده در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار گزارش شده است (Anvari Far *et al.*, 2010) . در دو جمعیت ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) دریای خزر درصد پلی‌مرفیسم با استفاده از روش RAPD پایین‌تر از مقادیر موجود در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار گزارش شده است (Keyvanshokooh and Kalbassi, 2006). از طرف دیگر میزان هتروزیگوسیتی موجود در دو جمعیت ماهی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای بیشتر از مقادیر موجود در جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار بیان شده است (Mohamadian *et al.*, 2010; Mohamadian *et al.*, 2011). وجود این تفاوت‌ها نه تنها بعلت اختلاف‌های گونه‌ای و جمعیتی است بلکه می‌تواند ناشی از نوع نشانگر مورد استفاده باشد. نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگر RAPD دارای تکرارپذیری بیشتر بوده و توان بالاتری در تعیین پلی‌مرفیسم دارد. با این وجود ISSR نسبت به نشانگر ریزماهواره‌ای و برخی نشانگرهای مولکولی دیگر میزان پلی‌مرفیسم کمتری را نشان می‌دهد (Liu *et al.*, 2009). نتایج تحقیق حاضر در سیاه ماهی خالدار نیز تاییدی بر این نکته است. در این تحقیق تنها با استفاده از سه آغازگر تعدا ۵۶ باند تکرارپذیر مشاهده گردید.

نتایج بررسی ساختار جمعیتی ارتباط نزدیکی بین جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار در دو حوزه مورد مطالعه بر اساس مقادیر شاخص‌های G_{st} و F_{st} نشان داد. همچنین نتایج آزمون صحت دلالت بر عدم تمایز معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد بررسی داشت. از طرف دیگر الگوی دندروگرام حاصل بر اساس فاصله ژنتیکی نااریب نئی با فواصل جغرافیایی جمعیت‌های مورد بررسی فاقد تطابق کامل بود. مقدار شاخص تثبیت در دامنه ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ نشان‌دهنده تمایز متوسط بین جمعیت‌ها می‌باشد (Wright, 1978). بنابراین نتایج حاضر نشان می‌دهد که جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار در دو حوزه چومان و سیروان با

وجود فاصله جغرافیایی زیاد هنوز کاملا متمایز نگردیده‌اند. به عبارت دیگر جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار دو حوزه از یک جمعیت اولیه مشترک مشتق شده و جریان ژنی تا دوره‌های اخیر وجود داشته است. وجود جریان ژنی معادل ۳/۹۲ محاسبه شده در این مطالعه تاییدی بر این موضوع می‌باشد. با وجود فاصله جغرافیایی بالا، هر دو حوزه مورد مطالعه متعلق به حوزه بزرگتر دجله می‌باشند. بررسی ساختار هیدرولوژیکی دو حوزه مورد مطالعه نشان می‌دهد که تنها در دوره معاصر به واسطه تغییرات انسان ساخت مانند ایجاد سد، مسیرهای ارتباطی و مهاجرت جمعیت‌ها محدود گشته و این زمان هنوز فرصت لازم برای تفکیک جمعیت‌ها را ایجاد ننموده است.

نتایج آزمون تجزیه واریانس مولکولی در حالتی که جمعیت‌های مورد بررسی به عنوان جمعیت‌های مستقل در دو حوزه در نظر گرفته شدند، نشان دهنده مقدار کم و منفی جزء واریانس محاسباتی برای دو حوزه بود (جدول ۴). اجزا منفی واریانس می‌تواند در نتیجه برآورد مقدار بسیار کم ولی مثبت مقدار آماره تتا (θ) (Excoffier *et al.*, 2005) از داده‌ها نسبت به مقدار واقعی در طبیعت و یا منفی بودن واقعی مقدار تتا باشد. منفی بودن جزیی از واریانس بدین معنی است که آلل‌های موجود در بین جمعیت‌ها نسبت به آلل‌های درون جمعیت‌ها بسیار نزدیک‌تراند (Weir, 1996).

نتایج این مطالعه نشان داد که جمعیت‌های سیاه ماهی خالدار موجود در استان کردستان دارای تنوع ژنتیکی متوسط تا زیاد می‌باشند. همچنین بررسی ساختار ژنتیکی این جمعیت‌ها نشان داد که با وجود فاصله جغرافیایی زیاد در دو حوزه مورد مطالعه میزان تمایز جمعیت‌ها در حد متوسط می‌باشد. این شاید بدین معنی باشد که با توجه به تغییرات انسان ساخت مانند ایجاد سد و انتقال آب بین حوزه‌ای در دو زیستگاه مورد بررسی، شرایط برای ادامه حیات این گونه و حفظ تنوع ژنتیکی آن در حد متوسط می‌باشد.

References

Abdoli, A., 2000. The inland water fishes of Iran. Museum of Nature and Wild life, Tehran, Iran, 377 p. (in Persian).

Alwan, N.H., Zareian, H., Esmaeili, H.R., 2016. *Capoeta coadi*, a new species of cyprinid fish from the Karun River drainage, Iran based on morphological and molecular evidences (Teleostei, Cyprinidae). *Zookeys* 572, 155-180.

Anvari Far, H., Farahmand, H., Nematolahi, M., Rahmani, H., Karami, M., Khalili, B., 2010. Impacts of shahid Rajaii dam on genetic variation and differentiation siah mahi, *capoeta capoeta gracilis*, in tajan river using RAPD fingerprinting. *Journal of Natural Environment* 63, 211-223 (in Persian).

Armantrout, N.B., 1980. The freshwater fishes of Iran. Ph.D thesis, Oregon State University, 472 p.

Banarescu, P., Coad, B.W., 1991. Cyprinids of Eurasia. In: Winfield, I., Nelson, J.S. (Eds.), Cyprinid Fishes Systematics Biology and Exploitation. Chapman and Hall, London, pp. 127-155.

Barman, H.K., Barat, A., Yadav, B.M., Banerjee, S., Meher, P.K., Reddy, P.V.G.K., Kumar Jana, R., 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* 217, 115-123.

Brown, A.H.D., Feldman, M.W., 1981. Population structure of multilocus associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 5913-5916.

Danabas, D., Benzer, F., Kaplan, O., Yildirim, N.C., 2011. Levels of copper in liver, muscle and gill tissues in *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) from Munzur River, Turkey. *African Journal of Agricultural Research 6*, 1909-1912.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analyses. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Ferguson, M., 1995. The role of molecular genetic markeres in the management of cultured fishes. In: Carvalho, G.R., Pitcher, T.J. (Eds.), Molecular genetics in fisheries. Chapman and Hall, London, pp. 81-103.

Frankham, R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10, 1500-1508.

Hedrick, P.W., 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution* 16, 629-636.

Ji, Y.-T., Qu, C.-Q., Cao, B.-Y., 2007. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 28, 1173-1175.

Keyvanshokooh, S., Kalbassi, M.R., 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. *Aquaculture Research* 37, 1437-1440.

Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. *Zoology in the Middle East* 18, 57–65.

Liu, Y.G., Yu, Z.G., Bao, B.L., Sun, X.Q., Shi, Q.L., Liu, L.X ,.2009. Population genetics studies of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 821–827.

Mohamadian, S., Rezvani Gilkolaei, S., Kazemian, M., Kamali, A., Rouhollahi, S., Taghavi, M.J., Laloei, F., 2011. A study on population genetics of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) using microsatellite markers in Gilan province, the Southern Caspian Sea. *Iranian Journal of Natural Resources* 64, 145-152 (in Persian).

Mohamadian, S., Rezvani Gilkolaei, S., Kazemian, M., Kamali, A., Taghavi, M.J., Rouholahi, S., Laloei, F., Nayerani, M., 2010. The study of genetic diversity and population structure of *Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) populations in the Eastern and Western coastline of the Caspian sea (Havigh River and GorganRoud River) using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics* 2, 29-38 (in Persian).

Nei, M., 1978. Estimation of average hetcrozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.

Rahmani, H., Kazemi, H., Pourkazemi, M., Bandehpour, M., Naderi Jolodar, M., Seyed, N., Ataei, F., 2009. Genetic diversity of the Shemaya (*Chalcalburnus chalcoides*) populations in Haraz, Shirud and Gazafrud Rivers using 18S rRNA gene and the PCR-RFLP Method. *Environmental Sciences* 6, 43-52 (in Persian).

Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.

Samaee, S.M., Mojazi-Amiri, B., Hosseini-Mazinani, S.M., 2006. Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. *Folia Zoologica* 55, 323–335.

Thai, B.T., Burridge, C.P., Austin, C.M., 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio L.*) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture* 269, 174–186.

Ward, R.D., Woodwark, M., Skibinski, D.O.F., 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* 44, 213-232.

Weir, B.S., 1996. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts, 376 p.

Wright, S., 1978. Evolution and the genetics of populations. University of Chicago press, Chicago, 590 p.

Zareian, H., Esmaeili, H. R., Freyhof, J., 2016. *Capoeta anamisensis*, a new species from the Minab and Hasan Langhi River drainages in Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa* 4083, 126-142.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.

Zilberman, N., Reikhav, S., Hulata, G., Ron, M., 2006. High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapia's fin tissue. *Aquaculture* 255, 597–599.