

اثرات غلظت‌های زیرکشنده ۴- نونیل فنل بر تنوع ژنتیکی لارو نوس تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

علیرضا سلیمانی^۱، *اکبر وحدتی^۱، حسینعلی خوشباور رستمی^۲ و مسعود گلعلی‌پور^۳

^۱گروه زیست‌شناسی جانوری، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران،

^۲مرکز تحقیقات شیلات، منابع آب‌های داخلی، استان گلستان، گرگان، ایران،

^۳گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه پزشکی استان گلستان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۰

چکیده

نونیل فنل‌ها از ترکیباتی هستند که استفاده گسترده‌ای در صنایع پلاستیکی، شوینده‌ها، رزین‌ها و استایلیزها داشته و از طریق نشت فاضلاب‌ها وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. در پژوهش حاضر بررسی اثرات ۴- نونیل فنل بر روی تکامل لارو نوس تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در شرایط آزمایشگاهی نیمه‌پایدار انجام شد. تعداد ۴۸۰ قطعه لارو نوس یک‌روزه تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های شاهد، کنترل و دو غلظت زیرکشنده ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر محلول ۴- نونیل فنل در ۳ تکرار طی ۳ دوره ۱۰ روزه قرار گرفتند. ارزیابی تنوع ژنتیکی جنین تاس‌ماهی ایرانی در سه غلظت مذکور با استفاده از چهار جفت نشانگر ریزماهور (AfuG63، AfuG68b، AfuG241 و LS-68) صورت پذیرفت. کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه ژنی AfuG68b (۲ آلل) در نمونه شاهد و بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه ژنی AfuG63 (۴ آلل) در نمونه با غلظت ۷۰ میکروگرم بر لیتر از ۴- نونیل فنل مشاهده شد. کم‌ترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه ژنی AfuG68b (۰/۷۳۳) و بیش‌ترین میزان آن در جایگاه ژنی AfuG241 (۱) مشاهده شد. کم‌ترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه ژنی AfuG68b (۵۱۱/۰) مشاهده شد و بیش‌ترین میزان آن در جایگاه ژنی AfuG63 (۰/۶۴۴) دیده شد. با توجه به افزایش تعداد آلل مؤثر در جایگاه ژنی AfuG63 (۶/۳ آلل) و در غلظت ۷۰ میکروگرم نسبت به شاهد می‌توان گفت که در غلظت ۷۰ میکروگرم بر لیتر احتمال افزایش تنوع ژنتیکی در حضور این ترکیب وجود خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهور، هتروزیگوسیتی، *Acipenser persicus*

مقدمه

آن‌ها را مختل می‌کنند و اثرات سوء بر روی سلامت و باروری موجودات زنده می‌گذارند (Duis و همکاران، ۲۰۱۲). یکی از این نوع ترکیبات، آلکیل فنل‌ها هستند که از مشتقات نفتی محسوب می‌شوند؛ نونیل فنل از این دسته ترکیبات می‌باشد که از ابتدای دهه ۱۹۴۰ میلادی در سراسر دنیا استفاده می‌شود. پژوهش‌های

از ابتدای دهه ۱۹۹۰ به‌علت کاربرد بی‌رویه ترکیبات آروماتیک، بررسی اثرات آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی و خشکی آغاز گردیده است. این مواد با تداخل در عملکرد هورمون‌های طبیعی، کارکرد فیزیولوژیکی

* نویسنده مسئول: avahdatim@yahoo.com

رسوبات می‌باشد. زئوبیوتیک‌ها در طی رقابت با سایر مولکول‌های شیمیایی و لیگاندهای درون‌سلولی با ایجاد اختلال در روند ارسال سیگنال‌های رشد و نمو و یا تغییر در غلظت لیگاندها یا ویژگی‌های اتصال لیگاند، وارد عمل می‌شوند. این ترکیبات ممکن است که به دو طریق عمل کنند، یا این‌که به‌طور مستقیم اقدام می‌کنند و یا این‌که به دنبال یک فعالیت آنزیمی، منجر به تولید ترکیبات واسطه‌ای شده که کم و بیش برای ارگانسیم‌ها سمی هستند (Roderick, ۲۰۰۶). آلاینده‌های متنوعی در منابع آبی گزارش شده‌اند که قادر به تعامل با DNA سلول‌های زنده هستند و بنابراین سبب اثرات ژنوتوکسیک مانند تغییر آرایش بازهای DNA، شکست نوارهای DNA و ایجاد اتصالات عرضی زنجیره‌ها می‌شوند (Frenzilli و همکاران، ۲۰۰۴). امروزه روش‌های جدیدی برای ارزیابی میزان اثرات سمی ترکیبات شیمیایی بر روی ساختار ژنوم موجودات زنده در اکوسیستم‌های آبی شور و شیرین ارائه شده است این شیوه‌ها شامل تکنیک‌های مولکولی، بیوشیمیایی و سیتولوژیک است که به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای بررسی درجه نفوذ آلاینده‌ها روی ژنوم یک موجود زنده به‌کار می‌روند (Frenzilli و همکاران، ۲۰۰۴؛ Sayed و همکاران، ۲۰۱۳). آلکیل فنل‌هایی مانند نونیل فنل بعد از آن‌که از ترکیباتی مانند برخی از آفت‌کش‌ها، تراوش از ترکیبات پلاستیکی و تغییر شکل به‌صورت اتوکسیلات آلکیل فنل درآمدند، به‌تدریج در آب‌های هرز ظاهر می‌شوند (Liber و همکاران، ۱۹۹۹). در ارتباط با روند تجزیه آلکیل فنل‌ها اطلاعات چندانی منتشر نشده است اما در مورد ایزومرهای نونیل فنل اطلاعات مختلفی به‌دست آمده است که نشان‌دهنده فروپاشی و تجزیه آهسته‌تر انشعابات ایزومرهای آن

اخیر ثابت کرده است که نونیل فنل به همراه دیگر تخریب‌کننده‌های سیستم غدد داخلی در محیط زیست عمل می‌کند. این ترکیب می‌تواند منجر به تولید ویتلوزین و برخی از پدیده‌های دیگر مثل رشد لوله‌های اسپرمی، کاهش زنده ماندن اسپرم‌ها و گسترش اندام‌های جنسی بینابینی شود (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۱). علائمی که در اثر وجود بیس فنل A در جنین ماهی‌های آزاد دیده شده است، شامل ادم، اختلال عملکرد عضلات قلبی، لخته شدن خون، ناهنجاری‌های استخوان‌های جمجمه، کاهش رشد و در نهایت مرگ بوده است (Roderick, ۲۰۰۶). در ماهی کلمه^۱ تحت تأثیر فاضلاب‌های خانگی طی مراحل نوزادی در مدت ۵۰ تا ۲۰۰ روز پس از بازگشایی تخم‌ها^۲، حالت ایترسکس^۳ بروز می‌کند (Rodgers-Gray و همکاران، ۲۰۰۱). در ایران تعدادی از شهرها و کارخانجات صنعتی که در حاشیه دریای خزر قرار دارند، مقادیر زیادی از این گونه آلاینده‌ها را به این دریا می‌ریزند با وجود این هنوز تأثیرات ترکیبات آلکیل فنلی بر اکوسیستم‌های آبی چندان مورد توجه قرار نگرفته است. البته می‌توان به‌عنوان مثال به پژوهشی که در این زمینه در آب‌های ساحلی دریای خزر در منطقه تالاب بندرانزلی صورت گرفته است، اشاره کرد. در این مطالعه که توسط مرتضوی و همکاران (۲۰۱۲ میلادی) صورت گرفته است، میزان غلظت سه ترکیب آلکیل فنلی به‌نام‌های ۴- نونیل فنل، اوکتیل فنل و بیس فنل A به‌عنوان ترکیبات مختل‌کننده غدد درون ریز^۴ اندازه‌گیری شده است و مشخص شد که مقادیر این ترکیبات نونیل فنلی به‌ترتیب ۲۹، ۳/۴ و ۷ میکروگرم بر گرم وزن مرطوب

- 1- Rutilusrutilus
- 2- Hatching
- 3- Intersex
- 4- Endocrine Disrupting Chemicals

کار انجام شده در خصوص تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در معرض آلاینده‌ها، پژوهش Thomas و همکاران (۲۰۱۴) بوده است. آن‌ها اثرات آلاینده‌های آب‌های شیرین را بر روی یک گونه صدف^۲ در سطوح جمعیتی و مولکولی بررسی کردند. آن‌ها دو ایستگاه با دو جمعیت جدا از هم از صدف گونه مذکور در نظر گرفتند. یکی از ایستگاه‌ها دارای مواد آلاینده مختلف بود در حالی که ایستگاه دیگر فاقد هر گونه آلاینده بود. آن‌ها با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای به تجزیه و تحلیل تغییرات جمعیتی و آسیب‌های DNA بین دو جمعیت پرداختند. در مرحله بعد هر دو جمعیت را به صورت جداگانه به مدت ۳ روز در معرض فاضلاب در شرایط آزمایشگاهی قرار دادند و آسیب‌های DNA را برای ارزیابی میزان سازگاری آن‌ها با شرایط محیط دارای آلاینده بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که دو جمعیت از نظر ساختار ژنتیکی متفاوت هستند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ریزماهوره‌ها ثابت کرد که ایستگاه آلوده تحت تأثیر نوعی مانع ژنتیکی قرار دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از کاهش سازگاری ایستگاه آلوده نسبت به ایستگاه سالم باشد که خود در اثر رانش ژنتیکی اتفاق افتاده است یا احتمالاً افزایش مکانسیم‌های اصلاح DNA برای سازگار شدن جانور با محیط دارای آلاینده صورت گرفته است. با توجه به اهمیت بوم‌شناختی و اقتصادی گونه تاس‌ماهی ایرانی به‌عنوان یک گونه بومی و در خطر انقراض ساکن دریای خزر، گستردگی مناطق پراکنش آن، افزایش آلودگی روز افزون آب‌های داخلی و مطالعات ژنتیکی اندکی که در جهت بررسی جمعیت‌های مختلف آن در زیستگاه‌های گوناگون صورت گرفته است، مطالعه حاضر با هدف

در محیط می‌باشد (ECB, ۲۰۰۲). ترکیبات نونیل فنل به‌طور عمده به‌صورت اتوکسیلات نونیل فنل از طریق نشت ضایعات گیاهی و حدود ۹۰ درصد از طریق فاضلاب‌ها به محیط زیست وارد می‌شوند (Ahel و همکاران، ۱۹۹۴). گاهی نیز مشاهده شده است که نشت نونیل فنل از پلاستیک‌های دارای پی‌وی‌سی که در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی کاربرد دارند، به مواد غذایی صورت گرفته است. میزان آن‌ها ۱۰۰ نانوگرم بر گرم از ماده غذایی بوده است (Gilbert و همکاران، ۱۹۸۶).

یکی از مواردی است که ممکن است در معرض آلاینده‌ها اتفاق بیفتد، بروز تنوع ژنتیکی است؛ در این رابطه می‌توان به پژوهشی که توسط Knapen و همکاران (۲۰۰۶) انجام شده اشاره کرد، که در آن بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گویی^۱ با استفاده از هفت جایگاه نشانگر ریزماهوره‌ای در چهار منطقه نمونه‌برداری در پایین‌دست مناطق آلوده به کادمیوم و روی انجام شد و ثابت کردند که آلودگی مذکور بر ساختار و تنوع ژنتیکی این ماهی در مناطق مورد بررسی تأثیر معنی‌داری دارد یا در پژوهش دیگری Li و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی تنوع ژنتیکی شش جمعیت وحشی ماهی کپور معمولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره تعداد آلل مشاهده‌شده برای هر جایگاه را در دامنه ۷۲/۴-۰۴/۱ گزارش نمودند. ۱۱ جایگاه، انحراف از تعادل را نشان دادند و میانگین شاخص تمایز ژنتیکی (F_{st}) و جریان ژنی (N_m) را به ترتیب ۱۴۵/۰ و ۴۶۷/۱ تعیین نمودند. همچنین آن‌ها دلایلی مانند انزوای جغرافیایی، محیط زندگی، تنگنای ژنتیکی جمعیت‌ها و انتخاب طبیعی را از دلایل اصلی تأثیرگذار بر ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها دانستند. جدیدترین

2- Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)

1- Gobiogobio

بررسی میزان تأثیر غلظت‌های مختلف ۴- نونیل فنل بر تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های در معرض غلظت‌های زیرکشنده آلاینده مذکور با این فرض که تفاوت ژنتیکی بین جمعیت جنین تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل وجود دارد، با استفاده از نشانگرهای ریزماهورای^۱ انجام شد و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در اسفندماه ۱۳۹۲، تعداد ۴۸۰ قطعه لارو نوس یک‌روزه تاس‌ماهی ایرانی از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی واقع در آق‌قلا استان گلستان تهیه گردید و در شرایط آزمایشگاهی نیمه‌پایدار^۲ در ۴ تیمار و ۳ تکرار واقع در مرکز تحقیقات شیلات استان گلستان قرار گرفتند. ابتدا محلول مادر^۳ تهیه شد. برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم از ۴- نونیل فنل (شرکت ریدل)، در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر الکل مطلق (شرکت مرک) رقیق شد و به‌عنوان محلول مادر مورد استفاده قرار گرفت. دو غلظت زیرکشنده ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر از ۴- نونیل فنل برای تاس‌ماهی ایرانی در نظر گرفته شد؛ این دو غلظت زیرکشنده به کمک محلول مادر تهیه شدند. به تیمار شاهد^۴ تنها بیش‌ترین غلظت الکل مطلق، معادل با بیش‌ترین میزان ۴- نونیل فنل که در تیمارهای در معرض آلاینده استفاده می‌شوند (۷۰ میکروگرم بر لیتر) اضافه گردید و برای گروه کنترل نیز تنها آب خالص موجود در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان

خوایاری استفاده شد. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بوده است. هوادهی توسط پمپ هوا به‌صورت مداوم تا پایان آزمایش ادامه یافت. در مدت آزمایش روزانه pH، دما، غلظت اکسیژن و سختی آب اندازه‌گیری شده و هفته‌ای ۳ بار دوباره حدود ۹۵ درصد محلول‌های درون سطل‌ها تعویض شد و دقیقاً بعد از تعویض آب، همان غلظت‌های قبلی ۴- نونیل فنل به ظروف موردنظر اضافه گردید (Dreze و همکاران، ۲۰۰۰). نمونه‌برداری از لاروهای نوس در مدت ۳۰ روز طی سه مرحله انجام شد. مرحله اول قبل از تغذیه فعال (لاروهای ۸ الی ۹ روزه پس از بازگشایی تخم‌ها)، مرحله دوم حین تغذیه فعال (لاروهای ۱۰ الی ۲۰ روز پس از بازگشایی تخم‌ها) و مرحله سوم لاروهای ۲۱ الی ۳۰ روزه پس از بازگشایی تخم‌ها بوده است. در پایان هر مرحله مذکور، از هر کدام از نمونه‌های شاهد، کنترل و نمونه‌های در معرض ۴- نونیل فنل، لاروهای تلف شده خارج و جداگانه درون الکل مطلق قرار گرفتند. در ضمن تلفات لاروهای نوس روزانه نیز جمع‌آوری گردید و میانگین وزن و طول آن‌ها به‌ترتیب بر حسب میلی‌گرم و میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد. بر روی هر ظرف مشخصات نمونه که شامل تاریخ نمونه‌برداری، طول و وزن لارو نوس می‌باشد، نوشته شد. در این مطالعه تقریباً ۱۰ روز پس از تفریح تغذیه فعال آغاز شده است. تغذیه لاروها در این مرحله تا ۳۰ روز پس از تفریح و در ادامه روند آزمایش صورت گرفت. لاروهای نمونه‌برداری شده در هر پایان هر دوره ۱۰ روزه از رشد و نمو، درون الکل مطلق نگهداری شده و سپس برای استخراج DNA به آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلات گلستان منتقل گردیدند.

۱- Microsatellite
 ۲- Semi-static
 ۳- Stock
 ۴- Sham

AfuG241، LS-68 مطابق جدول ۱ استفاده شد. در پژوهش حاضر این پرایمرها از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. تکثیر با استفاده از ۴ پرایمر مذکور انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل (5341 Authorized thermal cycler) انجام گرفت. شرایط بهینه برای اجرای واکنش PCR در حجم ۵/۱۲ میکرولیتر مطابق جدول ۲ فراهم گردید. مستمریکس مورد استفاده از شرکت تکاپو زیست تهیه شد. پس از مرحله تکثیر نهایی، محصولات PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد (غیریونیزه) جداسازی شدند. از نشانگر (DNA Ladder 50bp fermentas) به‌عنوان شاخص برای تعیین اندازه آلی استفاده شد. ژل‌ها به روش نترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (بنبوزا و همکاران، ۲۰۰۶) و پس از تهیه تصویر آن‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD)، از نرم‌افزار Gel pro analyser برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید.

استخراج DNA: در این مرحله لاروهایی که در الکل مطلق فیکس شده بودند برای استخراج DNA استفاده شد. استخراج بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA از بافت‌های جانوری (شرکت ژین آل صفحه ۱۱ الی ۱۴) صورت گرفت. برای این منظور ابتدا یک لارو از هر یک از تیمارهای شاهد، کنترل، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر با توجه به وزن لاروهای هر مرحله، به کمک تیغ جراحی کاملاً خرد و سپس آن‌ها را به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل کرده و استخراج DNA انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده با افزودن آب مقطر دو بار تقطیر تا انجام ادامه مطالعات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و روش اسپکتروفتومتری ارزیابی شد (Sambrok و همکاران، ۱۹۸۷).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و الکتروفورز: به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جنین تاس‌ماهی ایرانی بر اساس مطالعه Moghim و همکاران (۲۰۱۳) از جایگاه‌های ژنی ریزماهورهای AfuG63، AfuG68b،

جدول ۱- توالی جایگاه‌های ژنی (پرایمری) ریزماهورهای تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

جایگاه ژنی	وزن (جفت باز)	تعداد ال	پرایمر	دمای اتصال
AfuG68b	۱۹۷-۱۵۳	۸/۱۱	F: AACAAATATGCAACTCAGCATAA R: AGCCCAACACAGACAATATC	۶۰
AfuG63	۱۲۷-۱۴۷	۵/۱۷	F: TCCTGGCTAGCGAACGAA R: CTTTAAATGGGGGACAGACTAT	۶۰
AfuG241	۲۳۰-۲۶۰	۱۴/۱۵	F: CAGAACATGCCGGGTGAGTA R: ATCCAGGGCTTGTCTTGTATTTTA	۶۵
LS-68	۲۴۰-۲۶۰	۱۴/۱۵	F: TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R: AGCCCAACACAGACAATATC	۵۴

جدول ۲- شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر

ماده	حجم محلول
Master Mix	۲۵/۶ میکرولیتر
آغازگر	۱ میکرولیتر
رقیق‌شده نمونه DNA	۵/۲ میکرولیتر
آب مقطر استریل	حجم مورد نیاز تا ۵/۱۲ میکرولیتر

نتایج

در تعداد آل‌های واقعی تغییرات قابل توجهی دیده نشد و کم‌ترین تعداد آن ۲ و بیش‌ترین آن ۳ در بین تمامی جایگاه‌های ژنی دیده می‌شود. کم‌ترین تعداد آل مؤثر در جایگاه ژنی AfuG68b (۸/۱ ال) در نمونه شاهد و بیش‌ترین تعداد آل مؤثر در جایگاه ژنی AfuG63 (۴ ال) در تیمار با ۷۰ میکروگرم بر لیتر از ۴- نونیل فنل مشاهده شد (جدول ۳).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آل‌های واقعی و تعداد آل‌های مؤثر در جایگاه‌های ریزماهورای و ماتریس شباهت از برنامه ژن الکس^۱ (Peakall و Smouse، ۲۰۱۲) استفاده گردید. برای مقایسه بین جمعیت تیمارهای مورد مطالعه از تست آنالیز مولکولی واریانس (AMOVA) در سطح ۱ درصد استفاده شد. تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی (Nei، ۱۹۸۷) نیز با استفاده از نرم‌افزار پاپ ژین^۲ (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) صورت گرفت.

جدول ۳- تعداد آل‌های واقعی (N_a) و مؤثر (N_e) ۴ لوکوس برای چهار تیمار کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل

LS-68		AfuG241		AfuG63		AfuG68b		غلظت ۴- نونیل فنل ($\mu\text{g/l}$)
Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	
۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۱/۸۰۰	۲/۰۰۰	کنترل
۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۱/۸۰۰	۲/۰۰۰	شاهد
۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۳/۰۰۰	۳/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۴۰
۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۲/۵۷۱	۳/۰۰۰	۳/۶۰۰	۴/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۷۰

1- GENALEX 6.5

2- Pop Gene

میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل به ترتیب ۰/۷۲۲، ۱/۰۰۰ و ۰/۸۳۳ به دست آمد. کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه ژنی AfuG68b (۰/۷۳۳) و بیشترین میزان آن در جایگاه ژنی AfuG241 (۱/۰۰۰) مشاهده شد. کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه ژنی AfuG68b (۰/۵۱۱) مشاهده شد و بیشترین میزان آن در جایگاه ژنی AfuG63 (۰/۶۴۴) دیده شد (جدول ۵).

دو شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) به عنوان معیاری برای بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی به کار می‌روند. اطلاعات به دست آمده مربوط به هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است. با توجه به جدول ۴، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در گروه‌های مختلف بین ۱/۰۰۰-۰/۵۰۰ قرار داشته است. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در غلظت‌های کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰

جدول ۴- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و مورد انتظار (H_e) برای تیمارهای کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر- نونیل فنل در هر جایگاه ژنی

LS-68		AfuG241		AfuG63		AfuG68b		غلظت ۴-نونیل فنل ($\mu\text{g/l}$)
H_e	H_0	H_e	H_0	H_e	H_0	H_e	H_0	
۰/۷۳۳	۰/۶۱۱	۰/۷۳۳	۰/۶۱۱	۰/۵۰۰	۱/۰۰۰	۰/۴۴۴	۰/۶۶۷	کنترل
۰/۷۳۳	۰/۶۱۱	۰/۷۳۳	۰/۶۱۱	۰/۵۰۰	۱/۰۰۰	۰/۴۴۴	۰/۶۶۷	شاهد
۰/۵۳۳	۱/۰۰۰	۰/۵۰۰	۱/۰۰۰	۰/۶۶۷	۱/۰۰۰	۰/۵۰۰	۱/۰۰۰	۴۰
۰/۶۱۱	۱/۰۰۰	۰/۶۱۱	۱/۰۰۰	۰/۷۲۲	۰/۶۶۷	۰/۴۴۴	۰/۶۶۷	۷۰

جدول ۵- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و مورد انتظار (H_e) در کل تیمارهای مورد مطالعه

H_e	H_0	جایگاه ژنی
۰/۵۱۱*	۰/۷۳۳*	AfuG68b
۰/۶۴۴*	۰/۸۶۷	AfuG63
۰/۵۶۷	۱/۰۰۰*	AfuG241I
۰/۵۵۶	۰/۸۶۷	LS-68

* حداکثر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و مورد انتظار (H_e)، * حداقل هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0) و مورد انتظار (H_e).

جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد بنابراین به‌خصوص در بین دو جمعیت شاهد و ۷۰ به‌علت این‌که مقدار F_{st} به‌میزان قابل‌توجهی از ۰/۰۵ بیش‌تر می‌باشد می‌توان جدایی جمعیت‌ها را نتیجه گرفت. متوسط F_{st} در این بررسی ۰/۲۶۸ به‌دست آمد.

مقدار F_{st} به‌عنوان معیاری برای جدایی جمعیت‌ها، بر اساس آزمون واریانس مولکولی و احتمال ۹۹ درصد بین جمعیت‌ها محاسبه گردید (جدول‌های ۶ و ۷). حداکثر میزان این شاخص بین دو جمعیت در دو غلظت شاهد و ۷۰ میکروگرم بر لیتر (۰/۰۹۴) به‌دست آمد. از آن‌جایی‌که F_{st} بیش‌تر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده

جدول ۶- میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس فراوانی برای تیمارهای کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل

غلظت	کنترل	شاهد	۴۰	۷۰
کنترل	۰/۰۷۵	۰/۰۸۰		
شاهد	۰/۰۸۰	۰/۰۸۲	-	-
۴۰	۰/۱۸۳	۰/۱۸۴	۰/۰۰۰	-
۷۰	۰/۰۸۵	۰/۰۹۴*	۰/۱۳۴	-

* حداکثر F_{st}

جدول ۷- میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس آنالیز AMOVA برای تیمارهای کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل

غلظت	کنترل	شاهد	۴۰	۷۰
کنترل	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		
شاهد	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	-	-
۴۰	۰/۴۱۸	۰/۴۱۷	۰/۰۰۰	-
۷۰	۰/۱۸۰	۰/۱۸۰	۰/۱۱۱	۰/۰۰۰

بر لیتر و کم‌ترین آن بین غلظت‌های ۴۰ و شاهد مشاهده گردید.

جهت محاسبه شباهت و فاصله ژنتیکی از معیار Nei (۱۹۸۷) استفاده شد. مطابق جدول ۸ بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین غلظت‌های ۴۰ و ۷۰ میکروگرم

جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی بین چهار تیمار کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۴- نونیل فنل

غلظت	کنترل	شاهد	۴۰	۷۰
کنترل	-			
شاهد		-		
۴۰	۰/۴۰۷	۰/۴۰۹*	-	
۷۰	۰/۵۸۰	۰/۵۸۲	۰/۷۱۱*	-

* بیش‌ترین فاصله ژنتیکی، کم‌ترین فاصله ژنتیکی.

بحث

اولین مرحله تدوین مدیریت راهبردی ذخایر آبیان در منابع آبی، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری و تخریب است. این مدیریت در صورتی که بر پایه روش‌های دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai و همکاران، ۲۰۰۶). هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌ها جزو پارامترهای مهم در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از لحاظ روبرو شدن با تغییرات محیطی می‌باشند (Frankham, ۲۰۰۸). آن‌ها ویژگی‌هایی هم‌چون قابلیت رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌سازند (Hakansson و Jensen, ۲۰۰۵). یکی از مقیاس‌های رایج محاسبه تنوع جمعیت به کمک اطلاعات حاصل از نشانگرهای ژنتیکی، تعداد متوسط آلل‌ها در هر جایگاه ژنی می‌باشد. تعداد آلل‌های واقعی در هر جایگاه می‌تواند تحت‌تأثیر اندازه نمونه قرار گیرد به طوری که با تعداد نمونه‌های مختلف، تعداد آلل‌های واقعی در هر جایگاه ریزماهورای به دست می‌آید. کاهش تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در سطوح جمعیتی می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد. آلل‌های مؤثر (N_e) بیانگر تعداد آلل‌هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌کنند (Lind و همکاران، ۲۰۰۹). براساس مطالعه Di Battista (۲۰۰۸) آلاینده‌ها می‌توانند هم باعث کاهش و هم افزایش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها شوند. این تغییرات که بر اساس میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ژنی اندازه‌گیری می‌شود، از یک سو با رانش ژنتیکی و انتخاب جهت‌دار و از سوی دیگر به کمک جهش و انتخاب هتروزیگوسیتی اتفاق می‌افتند. در پژوهش

حاضر کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده ۲ بوده است که در جایگاه ژنی AfuG68b برای غلظت شاهد دیده شد و بیش‌ترین آن ۴ بوده است که در جایگاه ژنی AfuG63 و در غلظت ۷۰ میکروگرم بر لیتر از ۴- نونیل فنل مشاهده شد. در ضمن بیش‌ترین تعداد آلل مورد انتظار در جایگاه ژنی AfuG63 در غلظت ۷۰ میکروگرم بر لیتر ۳/۶ بوده است بنابراین با توجه به پژوهش Di Battista (۲۰۰۸) تنوع ژنتیکی تحت‌تأثیر ترکیب ۴- نونیل فنل در بین جمعیت‌های شاهد و ۷۰ میکروگرم بر لیتر به چشم می‌خورد. هتروزیگوسیتی نیز شاخص بسیار مهمی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بوده و در مطالعات ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیاری دارد زیرا هر هتروزیگوت ناقل آلل‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع می‌باشد. با این وجود بررسی‌ها نشان داده که ارزیابی غنای اللی نسبت به هتروزیگوسیتی در مطالعات تنوع ژنتیکی دارای ارزش بالاتری بوده به طوری که هتروزیگوسیتی بیش‌تر مبتنی بر تغییرات تصادفی در فراوانی ژن‌ها می‌باشد (Diz و Presa, ۲۰۰۹). متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در این پژوهش ۰/۸۵۲ و متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۵۸۳ به دست آمده است. بر اساس مطالعه مقیم و همکاران (۲۰۱۳) پایین‌تر بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار می‌تواند نشان‌دهنده زاد و ولد درون‌جمعیتی و افزایش هموزیگوسیتی باشد. گرچه تخم‌ها و لاروهای استفاده شده در این پژوهش حاصل تکثیر مصنوعی می‌باشند اما بالاتر بودن متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این پژوهش نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار احتمالاً می‌تواند نشان‌دهنده تنوع ژنی در مولدها و جدایی جمعیت آن‌ها بوده باشد از این رو نمی‌توان با قاطعیت

بیش‌ترین فاصله ژنتیکی ۰/۷۱۱ بین تیمارهای ۷۰ و ۴۰ میکروگرم بر لیتر از ۴- نونیل فنل مشاهده شد و کم‌ترین آن ۰/۴۰۹ در بین تیمارهای شاهد و ۴۰ میکروگرم بر لیتر دیده شد. بنابراین می‌توان این گونه استنباط کرد که فاصله ژنتیکی بین تیمارهای ۴۰ و ۷۰ میکروگرم بر لیتر از نظر جریان ژنی زیاد است در حالی که در بین تیمارهای شاهد و ۴۰ میکروگرم بر لیتر کم‌تر می‌باشد. با توجه به این‌که تمامی لاروهای مورد بررسی در این پژوهش از مولدین یکسانی تهیه شده‌اند بنابراین احتمالاً وجود این فاصله‌های ژنتیکی می‌تواند تحت تأثیر غلظت‌های مختلف این آلاینده یا عوامل ناشناخته دیگری باشد. با توجه به آنالیز مولکولی واریانس و معیار $F_{st} (>0)$ ، فرض صفر در ارتباط با تنوع ژنتیکی که می‌گوید هیچ تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه در تیمارهای کنترل، شاهد، ۴۰ و ۷۰ وجود ندارد، رد می‌شود. از طرفی بر اساس پژوهش Saha و همکاران (۱۹۹۹) تشخیص محدوده غلظتی که در آن آلاینده بر روی یک گونه ماهی و یا زیستگاه آن خطری نداشته باشد، به مدت زمان ماندگاری آن ماده سمی در محیط بستگی دارد. به طوری که باید حداقل ۹۰ روز از غلظت‌های زیرکشنده آن ماده سمی در شرایط آزمایشگاهی بگذرد تا تأثیرات آن بر روی رشد و نمو جنین ماهی ثابت گردد. بر اساس پژوهش Gaffney (۱۹۷۶) غلظت نونیل فنل در فاضلاب‌های صنعتی طی مدت ۱۳۵ ساعت حدود ۴۵ درصد افت داشته است. البته این کاهش بستگی به دمای آب و غلظت اولیه آن ماده نیز دارد در ضمن در میان رسوبات رودخانه غلظت نونیل فنل ۳۶۴ تا ۵۱۰۰ مرتبه افزایش داشته است (Sandaram و Szeta، ۱۹۸۱) اما حساس‌ترین دوره رشد و نمو در ماهیان خاویاری،

آن را با اثرات غلظت این آلاینده مرتبط دانست. گاهی ممکن است که پخش شدن تخم و لاروهای پلاژیک گونه‌های مختلف جانوران آبی به کمک جریان آب سبب همگنی ژنتیکی^۱ جمعیت‌ها شود (Habib و همکاران، ۲۰۱۵) بنابراین در این پژوهش به علت آن‌که عمل تکامل تخم‌ها و رشد و نمو لاروها در شرایط مشابه و یکسان از نظر جریان آب و اکسیژن در انکوباتور انجام می‌شود، نمی‌توان تغییرات چندانی را در رابطه با ناهمگنی ژنتیکی مشاهده کرد. بر اساس معیار Wright (۱۹۸۷) F_{st} نشان‌دهنده تمایز بین جمعیت‌ها می‌باشد. کم‌تر بودن این معیار از ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز پایین بین دو جمعیت از یکدیگر است (Balloux و همکاران، ۲۰۰۲). این میزان که در پژوهش حاضر بر اساس آنالیز مولکولی واریانس و احتمال ۹۹ درصد بین چهار غلظت محاسبه شده است، بیش‌ترین میزان آن بین دو غلظت شاهد و ۷۰ میکروگرم بر لیتر (۰/۰۹۴) مشاهده شد که از ۰/۰۵ بیش‌تر می‌باشد، بنابراین می‌توان جدایی جمعیت‌ها را در دو غلظت شاهد و ۷۰ در نظر گرفت. وجود دامنه‌های متفاوت F_{st} را می‌توان با جریان ژنی، رانش ژنی و جدایی جغرافیایی مرتبط دانست (Li و همکاران، ۲۰۰۷). در پژوهش حاضر با توجه به جدول‌های ۶ و ۷ مقادیر F_{st} تغییرات قابل توجهی ندارند، بنابراین تغییرات ژنی چندان قابل توجه نمی‌باشد. با توجه به مطالعه Li و همکاران (۲۰۰۷) یکی از دلایل ایجاد زیرجمعیت‌ها جریان ژنی می‌باشد. انتظار می‌رود که در صورت عدم وجود جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها، تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها ایجاد گردد (عمومی‌خوزانی و همکاران، ۱۳۹۳) بر همین اساس

1- Genetic homogeneity

شرایط محیطی می‌تواند مرتبط باشد (Thomas و همکاران، ۲۰۱۴).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر هر چهار نشانگر ریزماهوره‌ای تأثیر و نفوذ قابل‌توجهی را از ۴- نونیل فنل روی جنین تاس‌ماهی ایرانی نشان نداده‌اند. شاید استفاده از غلظت‌های پایین این ماده، سبب شده که نتایج موردنظر نیاز به بازنگری بیش‌تر داشته باشند. بنابراین دورنمای پژوهش‌های آینده باید پاسخ به فرآیندهای ژنتیکی مختلف مانند انتخاب ژنتیکی و تنظیم تمایزی مکانیسم‌های اصلاح DNA در سازگار شدن با محیط مملو از آلاینده باشد. اهمیت پژوهش حاضر در استفاده از تکنیک‌های نشانگرهای ریزماهوره‌ای در سطوح مختلف تمایز جنینی و تنوع ژنتیکی آن بوده است که با حداقل زمان و هزینه به شکلی مؤثر انجام گرفت. امروزه از این تکنیک‌ها اغلب برای مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در مطالعات بوم‌شناسی^۱ استفاده می‌شود.

سپاسگزاری

از آقای دکتر خوشباور رستمی مدیریت مرکز تحقیقات آبزیان استان گلستان و همکاران ایشان که ضمن مشاوره ارزشمندشان از هیچ‌گونه کمکی طی انجام این پژوهش دریغ نکردند و قدردانی از حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز که در تأیید و انجام به موقع این پژوهش ما را یاری رساندند.

تحقق مراحل اولیه جنینی و تقسیم سلولی یعنی دوره ۶ تا ۱۰ ساعت پس از لقاح می‌باشد. پس از آن مرحله گاسترولا و تشکیل صفحه عصبی در مراحل اولیه جنینی جزو حساس‌ترین مراحل در تکامل جنینی تاس‌ماهیان است (کنت و همکاران، ۱۹۸۸). در ضمن تشکیل و تمایز اندام‌ها در دوره لاروی نارس بسیار شدید است این موضوع نه تنها موجب شکل‌گیری الگوهای رشد و نمو صفات مختلف شده بلکه سبب ظهور نواقص ساختمانی در شرایط نامساعد رشد و نمو می‌شود (دتلوف و همکاران، ۱۹۹۳) از این‌رو احتمالاً با توجه به محدودیت زمانی تکامل جنینی (۹ تا ۱۰ روز) در تاس‌ماهیان و مدت زمان ماندگاری ۴- نونیل فنل در طبیعت، ارتباط تغییرات ژنومی جایگاه‌های ژنی ریزماهوره‌ای با این ترکیب نیاز به کارهای بیش‌تری خواهد داشت. براساس پژوهش Williams و Oleksiak (۲۰۰۸) جایگاه‌های ژنی در مکان‌هایی که تجمع آلاینده‌ها وجود دارد می‌توانند تحت تأثیر انتخاب طبیعی قرار گیرند و مکانیسم مشابهی را در برابر مواد آلاینده نشان دهند. بر اساس همین پژوهش شاید جایگاه‌های ژنی در سازگاری‌های ژنوتیپی با محیط نقش داشته باشند و تعداد بسیار کمی از آن‌ها پاسخ سازشی کلی و غیراختصاصی به مواد آلاینده بدهند و احتمالاً در آینده بروز پلی‌مورفیسم بین جمعیت‌ها از نظر عملی مسئول افزایش مقاومت آن‌ها در برابر آلاینده‌ها باشد. تنگنای ژنتیکی با از دست رفتن برخی از ال‌ها در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای همراه خواهد بود که این مسأله می‌تواند در اثر تجمع زیاد فلزات سنگین، ترکیبات پلی‌آروماتیک و هیدروکربن‌ها در رسوبات کف رودخانه‌ها یا برکه‌ها ایجاد شود بنابراین تفاوت‌های ایجادشده در ژنتیک جمعیت‌ها با تغییرات

منابع

جمشیدی، ش.، کلباسی، م.، صادقی‌نژاد، م.، و یزدانی‌سادات، م.، ۱۳۹۱. تأثیر ماده شبه استروژنی نونیل فنل بر تولید و تغییرات میزان پروتئین ویتلوژنین پلاسماي خون تاس‌ماهی ایرانی نابالغ به‌عنوان یک نشانگر زیستی، نشریه علمی شیلات ایران، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۵، شماره ۴، صفحات ۳۷۷ تا ۳۸۸.

دتلایف، ت.آ.، گینس‌برگ، آ.اس.، و اشمال‌هوزن، او.ال.، ۱۹۹۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. مترجمان: ر. محمد نظری، ح. عبدالحی و ن. مخدومی، ۱۳۸۵. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. انتشارات شیلات ایران. ۴۲۲ صفحه.

عمومی‌خوزانی، ا.، شعبانی، ع.، و کلنگی، ح.، ۱۳۹. مقایسه ساختار ژنتیکی سگ‌ماهی جویباری (Nalbant and Paraschisturanielsen (Bianco, 1998 در رودخانه شاپور (استان فارس) و رودخانه‌های دالکی و مند (استان بوشهر) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

کنت، ف.، دوروشف، اس.، لوتس، پ.، و استرنج، ا.، ۱۹۸۸. دستورالعمل تکثیر مصنوعی تاس‌ماهی سفید و کاربرد آن برای دیگر تاس‌ماهیان آمریکای شمالی، ترجمه: امانی، م.، فاطمی، م.، ۱۳۸۷، مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی.

- Ahel, M., Giger, W., and Koch, M., 1994. Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment 1. Occurrence and Transformation in Sewage-Treatment. *Water Research*, 28 (5), 1131-1142.
- Balloux, F., Brunner, H., and Lugon-Moulin, N., 2002. The Estimate of Population Differentiation with Microsatellite Markers. *Molecular Ecology*, 11, 321-323.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., and Mergeai, G., 2006. Optimization of the Reliable, Fast, Cheap and Sensitive Silver Staining Method to Detect SSR Markers in polyacrylamide Gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10, 77-81.
- Di Battista, J.D., 2008. Patterns of Genetic Variation in Anthropogenically Impacted Populations, *Conservation Genetics*, 9 (1), 141-156.
- Diz, P.A., and Presa, P., 2009. The Genetic Diversity Pattern of *Mytilus Alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian Estuaries). *Aquaculture*, 287, 278-285.
- Dreze, V., Monad, G., Cravedi, J.P., Biagianti-Risbourg, S., and Le Gac, F., 2000. Effects of 4-Nonylphenol on Sex Differentiation and Puberty in Mosquitofish (*Gambusia Holbrooki*), *Ecotoxicology*, Kluwer Academic Publishers, pp. 93-103.
- Duis, K., Scheider, J., Warnrcke, D., Van der veen, A., Coors, A., Knacker, T., and Schafers, C., 2012. Environmental Research of the Federal Ministry for the environment Nature Conservation and Nuclear Safety, Federal Environment Agency Project no. 3710 63 416, 174p.
- Frankham, R., 2008. Genetic Adaptation to Captivity in Species Conservation Programs. *Molecular Ecology*. 17, 325-333.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Bolognesi, F.L., and Sturve, J., 2004. DNA Damage in Eelpout (*Zoarces Viviparous*) from Goteborg Harbour, *Mutation Research*, 552, 187-195.
- Gaffney, P.E., 1976. Carpet and Rug Industry Case Study II: Biological Effects. *J. Water Poll. Control Fed.* 48, 2731-2737.

- Gilbert, J., et al., 1986. Compositional Analysis of Commercial PVC Bottles and Studies of Aspects of Specific and Overall Migration into Foods and Stimulants. Food Additives and Contaminants. 3 (2), 133-144. In: Bergstedt, O., N. Paxéus and H. Rydberg, Miljöförörensningar i Dricksvatten- Inledande Studie Exemplifierad Med Alkylfenoler, Ftalater Och PAH, VAV AB, Editor. 1999.
- Habib, K.A., and Islam, M.N., 2015. Genetic Variation and Population Structure of Spottybelly Greenling (*Hexagrammus Grammus*) in Korea Coasts Analyzed Dna Markers Emphasizing on Microsatellites, Inter. J. Aqua. Biol. 3 (3), 183-190.
- Hakansson, J., and Jensen, P., 2005. Behavioural and Morphological Variation between Captive Populations of Red Junglefowl (*Gallus Gallus*) – Possible Implications for Conservation. Biological Conservation, 122, 431-439.
- Knapen, D., Taylor, M., Blust, R., and Verheyen, E. 2006. Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellite Loci in the Gudgeon, *Gobiogobio* (Cyprinidae). J. Mol. Ecol. pp. 387-389.
- Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, Z., and Liang, L. 2007. Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.) Populations. Genetics and Genomics, 34, 984-993.
- Liber, K., Knuth, M.L., and Stay, F.S., 1999. An Integrated Evaluation of the Persistence and Effects of 4-Nonylphenol in an Experimental Littoral Ecosystem. Environmental Toxicology and Chemistry, 18 (3), 357-362.
- Lind, C.U., Evans, B.S., Knauer, J., Taylor, J.J.U., and Jerry, D.R., 2009. Decreased Genetic Diversity and a Reduced Effective Population Size in Cultured Silver-Lipped Pearl Oysters (*Pinctada Maxima*). Aquaculture, 286, 12-19.
- Moghim, M., Javanmard, A., Pourkazami, M., Tan, G.S., Panandam, M.J., Kor, D., and Laloei, F., 2013. Application of Microsatellite Markers for Genetic Conservation and Management of Persian Sturgeon (*Acipenser Persicus*, Brodin, 1897) in the Caspian Sea, J. Appl. Ichth. 29, 696-703.
- Nei, M., 1987. Genetic Distance and Molecular Phylogeny. N. Ryman and F. Utter (Eds.), Population Genetics & Fishery Management. University of Washington. pp. 193-215.
- Peakall, R., and Smouse, P.E., 2012. GENALEX 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Bioinformatics. 28, 2537-2539.
- Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldoock, M.J., Sumpter, J.P., and Tyler, C.R., 2001. Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development Environ. Sci. Technol. 35, 462-470.
- Roderick, N.F., 2006. The physiology and Toxicology of Salmonid Eggs and Larvae in Relation to Water Quality Criteria (A Review), Aqua. Toxicol. J. pp. 337-354.
- Saha, N.C., Bhunia, F., and Kaviraj, A., 1999. Toxicity of Phenol to Fish and Aquatic Ecosystems. J. Springer, Bull. Environ. Contam. Toxicol. pp. 195-206.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. Electroporesis of RNA Through Gels Containing Formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press. pp. 743-745.
- Sayed, A.E.D.H., Mahmoud, U.M., and Mekkawy, I.A., 2013. Genotoxicity Induced by 4-Nonylphenol in Adult and Embryos of *Clarias Gariepinus*, Global advanced research J. Environ. Sci. Toxicol. 2 (3), 107-118.
- Sundaram, K.M.S., and Szeto, S., 1981. The Dissipation of Nonylphenol in Stream and Pond Water Under Simulated Field Conditions. J. Environ. Sci. Health (Part B) B. 16 (6), 767-776.
- Thai, B.T., Pham, T.A., and Austin, G.M., 2006. Genetic Diversity of Common Carp in Vietnam Using Direct Sequencing and SSCP Analysis of the Mitochondrial DNA Control Region. Aquaculture. 258, 228-240.

- Thomas, E.G., Srut, M., Stambuk, A., Klobucar, G.I.V., Sietz, A., Griebeler, 2014. Effects of Freshwater Pollution on the Genetics of Zebra Mussels (*Dreissenapolyomorpha*) at the Molecular and Population Level, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 795481, 11p.
- Williams, M., and Oleksiak, M.F., 2008. Signatures of Selection in Natural Populations Adapted to Chronic Pollution, *EMC, evolutionary biology*, 8, 282.
- Wright, S., 1987. *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: variability within and among natural populations* University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., and Boyle, T., 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window-bases Freeware for population Genetic Analysis. Retrieved from: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.