ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۴۳۴- ۴۲۳

# مقایسه ساختار ژنتیکی سه جمعیت ماهی خیاطه *Alburnoides bipunctatus* (Bloch 1782) خیاطه در استان گلستان با نشانگر ریزماهواره

# Analysis of the population genetics of three Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) populations in Golestan Province using microsatellite marker

لادن جهانگیری*[۱]، علی شعبانی[۱]، حمیدرضا رضایی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

**Jahangiri L*[1], Shabany A[1], Rezaei HR[1]**

1. MSc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ladan_Jahangiri@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۸ – تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

## چکیده

**ماهی خیاطه (*Alburnoides bipunctatus*) گونه‌ای رودخانه‌ای است که در حوزه جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتا خوبی برخوردار می‌باشد اما در بسیاری از آب‌های اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد. تا کنون هیچ گونه مطالعه‌ای در زمینه تنوع ژنتیکی این گونه صورت نگرفته است. در این تحقیق، برای بررسی ساختار جمعیتی ماهی خیاطه در رودخانه‌های تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال استان گلستان تعداد ۸۴ نمونه (۲۸ نمونه از رودخانه تیل‌آباد، ۲۸ نمونه از رودخانه شیرآباد و ۲۸ نمونه از رودخانه کبودوال) جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی شد. متوسط ناخالصی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۹۳ و ۰/۸۱۷ به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۸ درصد) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. متوسط آماره $F_{st}$، ۰/۰۲۴ به دست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین رودخانه‌های مورد بررسی است. در بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، دو جایگاه در جمعیت تیل‌آباد و دو جایگاه در جمعیت کبودوال در تعادل بوده و سایر جایگاه‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف معنی‌داری داشتند ($P \leq ۰/۰۵$). طبق دندروگرام UPGMA ترسیم‌شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی، جمعیت‌های رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد از هم جدا نشده اما احتمالا جمعیت رودخانه کبودوال از جمعیت دو رودخانه دیگر جدا شده است.**

واژه‌های کلیدی

تیل‌آباد
ریزماهواره
شیرآباد و کبودوال
*Alburnoides bipunctatus*
DNA

Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش دارند (Kirpichnikov 1972). ماهی خیاطه با نام علمی *Alburnoides bipunctatus* (Bloch 1782) یکی از گونه‌های خانواده کپور ماهیان موجود در ایران می‌باشد. این ماهی از گونه-هایی است که در سراسر اروپای مرکزی، سواحل اقیانوس اطلس تا دریای خزر و نواحی شرقی گسترش یافته‌است (Ladiges and Vogt 1979). این ماهی دارای بدنی برآمده، دهان میانی و شکاف دهان افقی است. دندان حلقی آن دو ردیفی و به فرمول ۲.(۴)۵-۲,۵ می‌باشد. صفت مشخص این گونه، خط جانبی سیاه رنگ آن است. به هنگام جفت‌گیری و تخم‌ریزی در روی خط جانبی نوارهای تیره‌رنگی که از پیش‌سرپوش آبششی تا قاعده باله دمی امتداد دارد، ظاهر می‌شود (Vosoughi and Mostajir 2001). حداکثر اندازه آن ۱۵ سانتی‌متر (بیشترین فراوانی طولی آن از ۱۱۰-۱۰۰ میلی‌متر) است (Abdoli 2000). Ghorbani et al. (2012) در بررسی پراکنش و فراوانی ماهی خیاطه در نهرهای تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال، مشاهده کردند که بیشترین فراوانی ماهی خیاطه در نهر کبودوال در طبقه طولی ۹۰-۸۰ میلی‌متر، در نهر شیرآباد در طبقه ۱۰۰-۹۰ میلی‌متر و در نهر تیل‌آباد در طبقه طولی ۶۰-۵۰ میلی‌متر قرار دارد. همچنین بیان کردند فراوان‌ترین طبقه سنی این ماهی در نهر تیل‌آباد مربوط به ماهیان صفر ساله و در نهر کبودوال و شیرآباد مربوط به ماهیان ۳ ساله می‌باشد. Zivkovic and Jovanovic (2011) صفات مورفومتریک و مریستیک را در ماهیان خیاطه رودخانه نیساوا حوزه دانوب را مورد بررسی قرار داده و بیان کردند که صفات مورفومتریک تحت تاثیر زیستگاه‌های مختلف، متنوع می‌باشد که در این میان بیشترین تفاوت‌ها در صفاتی چون فاصله پشت چشمی، ارتفاع باله مخرجی، حداقل ارتفاع بدن و طول پیش باله مخرجی مشاهده شد. به توجه به ویژگی‌های مریستیک، تعداد شعاع‌های نرم باله مخرجی در مناطق مختلف نمونه‌برداری متفاوت بیان شد. دندان حلقی ماهیان خیاطه نیز در زیستگاه‌های متنوع، متفاوت بود. شرایط زندگی ماهی خیاطه در اروپا به علل مختلف نامناسب بوده، به‌طوری‌که در بسیاری از آب‌های اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد (Kirchhofer 1997)، اما در ایران و در حوزه‌های جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتا خوبی برخوردار می‌باشد (Ahmadi et al. 2011). مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان دریای خزر نشان‌دهنده این واقعیت است که بسیاری از ماهیان روند گونه‌زایی را طی کرده و ریزفرایند ایجاد جمعیت‌ها همچنان ادامه دارد به طوری‌که گونه‌های خزری و دریای سیاه- خزری، زیرگونه‌ها و جمعیت‌هایی را در مناطق مختلف دریای خزر تشکیل داده‌اند (Rahmani 2006). Azizi et al. (2011) در بررسی اثر سد بر تنوع و تمایز ریختی ماهی خیاطه در رودخانه تجن ساری بیان کردند، برای اطمینان از تمایز جمعیت‌های این ماهی و به‌دست آوردن نتایج قطعی‌تر نیاز به مطالعات مولکولی می‌باشد، همچنین Ahmadi et al. (2011) در بررسی برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران بیان کردند که برای بررسی کامل‌تر جدایی جمعیتی، بایداز روش‌های نوین ژنتیکی استفاده کرد. نشانگرهای ریزماهواره عبارتند از توالی‌های کوتاهی از DNA به طول کمتر از ۶ نوکلئوتید که این توالی‌های کوتاه به صورت پشت سر هم و بدون انقطاع و یا انفصال در ژنوم اکثر موجودات تکرار می‌شوند. با توجه به مطالعات وسیع انجام شده مشخص شد که ریزماهواره‌ها در اکثر موجودات وجود دارند و در همه آن‌ها تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از خود نشان داده‌اند. یکی از کاربردهای ریزماهواره‌ها جداسازی جمعیت‌ها و ذخایر مختلف متعلق به یک گونه است (Hancock 2000). در این تحقیق سعی شد با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه در رودخانه-های تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال استان گلستان پرداخته شود.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

تعداد ۸۴ نمونه ماهی خیاطه، از رودخانه‌های تیل‌آباد (استان گلستان، ۳۶ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی)، شیرآباد (استان گلستان، ۳۷ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی) و کبودوال (استان گلستان، ۳۶ درجه شمالی و ۵۴ درجه شرقی) (شکل۱) در مهر



Archive of SID
www.SID.ir

سال ۱۳۹۰ صید شد (۲۸ نمونه از هر رودخانه). نمونه‌برداری‌ها به صورت کاملا تصادفی انجام شد. حدود دو گرم از باله پشتی هر ماهی جداسازی و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۵درصد نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم انجام پذیرفت (Hillis et al. 1996). DNA استخراج‌شده پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام مطالعات در فریزر ۲۰- نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد (Sambrook et al. 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز

۶ جایگاه ژنی ریزماهواره LleA-071، LleC-090، Rser10، Ca3 (Dubut et al. 2010)، MFW2 و MFW17 (Crooijmans et al. 1997) از مطالعات انتشار یافته انتخاب شدند (جدول۱). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای اتصال برای هر یک از آن‌ها به‌دست آمد. تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تگ DNA پلیمراز، بافر 1X PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم انجام گرفت. چرخه دمایی برای هر جایگاه ژنی عبارت بود از : یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ چرخه ۹۴ درجه‌ای به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، درجه حرارت اتصال اختصاصی هر آغازگر (جدول۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه (بسط) و یک چرخه ۷۲ درجه‌ای به مدت ۳ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Bassam et al. 1991) و پس از تهیه تصویر آن‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (شکل‌های ۷-۲)، از نرم‌افزار Gel pro analyzer 6.0 برای محاسبه طول قطعات استفاده شد. در تصاویر، نمونه‌های ۲۸-۱ مربوط به رودخانه تیل‌آباد، نمونه‌های ۵۸-۳۱ مربوط به رودخانه شیرآباد و نمونه‌های ۸۸-۶۱ مربوط به رودخانه کبودوال هستند.

تجزیه آماری

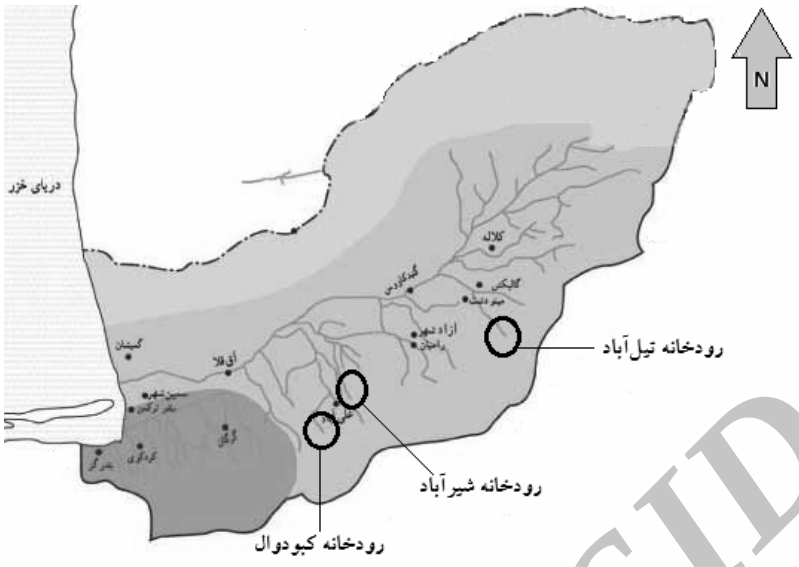
ارزیابی تعداد الل در هر جایگاه ژنی، ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.3 انجام شد (Peakall and Smouse 2006). برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر ناخالصی مشاهده شده (Ho)، مورد انتظار (He) و تنوع اللی از آزمون ویلکاکسون غیرپارامتریک در نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد (Zar 1999). برای تنظیم سطح معنی‌داری تست‌های تکرار شونده ضریب تصحیح بونفرونی استفاده شد (Rice 1989). به منظور تعیین آماره درون‌آمیزی ($F_{is}$) و سطح معنی‌داری آن از نرم‌افزار FSTAT 2.9.3 استفاده شد. با استفاده از معیار $F_{st}$ و تحت تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نرم‌افزار GenAlex شیوه توزیع تنوع مشاهده شده و همچنین میزان تمایز بین مناطق محاسبه شد. مقادیر فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei 1978) نیز محاسبه شد. تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی براساس مدل اللی بی‌نهایت ($F_{st}$) و مدل جهش پله‌ای ($R_{st}$) با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی بسته نرم‌افزاری GenAlex انجام شد. دندروگرام از مقادیر عدم تشابه ژنتیکی طبق روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (Software, Setauket, NY, USA Exeter) ترسیم شد.

## نتایج و بحث

در این تحقیق از ۶ جایگاه ژنی استفاده شد که همگی چندشکلی را نشان دادند. کمترین تعداد الل در جایگاه Rser10 (۸ الل) و بیشترین تعداد الل در جایگاه LleC-090 (۳۰ الل) مشاهده شد. پایین‌ترین میزان الل‌های موثر در جایگاه Rser10 (۴/۹۷) و بالاترین میزان آن در جایگاه LleC-090 (۲۳/۰۵) مشاهده شد (جدول۲). تعداد متوسط الل‌های مشاهده شده و موثر در رودخانه تیل‌آباد به ترتیب ۱۶/۸۳۳ و ۱۱/۳۲۱، در رودخانه شیرآباد به ترتیب ۱۶/۱۶۷ و ۱۱/۱۸۶ و در رودخانه کبودوال به ترتیب ۱۳/۰۰۰ و ۹/۴۲۸ به دست آمد. متوسط ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار در رودخانه تیل‌آباد به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۸۹، در رودخانه شیرآباد به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۹۰ و در رودخانه کبودوال



Archive of SID
www.SID.ir




شکل ۱- موقعیت جغرافیایی رودخانه‌های تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال (استان گلستان، ایران)

جدول۱- توالی و ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ریزماهواره‌ای ماهی خیاطه

| جایگاه ژنی | کد دست‌یابی در بانک ژن | توالی | تعداد الل | اندازه اللی (bp) | دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) |
|---|---|---|---|---|---|
| LleA-071 | FJ601719 | F: 5' GTCTTAGATTGTGTAGCGGG 3'<br>R: 5'ACTTCAGTTACTAAGAGATTAGTGA 3' | ۱۸ | ۳۱۲-۴۴۴ | ۵۰ |
| LleC-090 | FJ601722 | F: 5' TCAGACACAACTAACCGACC 3'<br>R: 5' GGCGCTGTCCAGAACTGA 3' | ۲۲ | ۱۵۲-۳۸۴ | ۵۵ |
| Rser10 | AJ312850 | F: 5' TGCGTAATCGTGAAGCGGTG 3'<br>R: 5' GCCACTAAAGCGCAGAAGCC 3' | ۱۱ | ۱۷۶-۲۴۸ | ۶۰ |
| Ca3 | AF277575 | F: 5' GGACAGTGAGGGACGCAGAC 3'<br>R: 5' TCTAGCCCCCAAATTTTACGG 3' | ۱۷ | ۲۴۸-۳۶۴ | ۵۸ |
| MFW2 | EF144119 | F: 5' CACACCGGGCTACTGCAGAG3'<br>R: 5' GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC 3' | ۱۱ | ۱۸۰-۲۳۶ | ۶۱ |
| MFW17 | FJ491399 | F: 5' CTCAACTACAGAGAAATTTCATC 3'<br>R: 5' GAAATGGTACATGACCTCAAG 3' | ۱۲ | ۱۷۶-۲۲۸ | ۵۰ |

به ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۸۸ به دست آمد. همچنین در جمعیت تیل‌آباد در جایگاه Rser10 ۳ الل اختصاصی، در جمعیت شیرآباد در جایگاه LleA-071 یک الل اختصاصی و در جمعیت کبودوال در جایگاه Ca3 یک الل اختصاصی مشاهده شد.

میانگین ناخالصی مشاهده شده ۰/۸۱ به دست آمد که بالاترین میزان آن (۱/۰۰) در جایگاه Rser10 (رودخانه تیل‌آباد) و در جایگاه LleA-071 (رودخانه کبودوال) و پایین‌ترین میزان آن (۰/۳۲) در جایگاه Ca3 (رودخانه کبودوال) مشاهده شد. همچنین میانگین ناخالصی مورد انتظار ۰/۸۹ به دست آمد که بالاترین میزان آن (۰/۹۵) در جایگاه LleC-090 (رودخانه تیل‌آباد) و پایین ترین میزان آن (۰/۷۹) در جایگاه Rser10 (رودخانه کبودوال) مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری هم از نظر تنوع اللی و ژنی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد ($P>$ ۰/۰۵). در بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، در دو جایگاه در جمعیت



Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های ماهی خیاطه در استان گلستان

| جایگاه ژنی | | LleA-071 | LleC-090 | Rser10 | Ca3 | MFW2 | MFW17 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منطقه | پارامتر | | | | | | |
| | Na | ۱۹/۰۰ | ۳۰/۰۰ | ۱۵/۰۰ | ۱۷/۰۰ | ۱۱/۰۰ | ۹/۰۰ |
| | Ne | ۱۰/۰۵ | ۲۳/۰۵ | ۸/۶۱ | ۱۲/۶۴ | ۶/۶۱ | ۶/۹۳ |
| تیل‌آباد | Ho | ۰/۸۵ | ۰/۹۶ | ۱/۰۰ | ۰/۵۰ | ۰/۸۵ | ۰/۷۵ |
| | He | ۰/۹۰ | ۰/۹۵ | ۰/۸۸ | ۰/۹۲ | ۰/۸۴ | ۰/۸۵ |
| | $F_{is}$ | ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۴۵ | ۰/۰۰ | ۰/۱۲ |
| | HWS | ns | ns | *** | *** | *** | ** |
| | Na | ۲۰/۰۰ | ۲۳/۰۰ | ۱۱/۰۰ | ۱۶/۰۰ | ۱۳/۰۰ | ۱۴/۰۰ |
| | Ne | ۱۵/۲۲ | ۱۴/۹۳ | ۷/۳۹ | ۱۱/۶۱ | ۸/۶۱ | ۹/۳۳ |
| شیرآباد | Ho | ۰/۹۶ | ۰/۸۵ | ۰/۷۵ | ۰/۶۰ | ۰/۹۶ | ۰/۹۲ |
| | He | ۰/۹۳ | ۰/۹۳ | ۰/۸۶ | ۰/۹۱ | ۰/۸۸ | ۰/۸۹ |
| | $F_{is}$ | ۰/۰۰ | ۰/۰۸ | ۰/۱۳ | ۰/۳۳ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| | HWS | ns | *** | *** | *** | *** | ns |
| | Na | ۱۵/۰۰ | ۱۳/۰۰ | ۸/۰۰ | ۱۹/۰۰ | ۹/۰۰ | ۱۴/۰۰ |
| | Ne | ۹/۹۸ | ۷/۷۲ | ۴/۹۷ | ۱۵/۸۳ | ۷/۷۲ | ۱۰/۳۱ |
| کبودوال | Ho | ۱/۰۰ | ۰/۹۲ | ۰/۶۴ | ۰/۳۲ | ۰/۹۶ | ۰/۸۵ |
| | He | ۰/۹۰ | ۰/۸۷ | ۰/۷۹ | ۰/۹۳ | ۰/۸۷ | ۰/۹۰ |
| | $F_{is}$ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۱۹ | ۰/۶۵ | ۰/۰۰ | ۰/۰۵ |
| | HWS | ns | *** | ** | *** | *** | ns |

Na) تعداد الل‌های مشاهده شده؛ Ne) تعداد الل‌های موثر؛ Ho) ناخالصی مشاهده شده؛ He) ناخالصی مورد انتظار؛ HWS) تست احتمال هاردی- واینبرگ؛ $F_{is}$) شاخص درون‌آمیزی. n.s، *، ** و *** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح پنج، یک و یک دهم درصد

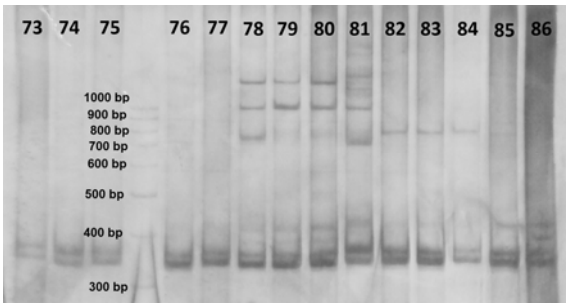
تیل‌آباد (LleA-071 و LleC-090) و دو جایگاه در جمعیت کبودوال (LleA-071 و MFW17) تعادل برقرار بوده و در سایر جایگاه‌ها انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شد ($P \leq ۰/۰۵$)، در حالی که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، ۶ مورد از ۱۸ آزمون مورد بررسی (۶ جایگاه ژنی × ۳ منطقه) در تعادل قرار گرفتند ($P < ۰/۰۰۸۳$). متوسط آماره درون-آمیزی ($F_{is}$) ۰/۰۸۲ را نشان داد. میزان آماره تمایز ($F_{st}$) بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه‌برداری محاسبه شد (جدول۳) که بیشترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل‌آباد و کبودوال (۰/۰۲۱) و کمترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد (۰/۰۱۶) می‌باشد. جریان ژنی نیز بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه-برداری و مقایسه جمعیت‌ها محاسبه شد (جدول۴) که بیشترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد (۱۸/۶۱۰)، و کمترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل‌آباد و کبودوال (۱۰/۵۵۸) بوده است. در جدول ۵ میزان $F_{st}$ و جریان ژنی محاسبه شده در سطح جایگاه‌های ژنی آورده شده است، متوسط آماره $F_{st}$ در این بررسی ۰/۰۲۴ و متوسط جریان ژنی ۱۱/۹۱ به دست آمد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در جدول ۶ آورده شده است. مقدار $F_{st}$ از طریق تجزیه واریانس مولکولی ۰/۰۱۸ به دست آمد. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸ درصد) درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (دو درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد (شکل۸).

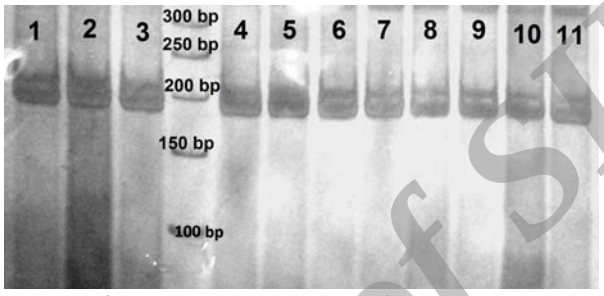
جدول ۷ میزان $R_{st}$ محاسبه شده برای مناطق نمونه‌برداری را نشان می‌دهد که بیشترین مقدار این آماره بین رودخانه‌های تیل‌آباد و کبودوال (۰/۲۷۹) و کمترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل‌آباد و



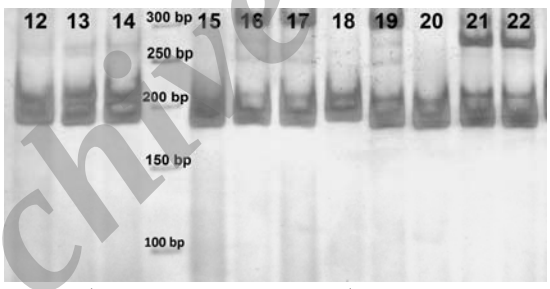
Archive of SID
www.SID.ir



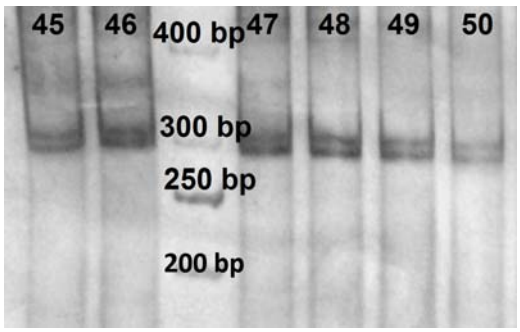

شکل ۲- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر LleA-071 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه کبودوال)




شکل ۳- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر LleC-090 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه تیل‌آباد)




شکل ۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر Rser10 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه تیل‌آباد)




شکل ۵- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر Ca3 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه شیرآباد)

Archive of SID


www.SID.ir

جدول ۳- میزان $F_{st}$ محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه‌برداری ماهی خیاطه استان گلستان

| مناطق نمونه‌برداری | تیل‌آباد | شیرآباد | کبودوال |
|---|---|---|---|
| تیل‌آباد | ۰/۰۰۰ | | |
| شیرآباد | ۰/۰۱۶ | ۰/۰۰۰ | |
| کبودوال | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۱۸ | ۰/۰۰۰ |

جدول ۴- میزان $N_m$(جریان ژنی) محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه‌برداری ماهی خیاطه در استان گلستان

| مناطق نمونه‌برداری | تیل‌آباد | شیرآباد | کبودوال |
|---|---|---|---|
| تیل‌آباد | ۰/۰۰۰ | | |
| شیرآباد | ۱۸/۶۱۰ | ۰/۰۰۰ | |
| کبودوال | ۱۰/۵۵۸ | ۱۴/۵۸۶ | ۰/۰۰۰ |

جدول ۵- میزان تمایز ($F_{st}$) در سطح ۶ جایگاه ژنی مورد استفاده ماهی خیاطه در استان گلستان

| جایگاه ژنی | LleA-071 | LleC-090 | Rser10 | Ca3 | MFW2 | MFW17 | میانگین |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $N_m$ | ۱۴/۵۵۲ | ۸/۰۷۵ | ۵/۶۴۳ | ۱۹/۰۶۱ | ۱۰/۷۰۵ | ۱۳/۴۴۲ | ۱۱/۹۱ |
| $F_{st}$ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۲۳ | ۰/۰۱۸ | ۰/۰۲۴ |

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در $F_{st}$ مربوط به نمونه‌برداری ماهی خیاطه در استان گلستان

| | df | SS | MS | Est.var. | % | Stat | Value | Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| بین جمعیت‌ها | ۲ | ۱۰/۹۷ | ۵/۴۸ | ۰/۰۴ | دو درصد | _ | _ | _ |
| درون جمعیت‌ها | ۱۶۵ | ۴۴۹/۹۴ | ۲/۷۲ | ۲/۷۲ | ۹۸درصد | $F_{st}$ | ۰/۰۱۸ | ۰/۰۱۰ |

Df) درجه آزادی؛ SS) مجموع مربعات؛ MS) انحرافات میانگین مربع؛ Prob) معنی‌دار بودن انحراف پس از ۹۹ جایگزینی تصادفی

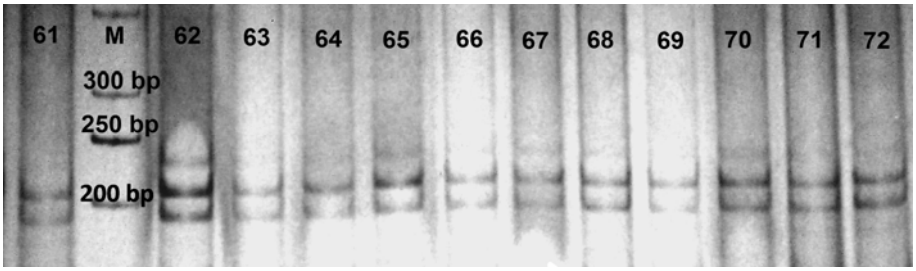
شیرآباد (۰/۰۵۱) محاسبه شده است، که با نتایج به دست آمده از آماره $F_{st}$ مطابقت دارد.

جهت محاسبه شباهت و فاصله ژنتیکی از معیار نئی استفاده شد. بر این اساس بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل‌آباد و کبودوال (۰/۴۰۲) و کمترین فاصله بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد (۰/۳۳۳) مشاهده شد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد (۰/۷۱۷) و کمترین شباهت ژنتیکی نیز بین نمونه‌های رودخانه-های تیل‌آباد و کبودوال (۰/۶۶۹) مشاهده شد (جدول ۸). طبق دندروگرام UPGMA ترسیم‌شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز جمعیت‌های رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد از هم جدا نشده اما احتمالا جمعیت کبودوال از جمعیت دو رودخانه دیگر جدا شده است (شکل۹).

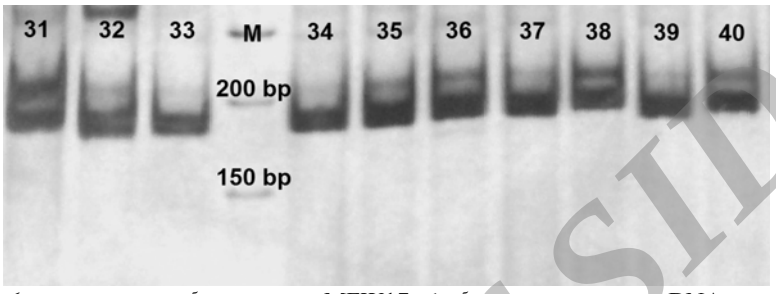
مطالعه ماهیان در اکوسیستم‌های آبی از نظر تکاملی، بوم‌شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی، بهره‌برداری از ذخایر و پرورش آن‌ها حائز اهمیت است (Mostafavi 2006). اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه‌های بومی، مورد مطالعه قرار گرفته و اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد، که این امر از نظر مدیریت شیلاتی و برنامه‌ریزی‌های حفاظتی گونه‌ها حائز اهمیت است (Coad 1980).



Archive of SID
www.SID.ir




شکل ۶- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر MFW2 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه کبودوال)




شکل ۷- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر MFW17 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه شیرآباد)

شکل ۸- توزیع تنوع ژنتیکی تحت معیار $F_{st}$

با توجه به اینکه ماهی خیاطه یکی از ماهیان بسیار مهم رودخانه-های حوزه دریای خزر می‌باشد، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ماهیان این حوزه به دلیل جدایی جغرافیایی از یکدیگر جدا شده‌اند (Samaee et al. 2006). مطالعاتی در زمینه جدایی جمعیت‌های ماهی خیاطه بر اساس تنوع و تمایز ریختی این ماهی صورت گرفته اما تاکنون تنوع ژنتیکی این ماهی در رودخانه‌های کشور بررسی نشده‌است.

ریزماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که به صورت گسترده ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu et al. 2009). گونه خیاطه فاقد جایگاه ژنی اختصاصی است و جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی از مطالعات صورت گرفته توسط Dubut et al. (2010) بر روی جمعیت ماهیان خیاطه در رودخانه Durance واقع در جنوب شرقی فرانسه و مطالعات انجام‌شده توسط Crooijmans et al. (1997) بر روی ماهی کپور معمولی انتخاب شدند. با وجود غیراختصاصی بودن، هر ۶ جایگاه ژنی دارای چندشکلی بودند، بنابراین، استفاده از این جایگاه‌های ژنی در مطالعات ژنتیکی آتی ماهی خیاطه توصیه می‌شود.

داده‌های مربوط به تنوع ژنتیکی (همچون ناخالصی و تعداد الل‌ها) از پارامترهای مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در رویارویی با تغییرات محیطی هستند (Frankham 2008)، و ویژگی‌هایی همچون اندازه بدن و قابلیت رقابت، توانایی یک موجود برای



Archive of SID
www.SID.ir

استفاده و بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌کند (Hakansson ans Jensen 2005).

ناخالصی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیار دارد؛ زیرا هر فرد ناخالص ناقل الل‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (Diz and Presa 2009). در این بررسی میانگین مقادیر به دست آمده برای تعداد الل‌ها، ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۱۵/۳۳، ۰/۸۱۷ و ۰/۸۹۳ به‌دست آمد، این مقادیر در تحقیق Dubut et al. (2010) با استفاده از آغازگرهای مشابه ۱۵/۲۵، ۰/۸۰۷ و ۰/۸۶۷ بوده است که تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. میانگین ناخالصی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های مورد بررسی ۰/۸۱۷ به دست آمد که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین و رودکوچ (به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۶۸) (Dewoody and Avis 2000) بالاتر است. Kashiri (2010) در بررسی تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspius*) در حوزه جنوبی دریای خزر میانگین ناخالصی مشاهده شده را ۰/۷ و Rezaei (2010) در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره، میانگین ناخالصی مشاهده شده را ۰/۸۱ گزارش کردند.

تعداد متوسط الل در سطح جمعیت‌ها ۱۵/۳۳ محاسبه شد، که از مقادیر به دست آمده در ماهیان آب شیرین (۷/۵) و ماهیان رودکوچ (۱۱/۳) (Dewoody and Avis 2000) بسیار بالاتر است. بنابراین طبق این بررسی تعداد الل‌ها و همچنین ناخالصی در حد مناسبی قرار دارند. اما این مقدار از متوسط تعداد الل گزارش شده برای ماهیان دریایی (۱۹/۹) (Dewoody and Avis 2000) پایین‌تر است که این امر را می‌توان به بزرگتر بودن محیط دریایی و به تبع آن بزرگتر بودن اندازه جمعیت موثر ماهیان دریایی و پتانسیل بالای جریان ژنی محیط‌های دریایی نسبت داد. در این بررسی میانگین تعداد الل در هر جایگاه ۱۵/۳۳ و میانگین تعداد الل موثر نیز ۱۰/۶۴ به دست آمد. الل‌های موثر بیانگر تعداد الل‌هایی است که ناخالصی یکسان ایجاد می‌کنند. تعداد الل‌های واقعی در هر جایگاه می‌تواند تحت تاثیر اندازه نمونه قرار گیرد به طوری که با تعداد نمونه‌های مختلف، تعداد الل‌های واقعی مختلف در هر جایگاه ریزماهواره‌ای به دست می‌آید. کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیک باشد (Lind et al. 2009). تحقیقات نشان داده که غنای اللی برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به ناخالصی مناسب‌تر است. همچنین بالا بودن غنای اللی، نشان‌دهنده بالا بودن اندازه موثر جمعیت است (Diz and Presa 2009).

در صورت بزرگ بودن بیش از اندازه جمعیت، تصادفی بودن آمیزش‌ها و عدم وجود جهش، به‌نژادی و مهاجرت (جابجایی ماهیان از یک جمعیت به جمعیت دیگر)، فراوانی اللی و ژنوتیپی می‌تواند از نسلی به نسل دیگر ثابت بماند که تحت عنوان تعادل هاردی–واینبرگ بیان می‌شود. در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini et al. 2006). در این بررسی هر سه جمعیت در اکثر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ را نشان دادند. ۱۴ نمونه از ۱۸ تست مورد بررسی به طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) انحراف از تعادل نشان دادند که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، ۱۲ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P < ۰/۰۰۸۳$). روی هم رفته، انحراف از تعادل را نمی‌توان تنها با یک عامل توجیه نمود و مجموعه‌ای از عوامل که بیشتر ناشی از دستکاری‌های انسان در محیط زیست (مخصوصا در رودخانه‌ها) هستند، می‌توانند دلایلی برای انحراف از تعادل در جمعیت‌های مورد بررسی باشند. انتخاب، عدم تکثیر تصادفی، مهاجرت و الل‌های پوچ فاکتورهای موثر در انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ هستند (Beaumont and Hoare 2003). تجزیه واریانس مولکولی ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Grassi et al. 2004). نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس $F_{st}$ نشان داد که ۹۸ درصد تنوع در درون جمعیت‌ها و تنها دو درصد بین جمعیت‌ها وجود دارد. میانگین $F_{st}$ (۰/۰۱۸) نیز تمایز بسیار پایینی را میان جمعیت‌ها نشان داد. بر اساس معیار Wright (1978) میزان $F_{st}$ بین صفر تا ۰/۰۵ بیانگر تمایز اندک است. با توجه به این که $R_{st}$ از اطلاعات مربوط به اندازه اللی استفاده کرده است و وابسته به جهش نیست، می‌تواند داده‌های بیولوژیک مناسب‌تری را نسبت به $F_{st}$ فراهم آورد



Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۷- میزان $R_{st}$ محاسبه شده برای مناطق نمونه‌برداری ماهی خیاطه در استان گلستان (اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان می‌دهند)

| مناطق نمونه‌برداری | تیل‌آباد | شیرآباد | کبودوال |
|---|---|---|---|
| تیل‌آباد | – | ۰/۰۱۰ | ۰/۰۱۰ |
| شیرآباد | ۰/۰۵۱ | – | ۰/۰۱۰ |
| کبودوال | ۰/۲۷۹ | ۰/۲۱۹ | – |

جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی مناطق نمونه‌برداری ماهی خیاطه در استان گلستان (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می‌باشند)

| مناطق نمونه‌برداری | تیل‌آباد | شیرآباد | کبودوال |
|---|---|---|---|
| تیل‌آباد | ۰/۰۰۰ | ۰/۷۱۷ | ۰/۶۶۹ |
| شیرآباد | ۰/۳۳۳ | ۰/۰۰۰ | ۰/۷۱۰ |
| کبودوال | ۰/۴۰۲ | ۰/۳۴۲ | ۰/۰۰۰ |

شکل ۹- دندروگرام UPGMA برای مناطق نمونه‌برداری ماهی خیاطه در استان گلستان

(Balloux and Moulin 2002). کم بودن تنوع بین جمعیتی و آماره‌های تمایز، نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌هاست (Pinera et al. 2007). نتایج به دست آمده، جریان ژنی بسیار بالایی را میان رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد (۱۸/۶۱۰) نشان می‌دهد.

بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی (جدول۸) و دندروگرام UPGMA بین جمعیت‌های تیل‌آباد و شیرآباد جدایی مشاهده نشده است اما می‌توان گفت احتمالا جمعیت کبودوال در یک گروه مجزا قرار گرفته است که با بالا بودن تمایز و پایین بودن جریان ژنی بین رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد با رودخانه کبودودال (جدول‌های ۳ و ۴) مطابقت دارد. یکی از دلایل آشکار این جدایی زیرحوزه این دو رودخانه می‌باشد، زیرا رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد از زیرحوزه‌های سد وشمگیر بوده اما رودخانه کبودوال در حوزه آبخیز نهر زرین‌گل واقع شده است، در نتیجه جریان ژنی، به راحتی بین دو جمعیت تیل‌آباد و شیرآباد برقرار می‌باشد. طبق داده‌های عنوان شده توسط Thorpe (1982) که مقدار شباهت ژنتیکی را برای سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره‌داران محاسبه کرد، برای جمعیت‌هایی که به گونه‌های مشابه تعلق دارند، شباهت ژنتیکی بین ۰/۹-۰/۸۰، و در گونه‌های متعلق به جنس-های مشابه بین ۰/۸۵-۰/۳۵ قرار دارد. مقادیر شباهت به دست آمده در این بررسی در محدوده گونه‌های متعلق به جنس‌های مشابه قرار می‌گیرند. طبق نتایج به دست آمده از شباهت ژنتیکی (جدول ۸) کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های تیل‌آباد و کبودوال (۰/۶۶۹) وجود دارد.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت احتمالا جمعیت کبودوال از دو جمعیت دیگر جدا شده است، اما جدایی آشکاری بین دو جمعیت تیل‌آباد و شیرآباد مشاهده نشده است. نتایج، نشان داد که تنوع ژنتیکی مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار



Archive of SID
www.SID.ir

داشت، اما ایجاد تدابیری در خصوص حفظ و تقویت تنوع مشاهده‌شده ضروری بوده تا تمایز ژنتیکی نمونه‌های مناطق مورد بررسی حفظ شود. در این خصوص، بهترین روش، احیای محل-های طبیعی تخم‌ریزی این گونه یعنی رودخانه‌ها است، زیرا دخالت بی‌رویه انسان در رودخانه‌ها (ایجاد سد بر روی رودخانه-ها در راستای توسعه صنعت و کشاورزی، احداث کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی در حاشیه رودخانه، برداشت بی‌رویه شن و ماسه از بستر و حاشیه رودخانه) صدمات جبران‌ناپذیری را به گونه‌های رودخانه‌ای وارد می‌سازد. از آنجا که ماهی خیاطه کمتر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه قرار گرفته نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه ژنتیک جمعیت این ماهی احساس می‌شود. همچنین نشانگر ریزماهواره از توانایی بالایی برای نمایش میزان تنوع ژنتیکی در این ماهی برخوردار بود.

## منابع

Abdoli A (2000) Fishes of Iran inland waters. Museum of Iran Nature and Wild life Press, Tehran, Iran. (In Farsi).

Ahmadi SE, Vosoughi A, Vatandoost S, Ghelichi A, Seidanlou Z (2011) Some specific population structure of Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) in the main Cluster of Talar River in Mazandaran province. Journal of Fisheries of Islamic Azad University Azadshahr Branch 5:65-80. (In Farsi).

Azizi F, Khoshkholgh MR, Rahmani H, Sattari M, Anvarifar H (2011) A study of dam effect on diversity and differentiation of Spirlin *Alburnoides bipunctatus* in Tejan River of Sari. In: First National Congress of Aquatics Science. Iran, Boushehr, Islamic Azad University. (In Farsi).

Balloux F, Moulin N (2002) The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff GM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry 84: 680-683.

Beaumont A, Hoare K (2003) Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Wiley-Blackwell 50 p.

Coad BW (1980) Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological conservation 10: 51-80.

Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van der poal JJ, Groenen MAM (1997) Microsatellite markers in common carp *Cyprinus carpio* L. Animal genrtics 28: 129-134.

Dewoody JA, Avise JC (2000). Microsatellite variation in Marin, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. Journal of Fish Biology 56: 461-473.

Diz PA, Presa P (2009). The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287: 278-285.

Dubut V, Sinama M, Martin JF, Meglecz E, Fernandez J, Chappaz R, Gilles A, Costedoat C (2010) Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids : A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. BMC Research Notes 135: 1-9.

Frankham R (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology 17: 325-333.

Ghorbani R, Hajimoradloo A, Yulghi S, Mollaei M, Naeimi A, Abbasi F (2012) Study of distribution, and frequency of *Alburnoides bipunctatus* in Tilabad, Kaboodwal and Shirabad streams, Goleatan Province. Research final Report. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran. 89.283: 24-28. (In Farsi).

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

Hakansson J, Jensen P (2005) Bihavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation 122: 431-439.

Hancock JM (2000) Microsatellite and other simple sequence. Oxford university press, London.

Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer EA (1996) Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular systematics (eds. Hillis DM, Mortiz C, Mable BK) 321-384. Sinauer Associates, Sunderland.

Kashiri H (2010) The study of genetic diversity of *Rutilus rutilus caspius* populations in southern basin of Caspian sea using microsatellite. Thesis, Agricultural Science and Natural Resouces University of Gorgan, Iran, 62p (In Farsi).

Kirchhofer A (1997) The assessment of fish vulnerability in Switzerland based on distribution data. Biological Conservation 80: 1-8.

Kirpichnikov VS (1972) Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Russian Journal of Genetics 8: 65-72.

Ladiges W, Vogt D (1979) Die of sub water fishes in Europas. Paul Parey, Hamburg and Berlin.

Lind CU, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture 286: 12-19.

Liu F, Xia JH, Bai ZH, Fu JJ, Li JL, Yue GH (2009) High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* revealed by microsatellite analysis. Aquaculture 297: 51-56.



Archive of SID
www.SID.ir

Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Gigliarelli L, Natali M, Panara F (2006) Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike *Esox lucius* L. Fisheries Research. 80: 251-262.

Mostafavi H (2006) Biodiversity of Talar River fishes in Mazandaran Province. Environmentology Journal 40:127-135. (In Farsi).

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

Rahmani H (2006) Population Dynamics and Genetic diversity of Shahkooli fish *Chalcalburnus chalcoides* (Gueldenstadt, 1772) in Haraz, Shirood and Gazafrood Rivers. PhD Thesis, Agricultural Science and Natural Resouces University of Gorgan, Iran. (In Farsi).

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223-225.

Rezaei M (2010) The study of genetic diversity of *Rutilus frisii jutum* populations in southern basin of Caspian sea using microsatellite. Thesis, Agricultural Science and Natural Resouces University of Gorgan, Iran, 83 p (In Farsi).

Samaee SMR, Mojazi- Amiri B, Hosseini- Mazinani SM (2006) Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. Folia Zoology 55: 323-335.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular cloning: A laboratory manual. (eds. Ford N, Nolan C, Fregusen, M.) 743-745. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Thorpe JP (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics 13: 139-168.

Vosoughi MH, Mostajir B (2001) Freshwater Fishes. Tehran University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).

Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

Zar JH (1999) Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jwesey.

Zivkovic D, Jovanovic B (2011) Spatial morphometric plasticity of spirlin *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) phenotype from the Nisava River, Serbia, Danube basin. Biologica Nyssana 2011: 1-9.

Archive of SID



www.SID.ir