

چندشکلی ریزماهورهای در جمعیت‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*) رودخانه‌های کبودوال و سفیدرود

- **لادن جهانگیری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **علی شعبانی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*) یک گونه رودخانه‌ای است که در حوضه جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتاً خوبی برخوردار می‌باشد اما در بسیاری از آب‌های اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد. تاکنون هیچ گونه مطالعه‌ای در زمینه تنوع ژنتیکی این گونه صورت نگرفته است. در این تحقیق به منظور بررسی ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه در رودخانه‌های کبودوال و سفیدرود از ۶ جایگاه ریزماهورهای استفاده شد. طبق نتایج حاصله، متوسط میزان Fst ۰/۰۲۰ به دست آمد. در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، نمونه‌ها در اکثر جایگاه‌ها انحراف از تعادل را نشان دادند. تعداد الل‌ها در محدوده ۲۱-۸ و هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب در دامنه ۱-۰/۵۴۱ (میانگین: ۰/۰۶ ± ۰/۸۵۳) و ۰/۹۲۷-۰/۸۳۴ (میانگین: ۰/۸۸۷) به دست آمد که بیان‌گر این مطلب است که جمعیت‌های مورد بررسی از غنای اللی و تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار می‌باشند. هم‌چنین آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع پایینی بین جمعیت‌ها وجود داشته و بخش عمده تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فاصله ژنتیکی نیز حاکی از جدایی جمعیت‌های ماهی خیاطه در رودخانه‌های مورد بررسی می‌باشد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهور، فاصله ژنتیکی، ماهی خیاطه



مقدمه

باید از روش‌های نوین ژنتیکی استفاده نمود. هم‌اکنون کاهش ذخایر آبیان در اکثر نقاط دنیا توجه محققان را به اعمال روش‌های دقیق مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبیان جلب نموده است (Lin و همکاران، ۲۰۰۲). در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از صفات مورفومتریک و میستیک صورت می‌گرفت، اما با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و آثار منفی دستکاری در نشانه‌گذاری بر سلامت ماهیان و هم‌چنین، محدود بودن تفسیر داده‌های حاصل از آن، علم استفاده از نشانه‌های مولکولی، هم‌چون ریزماهورها، آلوزایم و RAPD برای شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت (Jordan و Verspoor، ۱۹۸۹). تاکنون هیچ گونه مطالعه‌ای در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه صورت نگرفته است. در این تحقیق سعی شد با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهور به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه در رودخانه‌های کبودوال و سفیدرود پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۴ نمونه ماهی خیاطه از رودخانه‌های کبودوال (۳۶ درجه شمالی و ۵۴ درجه شرقی) و سفیدرود (۳۷ درجه شمالی و ۴۹ درجه شرقی) در پاییز سال ۱۳۹۰ صید گردید (به‌طور متوسط ۲۷ نمونه از هر رودخانه). حدود ۲-۳ گرم از باله پشتی هر ماهی جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرار داده شد. استخراج DNA، به روش فنل-کلروفرم انجام پذیرفت (Hillis و همکاران، ۱۹۹۶). DNAهای استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر -۲۰- نگه‌داری شدند. کیفیت و کمیت DNA استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و اسپکترومتر تعیین گردید (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹). ۶ جایگاه ژنی ریزماهوره (LleA-۰۷۱، MFw۲، Rser ۱۰، LleC-۰۹۰، Dubut و همکاران، ۲۰۱۰)، MFw۱۷ و Crooijmans و همکاران، ۱۹۹۷) از مطالعات انتشار یافته انتخاب شدند. PCR برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای اتصال برای هر یک از آن‌ها به‌دست آمد (جدول ۱).

خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش دارند (Kirpichnikov، ۱۹۷۲). ماهی خیاطه با نام علمی (*Alburnoides eichwaldi* (De Filippi، ۱۸۶۳)) یکی از گونه‌های کپورماهیان موجود در ایران می‌باشد. اهمیت ماهی خیاطه در شیلات، معمولاً به‌عنوان طعمه برای صید و از لحاظ تفریحی نگره‌داری در آکواریوم می‌باشد (Bogtskaya، ۱۹۹۷). اندازه آن کوچک است، بنابراین ارزش صید ورزشی و اقتصادی ندارد، اما با توجه به رنگ‌های زیبای روی بدن دارای ارزش زیبایی‌شناسی می‌باشد (Abdoli، ۲۰۰۰). Rothe (۲۰۰۸) ماهی خیاطه را یک گونه رودخانه‌ای معرفی کرد و بیان نمود که به علت فشارهای وارده انسان به رودخانه‌ها در اروپا و هم‌چنین کمیابی و اندازه کوچک جمعیت، این گونه در لیست قرمز گونه‌های در معرض خطر قرار گرفته و به شدت تحت حفاظت است.

تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه و یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می‌کند، بنابراین، تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی‌مدت یک گونه ضروری است (Bataillon و همکاران، ۱۹۹۶). به‌طور کلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است (Pujolar و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان دریای خزر نشان‌دهنده این واقعیت است که بسیاری از ماهیان روند گونه‌زایی را طی نموده و فرایند ایجاد جمعیت‌ها هم‌چنان ادامه دارد به‌طوری‌که گونه‌های خزری و دریای سیاه- خزری، زیرگونه‌ها و جمعیت‌هایی را در مناطق مختلف دریای خزر تشکیل داده‌اند (Rahmani، ۲۰۰۶). Azizi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثر سد بر تنوع و تمایز ریخت‌سنجی ماهی خیاطه در رودخانه تجن ساری بیان کردند برای اطمینان از تمایز جمعیت‌های این ماهی و به دست آوردن نتایج قطعی‌تر نیاز به مطالعات مولکولی می‌باشد، هم‌چنین Ahmadi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران بیان کردند که برای بررسی کامل‌تر جدایی جمعیتی،

جدول ۱: خصوصیات جایگاه‌های ژنی به‌کار برده شده در این مطالعه

جایگاه ژنی	وزن (جفت باز)	توالی پرایمر	دمای اتصال
LleA-۰۷۱	۳۱۲-۴۴۴	F:GCTTAGATTGTGTAGCGGG R:ACTTCAGTTACTAAGAGATTAGTGA	۵۰
LleC-۰۹۰	۱۵۲-۳۸۴	F:TCAGACACAACCAACCGACC R:GGCGCTGTCCAGAACTGA	۵۵
Rser ۱۰	۱۷۶-۲۴۸	F:TGCGTAATCGTGAAGCGGTG R:GCCACTAAAGCGCAGAAGCC	۶۰
Ca ^۳	۲۴۸-۳۶۴	F:GGACAGTGAGGGACGCAGAC R:TCTAGCCCCCAAATTTACGG	۵۸
MFw۲	۱۸۰-۲۳۶	F:CACACCGGGCTACTGCAGAG R:GTGCAAGTGCAGGCAGTTTGC	۶۱
MFw۱۷	۱۷۶-۲۲۸	F:CTCAACTACAGAGAAATTCATC R:GAAATGGTACATGACCTCAAG	۵۰



بالاترین (۲۱) تعداد الل را نشان دادند. تعداد متوسط الل‌های مشاهده شده و موثر در کبودوال به ترتیب ۱۳ و ۹/۴۲۸ و در سفیدرود ۱۴/۵ و ۱۰/۵۷۹ به دست آمد که از این نظر بین دو رودخانه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) به ترتیب در دامنه ۱-۰/۵۴۱ (متوسط: ۰/۸۵۳) و ۰/۹۲۷-۰/۸۳۴ (متوسط: ۰/۸۸۷) قرار داشت. متوسط هتروزایگوسیتی مشاهده شده در سطح رودخانه‌ها نیز به ترتیب ۰/۷۸۶ و ۰/۹۲۰ برای کبودوال و سفیدرود به دست آمد (جدول ۲). هم‌چنین بین مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، مشاهده نشد ($P > 0.05$). در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، ۹ نمونه از ۱۲ تست مورد بررسی (۶ جایگاه $2 \times$ منطقه) به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) انحراف از تعادل نشان دادند، اما پس از به‌کار بردن ضریب تصحیح بونفرونی تنها ۵ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P \leq 0.0003$). متوسط شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) و جریان ژنی به ترتیب ۰/۰۳۶ و ۲۱/۱۸۱ را نشان دادند. در بررسی شاخص F_{is} جایگاه Ca^3 در رودخانه کبودوال کسری هتروزایگوسیتی معنی‌داری ($P \leq 0.002$) پس از اعمال ضریب تصحیح توسط نرم‌افزار FSTAT نشان داد (جدول ۲). از نظر تمایز بین مناطق میزان شاخص R_{st} و F_{st} براساس آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۱۶۶ به دست آمد. بررسی نتایج F_{st} حاصل از آنالیز واریانس مولکولی در سطح ۹۹٪ نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸٪) درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (۲٪) بین جمعیت‌ها وجود دارد (شکل ۱).

حجم واکنش PCR، ۲۵ مایکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ مایکرومولار از هر آغازگر، ۴۰۰ مایکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تک DNA پلیمرز، بافر (1X) PCR، ۱/۵ میلی-مولار کلرید منیزیم و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم بود. هم‌چنین چرخه‌های حرارتی شامل ۳ سیکل: ۱ سیکل ۳ دقیقه-ای در دمای ۹۴ درجه (واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، درجه حرارت اتصال اختصاصی هر آغازگر (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق) و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه (بسط)، و ۱ سیکل ۷۲ درجه‌ای به مدت ۳ دقیقه به‌عنوان مرحله بسط نهایی بود. محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد (غیر یونیزه) جداسازی و ژل‌ها با روش نیترا نقره (Bassam) و همکاران، (۱۹۹۱) رنگ‌آمیزی شدند.

پس از تهیه تصاویر ژل‌ها، محاسبه طول قطعات با نرم‌افزار Gel pro analyzer ۶/۰، بررسی تعداد الل‌ها و هتروزایگوسیتی با نرم‌افزار Genealex (Peakall و Smouse، ۲۰۰۶)، تست انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ با نرم‌افزار Raymond GenePop و Rousset (۱۹۹۵)، تعیین شاخص درون‌آمیزی (F_{is}) با نرم‌افزار FSTAT (Goudet، ۲۰۰۱) و ترسیم درخت UPGMA با نرم‌افزار PopGene (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) انجام شد.

نتایج

تعداد کل الل در سطح جایگاه‌ها در دامنه ۲۱-۸ به دست آمد، به‌طوری‌که جایگاه Rser1۰ پایین‌ترین (۸) و جایگاه LLeA-۰۷۱

جدول ۲: تنوع ژنتیکی شش جایگاه مورد مطالعه در جمعیت‌های ماهی خیاظه

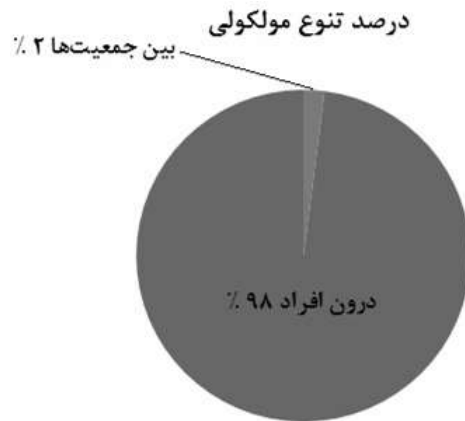
MFW1۷	MFW۲	Ca ³	Rser1۰	LLeC-۰۹۰	LLeA-۰۷۱	
۱۴	۹	۱۹	۸	۱۳	۱۵	N_a
۱۰/۳۱۶	۷/۷۲۴	۱۵/۸۳۸	۴/۹۷۸	۷/۷۲۴	۹/۹۸۷	N_e
۰/۸۵۷	۰/۹۶۴	۰/۳۲۱	۰/۶۴۳	۰/۹۲۹	۱/۰۰۰	H_o
۰/۹۰۳	۰/۸۷۱	۰/۹۳۷	۰/۷۹۹	۰/۸۷۱	۰/۹۰۰	H_e
۰/۰۵۱	-۰/۱۰۸	۰/۶۵۷	۰/۱۹۶	-۰/۰۶۷	-۰/۱۱۱	F_{is}
ns	***	***	**	***	ns	pHw
۹	۹	۱۶	۱۲	۲۰	۲۱	N_a
۶/۸۳۱	۷/۴۴۰	۱۲/۰۱۹	۷/۶۲۲	۱۳/۷۳۶	۱۵/۸۲۳	N_e
۰/۷۶۰	۱/۰۰۰	۰/۷۶۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	H_o
۰/۸۵۴	۰/۸۶۶	۰/۹۱۷	۰/۸۶۹	۰/۹۲۷	۰/۹۳۷	H_e
۰/۱۱۰	-۰/۱۵۵	۰/۱۷۱	-۰/۱۵۱	-۰/۰۷۹	-۰/۰۶۷	F_{is}
*	**	ns	**	*	**	pHw

N_a : تعداد الل، N_e : تعداد الل موثر، H_o : هتروزایگوسیتی مشاهده شده، H_e : هتروزایگوسیتی مورد انتظار، F_{is} : ضریب درون‌آمیزی (مقادیر معنی‌دار به صورت پررنگ و زیرخطدار مشخص هستند)، pHw: تست احتمال هاردی-واینبرگ (ns: عدم معنی‌داری، * $P \leq 0.05$ ، ** $P \leq 0.01$ ، *** $P \leq 0.001$)



جدول ۳: میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (F_{st}) در سطح شش جایگاه ژنی مورد استفاده

جایگاه ژنی	LleA-071	LleC-090	Rser10	Ca3	MFW2	MFW17	میانگین
Nm	17/221	8/380	5/642	27/104	56/763	11/976	21/181
F_{st}	0/014	0/029	0/042	0/009	0/004	0/020	0/020

شکل ۱: چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده با معیار F_{st} جدول ۴: آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در R_{st}

df	SS	MS	Est. var.	%	Stat	Value	Prob
۱	۹۱۷/۹۸۵	۹۱۷/۹۸۵	۱۵/۸۷۰	۱۷ درصد			
۱۰۴	۸۲۷۵/۳۲۶	۷۹/۵۷۰	۷۹/۵۷۰	۸۳ درصد	R_{st}	0/166	0/01

df (درجه آزادی)، SS (مجموع مربعات)، MS (انحراف میانگین مربع)، Prob (معنی دار بودن انحراف بعد از ۹۹۹ جایگزینی تصادفی)

طرفی، به دلیل هم‌باز بودن، هتروزیگوسیتی و جهش را بهتر از سایر نشانگرها نشان می‌دهد (Liu و Cordes, 2004). متأسفانه اطلاعات راجع به تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه در سطح مولکولی محدود می‌باشد و هم‌چنین این گونه فاقد جایگاه ژنی اختصاصی است. در این بررسی از شش جایگاه ژنی استفاده شد که همگی دارای چندشکلی بودند. هتروزیگوسیتی و تعداد ال‌ها جزو شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها از لحاظ رو به رو شدن با تغییرات محیطی هستند (Frankham, 2008) و ویژگی‌هایی هم‌چون قابلیت رقابت و توانایی یک موجود برای بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌سازد (Hakansson و Jensen, 2005). هتروزیگوسیتی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیار دارد، زیرا هر هتروزیگوت ناقل ال‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (Diz و Presa, 2009). در این بررسی متوسط تعداد ال‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۱۳/۷۵، ۰/۸۵۳ و ۰/۸۸۷ به دست آمد. در این بررسی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های مورد بررسی ۰/۸۵۳ به دست آمد، که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین و رودکوچ (به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۶۸) (Dewoddy و Avis, 2000) بالاتر است. میانگین تعداد ال‌ها در هر جایگاه برای ماهیان آب شور ۱۹/۹ گزارش شده است (Dewoddy و

براساس معیار فاصله ژنتیکی Nei میزان شباهت ژنتیکی بین دو منطقه ۰/۶۸۲ و مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۳۸۲ به دست آمد. دندروگرام UPGMA ترسیم شده براساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند. هم‌چنین نتایج نشان داد که نشانگر ریزماهوره از توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در این ماهی برخوردار است.

بحث

تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می‌شود و می‌توان آن را توسط نشانگرهای ژنتیکی اندازه‌گیری کرد (Utter, 1991). تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط سازمان حفاظت جهانی برای برنامه حفظ ذخایر است (Lucentini و همکاران، 2009). ریزماهوره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که به صورت گسترده در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu و همکاران، 2009). این نشانگرها ارزش بالایی دارند، به طوری که علاوه بر فراوانی بالا در ژنوم تمام موجودات، تنوع قطعات تکرار شونده در آن‌ها بالاست که علت آن را می‌توان به نرخ بالای جهش در این نشانگرها نسبت داد و از

به دست آمده در این بررسی (۰/۶۸۲) در محدوده گونه‌های متعلق به جنس‌های مشابه قرار دارد. نتایج این بررسی حاکی از وجود جریان ژنی بالا بین رودخانه‌های مورد بررسی است. در بررسی مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی نیز فاصله ژنتیکی نسبتاً پایینی بین مناطق مورد بررسی مشاهده شد. در صورت عدم جریان ژنی و یا جریان ژنی اندک بین جمعیت‌ها انتظار می‌رفت تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها ایجاد گردد.

با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی مناطق مورد بررسی در حد قابل قبولی قرار دارد. با وجود این، ایجاد تدابیری در خصوص حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده ضروری به نظر می‌رسد تا از دست رفتن تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی اتفاق نیفتد. در این خصوص بهترین روش، احیای محل‌های تخم‌ریزی طبیعی این گونه یعنی رودخانه‌ها می‌باشد، زیرا دخالت بی‌رویه انسان در رودخانه‌ها (ایجاد سد بر روی رودخانه‌ها 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 جبران ناپذیری را به گونه‌های رودخانه‌ای وارد می‌سازد. از آنجایی که ماهی خیاطه کم‌تر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است نیاز به مطالعات بیش‌تر در زمینه ژنتیک جمعیت این ماهی می‌باشد.

منابع

۱. احمدی، س.ا.؛ وثوقی، ع.؛ وطن‌دوست، ص.؛ قلیچی، ا. و صیدانلو، ز.، ۱۳۹۰. برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر. دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۶۵ تا ۸۰.
۲. رحمانی، ح.، ۱۳۸۵. پویایی‌شناسی جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی شاه‌کولی *Chalcaburnus chalcoides* در رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرو. رساله دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۲ صفحه.
۳. عبدلی، ا.، ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران، تهران. ۳۷۷ صفحه.
۴. عزیزی، ف.؛ خوش‌خلق، م.ر.؛ رحمانی، ح.؛ ستاری، م. و انوری‌فر، ح.، ۱۳۸۹. بررسی اثر سد بر تنوع و تمایز ریخت‌سنجی ماهی خیاطه در رودخانه تاجن ساری. اولین همایش ملی علوم آبریان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر.
۵. Balloux, F. and Moulin, N., ۲۰۰۲. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. Vol. ۱۱, pp: ۱۵۵-۱۶۵.
۶. Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, G.M., ۱۹۹۱. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Biochemistry*. Vol. ۸۴, pp: ۶۸۰-۶۸۳.
۷. Bataillon, T.M.; David, J.L. and Schoen, D.J., ۱۹۹۶. Neutral genetic markers and conservation: simulated germplasm collections. *Genetics*. Vol. ۱۴۴, pp: ۴۰۹-۴۱۷.

Avis, ۲۰۰۰)، این درحالی است که میانگین تعداد ال‌ها در شش جایگاه مورد استفاده در این بررسی پایین‌تر و عدد ۱۳/۷۵ به دست آمده است. تحقیقات نشان می‌دهند که غنای الی برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به هتروزایگوسیتی مناسب‌تر است. هم‌چنین بالا بودن غنای الی، نشان‌دهنده بالا بودن اندازه جمعیت موثر است (Diz و Presa, ۲۰۰۹) و به‌طور کلی، تعداد کم ال نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی است که در شرایط جمعیت وحشی، ممکن است به دلیل جدا شدن جمعیت و یا کاهش شدید اندازه موثر باشد (Ha و همکاران، ۲۰۰۹). در این بررسی جمعیت هر دو رودخانه در اکثر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند. ۹ نمونه از ۱۲ تست مورد بررسی به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) انحراف از تعادل نشان دادند، اما پس از به‌کار بردن ضریب تصحیح بونفرونی تنها ۵ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P \leq 0.0083$). جایگاه $Ca3$ کسری هتروزایگوسیتی بالایی را نشان داد. دلایل زیست‌شناختی این کسری به‌خوبی شناخته نشده است و عوامل زیادی هم‌چون اثر وهلاند، درون‌آمیزی، ال پوچ و به‌گزینی برای توضیح آن مطرح شده‌اند. جدا از دلایل بیولوژیک معمول در ایجاد کسری هتروزایگوسیتی، ریزماهواره‌ها به‌طور خاص مستعد این پدیده هستند (Diz و Presa, ۲۰۰۹). آنالیز واریانس مولکولی به‌عنوان یک آنالیز آماری وسیله مناسبی برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Grassi و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج آنالیز واریانس مولکولی براساس F_{st} نشان داد تنها دو درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به بین جمعیت‌هاست و از نظر فراوانی الی تفاوت معنی‌داری ($P > 0.05$) میان مناطق مشاهده نشد. F_{st} به‌دست آمده براساس فراوانی (۰/۲۰) و براساس آنالیز واریانس مولکولی (۰/۲۰) پایین است که نشان‌دهنده تمایز بسیار پایین بین جمعیت‌هاست. براساس معیار Wright (۱۹۸۷) مقادیر F_{st} بین ۰-۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز پایین میان نمونه‌هاست. با توجه به این که R_{st} از اطلاعات مزبور به اندازه الی استفاده می‌کند و وابسته به جهش نیست می‌تواند داده‌های بیولوژیک مناسب‌تری را نسبت به معیار F_{st} فراهم کند (Moulin و Balloux, ۲۰۰۲).

کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های تمایز، نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌هاست (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷). بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz و Presa, ۲۰۰۹).

طبق پیراسنجه‌های عنوان شده توسط Thorp (۱۹۸۲) که مقدار شباهت ژنتیکی را براساس سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره‌داران محاسبه کرد، برای جمعیت‌هایی که به گونه‌های مشابه تعلق دارند، شباهت ژنتیکی بین ۰/۸۰-۰/۹۰ و در گونه‌های متعلق به جنس‌های مشابه بین ۰/۸۵-۰/۳۵ قرار دارد که مقدار



۲۳. Kirpichnikov, V.S., ۱۹۷۲. Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Russian Journal of Genetics. Vol. ۸, No. ۱, pp: ۶۵-۷۲.
۲۴. Nei, M., ۱۹۷۲. Genetic distance between populations. American Naturalist. Vol. ۱۰۶, pp: ۲۸۳-۹۲.
۲۵. Peakall, R. and Smouse, P.E., ۲۰۰۶. GENALEX ۶: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. Vol. ۶, pp: ۲۸۸-۲۹۵.
۲۶. Pinera, J.A.; Blanco, G.; Vázquez, E. and Sánchez, J.A., ۲۰۰۷. Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: a preliminary study. Marine Biology. Vol. ۱۵۱, pp: ۲۱۵۳-۲۱۵۸.
۲۷. Pujolar, J.M.; Deleo, G.A.; Ciccotti, E. and Zane, L., ۲۰۰۹. Genetic composition of Atlantic and Mediterranean of European eel *Anguilla Anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. Journal of Fish Biology. Vol. ۷۴, pp: ۲۰۳۴-۲۰۴۶.
۲۸. Raymond, M. and Rousset, F., ۱۹۹۵. GENEPOP (Version ۱.۳): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. Heredity. Vol. ۸۶, pp: ۲۴۸-۲۴۹.
۲۹. Rothe, U., ۲۰۰۸. Der Shneider *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, ۱۷۸۲) erstmal in Brandenburg nachgewiesen. Zoosystematics and Evolution. Vol. ۷۸, No. ۱, pp: ۱۸۳-۱۸۵.
۳۰. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T., ۱۹۸۹. Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular cloning: A laboratory manual. (eds. Ford N, Nolan C, Fregusen, M.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp: ۷۴۳-۷۴۵.
۳۱. Thorp, J.P., ۱۹۸۲. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. Annual Review of Ecology and Systematics. Vol. ۱۳, pp: ۱۳۹-۱۶۸.
۳۲. Utter, F.M., ۱۹۹۱. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology. Vol. ۳۹, pp: ۱-۲۰.
۳۳. Verspoor, E. and Jordan, W.C., ۱۹۸۹. Genetic variation at the Me-۲ locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. Fish Biology. Vol. ۳۵, pp: ۲۰۵-۲۱۳.
۳۴. Wright, S., ۱۹۸۷. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. Vol. ۴.
۳۵. Yeh, F.C.; Yang, R.C. and Boyle, T., ۱۹۹۹. POPGENE version ۱.۳.۱. Microsoft Window-bases Freeware for population Genetic Analysis. Retrieved from: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.
۸. Bogtskaya, N.G., ۱۹۹۷. Contribution of the knowledge of lenciscine fishes of Asia Minor. Mittheilungen aus dem Hamburgschen Zoologischen Museum und Institute. Vol. ۹۴, pp: ۱۶۱-۱۸۶.
۹. Crooijmans, R.P.M.A.; Bierbooms, V.A.F.; Komen, J.; Van der poal, J.J. and Groenen, M.A.M., ۱۹۹۷. Microsatellite markers in common carp *Cyprinus carpio* L. Animal genetics. Vol. ۲۸, pp: ۱۲۹-۱۳۴.
۱۰. Dewoody, J.A. and Avise, J.C., ۲۰۰۰. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Fish biology. Vol. ۵۶, pp: ۴۶۱-۴۷۳.
۱۱. Diz, P.A. and Presa, P., ۲۰۰۹. The genetic diversity pattern of *Mytilus alprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. Vol. ۲۸۷, pp: ۲۷۸-۲۸۵.
۱۲. Dubut, V.; Sinama, M.; Martin, J.F.; Meglecz, E.; Fernandez, J.; Chappaz, R.; Gilles, A. and Costedoat, C., ۲۰۱۰. Cross-species amplification of ۴۱ microsatellites in European Cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. BMC Research Notes. Vol. ۳, ۱۳۵ p.
۱۳. Frankham, R., ۲۰۰۸. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology. Vol. ۱۷, pp: ۳۲۵-۳۳۳.
۱۴. Goudet, J., ۲۰۰۱. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version ۲.۹.۳). Retrieved from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
۱۵. Grassi, F.; Imazio, S.; Gomasasca, S.; Citterio, S.; Aina, R.; Sgorbati, S.; Sala, F.; Patrignani, G. and Labra, M., ۲۰۰۴. Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science. Vol. ۱۶۶, pp: ۱۴۳۷-۱۴۴۱.
۱۶. Ha, H.P.; Nguyen, T.T.; Poompuang, S. and Na-Nakorn, U., ۲۰۰۹. Microsatellites revealed no genetic differentiation between hatchery and contemporary wild populations of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage ۱۸۷۸) in Vietnam. Aquaculture. Vol. ۲۹۱, pp: ۱۵۴-۱۶۰.
۱۷. Hakansson, J. and Jensen, P., ۲۰۰۵. Behavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation. Vol. ۱۲۲, pp: ۴۳۱-۴۳۹.
۱۸. Hillis, D.M.; Mable, B.K.; Larson, A.; Davis, S.K. and Zimmer, E.A., ۱۹۹۶. Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular systematics (eds. Hillis DM, Mortiz C, Mable BK). pp: ۳۲۱-۳۸۴.
۱۹. Lin, Y.S.; Poh, Y.P.; Lin, S.M. and Tzeng, C.S., ۲۰۰۲. Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological Studies. Vol. ۴۱, pp: ۴۲۱-۴۳۰.
۲۰. Liu, Z. and Cordes, J.F., ۲۰۰۴. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. Vol. ۲۳۸, pp: ۱-۳۷.
۲۱. Liu, F.; Xia, J.H.; Bai, Z.H.; Fu, J.J.; Li, J.L. and Yue, G.H., ۲۰۰۹. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. Aquaculture. Vol. ۲۹۷, pp: ۵۱-۵۶.
۲۲. Lucentini, L.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Gigliarelli, L.; Sgaravizzi, G.; Natali, M. and Panara, F., ۲۰۰۹. Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive-breeding managed northern pike (*Esox Lucius*) population. Fisheries Research. Vol. ۹۶, pp: ۱۳۹-۱۴۷.

