

بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ماهی غبغبو (*Alburnoides nicolausi*) در رودخانه‌های جوشان و حوضیان (استان لرستان)

چکیده

ماهی غبغبو (*Alburnoides nicolausi*) یکی از گونه‌های بنتوپلاژیک آب شیرین بااهمیت اکولوژیکی بالا می‌باشد. این ماهی بومی ایران بوده و در حوضه دجله یافت می‌شود. در پژوهش حاضر با توجه به عدم وجود اطلاعات در زمینه ژنتیک جمعیت *A. nicolausi* به ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی این گونه ارزشمند پرداخته شد. بدین منظور نمونه‌های ماهی از رودخانه‌های جوشان و حوضیان (استان لرستان) طی زمستان ۱۳۹۶ جمع‌آوری و با استفاده از جایگاه‌های STRs مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد ماهی غبغبو از تنوع آلی (میانگین آلی: ۸/۱۶) و هتروزیگوسیتی مناسبی (میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده: ۰/۹۵۸) برخوردار می‌باشد. در مقایسه بین جمعیتی، تفاوت معنی‌داری از نظر تنوع آلی و هتروزیگوسیتی بین نمونه‌های موردنظر مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). در بررسی تعادل هاردی-وینبرگ، در دو مورد انحراف معنی‌دار از تعادل وجود داشت که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی در تعادل قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که بخش عمده تنوع مشاهده‌شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. میزان FST و RST به‌عنوان پیراستجه‌های تمایز ژنتیکی به ترتیب ۰/۰۶۲ و ۰/۰۸۶ به دست آمد. در این خصوص، میزان شاخص مهاجرت مؤثر بین نمونه‌های موردبررسی در سطح نسبتاً پایینی قرار داشت (۴/۳۰). همچنین از مجموع ۶۸ آل مشاهده‌شده، تعداد قابل‌توجهی آل اختصاصی در جمعیت‌ها وجود داشت (۱۷ و ۲۱ آل به ترتیب برای نمونه‌های جوشان و حوضیان). روی‌هم‌رفته، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد *A. nicolausi* از سطح مناسبی از تنوع ژنتیکی برخوردار بوده و احتمالاً جمعیت‌های موردبررسی نیز جدا از هم هستند. اطلاعات به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر می‌تواند برای تدوین برنامه‌هایی باهدف مدیریت و حفاظت از ذخایر بومی آب شیرین سودمند باشد.

واژگان کلیدی: آب شیرین، تنوع آلی، جمعیت، حوضه دجله، هتروزیگوسیتی.

حدیثه کشیری^{*۱}

علی رضامند^۲

۱. استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. دانشجوی دکتری بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*مسئول مکاتبات:

hadiskashiri@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۳۰۸۳۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۵

این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

مقدمه

جنس *Alburnoides* بانام عمومی خیاطه متعلق به خانواده Cyprinidae بوده که در بخش‌هایی از آسیا و اروپا پراکنش یافته‌اند (Coad, ۲۰۱۳). این ماهیان اندازه کوچکی داشته و عمدتاً در اکوسیستم‌های آب شیرین کم‌عمق و غنی از اکسیژن با بستر سنگ و گراویل یافت می‌شوند. تاکنون ۳۴ گونه از جنس *Alburnoides* شناسایی شده که در این میان ۱۱ گونه مختلف در بخش‌های مختلف ایران همچون حوضه جنوبی دریای خزر، حوضه آبریز کویر نمک (رودخانه کرج، جاجرود، جبل رود و قره‌چای)، دجله، کر، دریاچه ارومیه و قنات‌های شاهرود گزارش شده است (Mousavi-Sabet et al., ۲۰۱۵ a,b, ۲۰۱۲, ۲۰۰۹, Coad and Bogutskaya, ۲۰۰۷, Kottelat and Freyhof, ۲۰۰۷؛ صادقی و همکاران، ۱۳۹۱). *Alburnoides nicolausi* یکی از گونه‌های مهم این جنس بوده که بومی ایران می‌باشد. این ماهی بنتوپلاژیک بوده و در حوضه دجله یافت می‌شود (Bogutskaya and Coad, ۲۰۰۹). تاکنون اطلاعات چندانی در ارتباط با شرایط و ویژگی‌های اکولوژیکی و

زیست‌شناختی این گونه ارزشمند موجود نمی‌باشد و مطالعات صورت گرفته محدود به بررسی ویژگی‌های ریختی (جولاده رودبار و همکاران، ۱۳۹۴) و رابطه طول و وزن این ماهی (Mousavi-Sabet et al., ۲۰۱۷; Rezamand et al., ۲۰۱۸) بوده است. هر فرد به‌عنوان یک خزانه ژنی و جمعیت‌ها به‌عنوان گروه متنوعی از ژن‌ها بوده که ممکن است تحت تأثیر عواملی همچون آلودگی، تغییرات شرایط آب‌وهوایی و تخریب زیستگاه‌ها قرار گیرند. متأسفانه طی سال‌های اخیر، جمعیت بسیاری از ماهیان رودخانه‌ای به دلیل دخالت‌های روزافزون بشر در طبیعت تغییر یافته (Rosenfeld, ۲۰۰۳)، به‌نحوی که تنوع ژنتیکی بسیاری از جمعیت‌ها در اثر فعالیت‌هایی همچون مسدود شدن مسیر مهاجرت ناشی از احداث سد و ورود آلاینده‌ها کاهش یافته است (Zhao et al., ۲۰۰۵). بر اساس فهرست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN)، برخی گونه‌های *Alburnoides* همچون *A. maculatus* (Freyhof, ۲۰۱۱) و *A. ohridanus* (Freyhof and Kottelat, ۲۰۰۸) به‌عنوان گونه‌های آسیب‌پذیر معرفی شده‌اند. این در حالی است که تاکنون هیچ‌گونه اطلاعاتی در خصوص وضعیت جمعیت‌های *A. nicolausi* وجود ندارد؛ بنابراین با توجه به اهمیت اکولوژیکی *A. nicolausi* به‌عنوان یک گونه آب شیرین و همچنین اهمیت حفاظت از تنوع زیستی به‌عنوان شاخص مهمی از توسعه‌یافتگی کشورها، آگاهی از ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد.

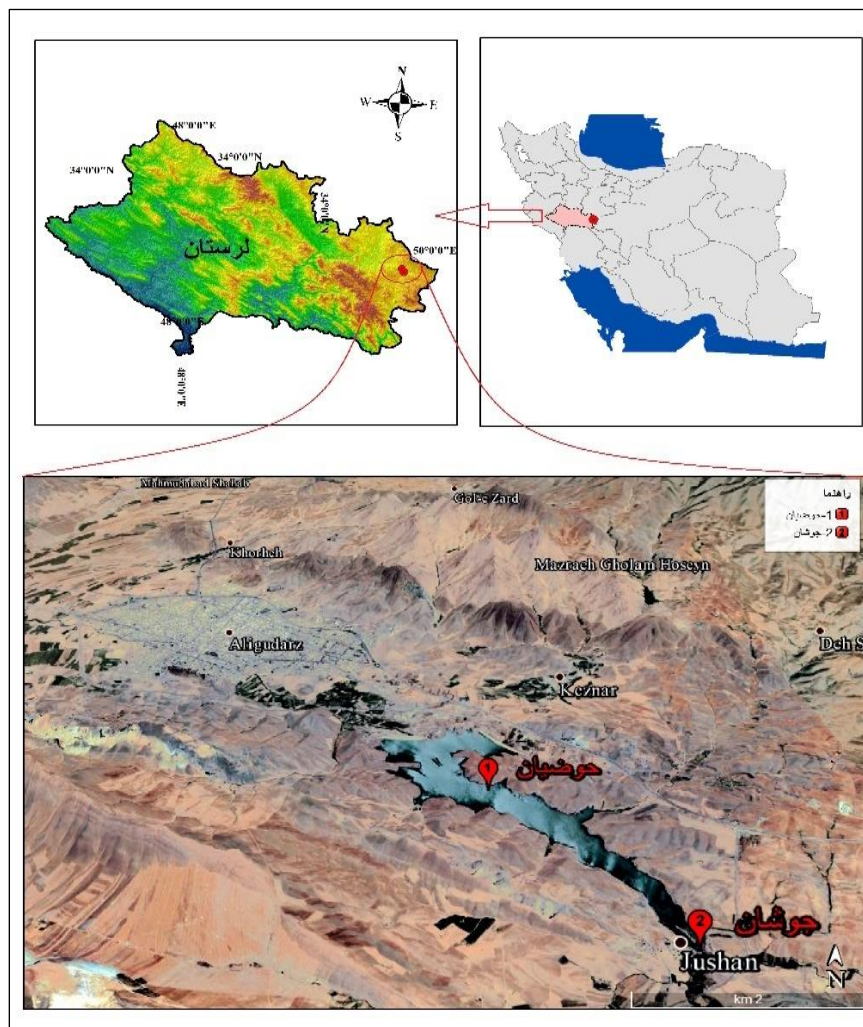
تنوع ژنتیکی از اهمیت بالایی برای پایداری جمعیت‌های طبیعی ماهیان برخوردار بوده (Xia et al., ۲۰۱۵, ۲۰۱۴) و به‌عنوان مقیاسی برای پیش‌بینی سطح سازگاری گونه‌ها با شرایط آینده محیطی در نظر گرفته می‌شود، به‌نحوی که کاهش تنوع ژنتیکی در ذخایر وحشی گونه‌های آب شیرین می‌تواند روی سازگاری آن‌ها با شرایط محیطی در حال تغییر اثرگذار باشد (Mkare et al., ۲۰۱۷). درواقع توانایی یک جمعیت برای سازگاری و تکامل می‌تواند مرتبط با هتروزیگوسیتی و تعداد کل آلل‌های موجود در یک جمعیت باشد (Frankham et al., ۲۰۱۴)؛ بنابراین آگاهی از ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها برای مدیریت ذخایر وحشی ضروری می‌باشد (Geist et al., ۲۰۰۹). در این خصوص، نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزار کارآمدی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی ماهیان مطرح می‌باشند (Kashiri et al., ۲۰۱۹; Abdul-moneer, ۲۰۱۴). در بین نشانگرهای مختلف، ریز ماهواره‌ها یا تکرارهای کوتاه پشت‌هم (STRs) یکی از بهترین نشانگرهای مولکولی در مطالعات ژنتیک جمعیت می‌باشند (Yang et al., ۲۰۲۰; Tibihika et al., ۲۰۱۹). در این راستا، اگرچه مجموعه رو به افزایشی از سایر نشانگرهای مولکولی و تکنیک‌های توالی‌یابی وجود دارد، اما STRs به دلیل سادگی همچنان به‌عنوان یک گزینه مهم مطرح می‌باشند (Guichoux et al., ۲۰۱۱; Curto et al., ۲۰۱۳). همچنین علاوه بر سادگی، این نشانگرها دارای یکسری ویژگی‌های مهم همچون وراثت هم‌بارز، فراوانی در ژنوم، چندریختی بالا و قابلیت تکثیر می‌باشند که آن‌ها را برای مطالعات ژنتیک جمعیت ایده آل ساخته است (Sundaray et al., ۲۰۱۶; Chiou et al., ۲۰۲۰). در پژوهش حاضر نیز از شش جایگاه STRs برای ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیکی *A. nicolausi* در رودخانه‌های استان لرستان استفاده شد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیتی *A. nicolausi* جهت مدیریت بهینه برای حفاظت از جمعیت‌های این گونه ارزشمند ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ قطعه ماهی *Alburnoides nicolausi* (شکل ۱) از هر یک از رودخانه‌های جوشان (۳۳۲۰۳۸۱۰ N; ۴۹۴۴۵۸۲۴ E) و حوضیان (۳۳۲۱۵۳۶۲ N; ۴۹۴۳۵۱۲۰ E) در استان لرستان (شکل ۲) طی زمستان ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید. شناسایی نمونه‌ها بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر برای گونه موردنظر (Bogutskaya and Coad, ۲۰۰۹) صورت گرفت. پس از جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها، حدود ۱×۱ سانتی‌متر مربع از باله دمی هر نمونه به‌طور جداگانه در تیوب‌های حاوی الکل اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد.



شکل ۱: گونه *Alburnoides nicolausi* (استان لرستان، ۱۳۹۶).



شکل ۲: موقعیت جغرافیایی رودخانه‌های مورد نمونه‌برداری واقع در استان لرستان (۱۳۹۶).

DNA هر نمونه با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت‌های جانوری (GeneAll Tissue and Tissue SV plus mini kits, South Korea) بر اساس شیوه‌نامه ارائه‌شده توسط شرکت سازنده استخراج گردید. در نهایت میزان ۱۰۰ مایکرولیتر آب مقطر استریل به هر یک از

DNA های استخراج شده اضافه و تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت هر یک از نمونه‌های استخراج شده نیز به ترتیب با استفاده از بایوفتومتر (Ependorf BioPhotometer، مدل RS ۲۳۲ C، آلمان) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، از شش آغازگر شامل Albi^{۶۱}، Albi^{۶۲}A، Albi^{۶۲}B، Albi^{۶۲} (Urbankova et al., ۲۰۱۳)، LiEa-۰۷۱ و LiEc-۰۹۰ (Dubut et al., ۲۰۰۹) استفاده شد که در مطالعات قبلی صورت گرفته توسط Urbankova و همکاران (۲۰۱۳)، حقیقی و همکاران (۱۳۹۳) و جهانگیری و همکاران (۱۳۹۳) روی گونه‌های مختلف *Alburnoides* چندشکلی نشان داده بودند. ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (Bio-RAD MJ Mini Thermal Cycler, Hercules, CA, USA) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر (۲ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پسین و پیشین، ۶/۲۵ میکرولیتر مستر میکس (Red Load Taq Master, Jena Bioscience) و ۲/۲۵ میکرولیتر آب مقطر (PCR grade water) انجام شد. برنامه PCR نیز بدین صورت بود: ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد (جدول ۱)، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه.

جدول ۱: ویژگی آغازگرهای STRs مورد استفاده برای گونه *Alburnoides nicolausi* (استان لرستان، ۱۳۹۶).

آغازگر	کد دسترسی	اندازه آلی	توالی	تعداد آل‌ها	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
Albi ^{۲۲}	JX۲۲۸۹۵۶	۲۰۴-۱۴۴	F: CAG GAG CCA CTG TAG TGC R: GGG ACT GGT GGA TTC ATA GAC	۱۵	۵۸
Albi ^{۶۱}	JX۲۲۸۹۵۷	۱۲۰-۹۶	F: AAC TCC CTC GCG TGC C R: ATA TTG ATC AGC GCT TTG TCG	۷	۵۲
Albi ^{۶۲} A	KC۱۶۱۲۰۵	۲۸۴-۲۴۴	F: CTC CAT TGT GCC CAC ATA CAC R: CCA GAG ATC AGC GCT CAG	۱۱	۵۸
Albi ^{۶۲} B	KC۱۶۱۲۰۶	۳۸۰-۳۴۰	F: CTC CAT TGT GCC CAC ATA CAC R: CCA GAG ATC AGC GCT CAG	۱۱	۵۸
LiEa-۰۷۱	FJ۶۰۱۷۱۵	۳۳۸-۳۳۶	F: GTCTTAGATTGTGTAGCGGG R: ACTTCAGTTACTAAGAGATTAGTGA	۹	۵۰
LiEc-۰۹۰	FJ۶۰۱۷۲۲	۲۸۰-۲۱۶	F: TCAGACACAACCTAACCGACC R: GGCGCTGTCCAGAACTGA	۱۵	۵۵

محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد جداسازی شدند. همچنین از لدر ۱۰۰ bp (Fermentas, Waltham, MA) به‌عنوان نشانگر برای تعیین اندازه آلی استفاده شد. درنهایت ژل‌های به‌دست‌آمده به روش نیترا نقره (Benbouza et al., ۲۰۰۶) رنگ‌آمیزی و تصاویر مربوط به آن‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ثبت گردید.

اندازه آلی با استفاده از نرم‌افزار GelAnalyzer تعیین شد (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). امکان وجود آل‌های نول، از دست رفتن آل‌های بزرگ و خطای دسته‌بندی با استفاده از برنامه Microchecker (Van Oosterhout et al., ۲۰۰۴) بررسی شد. پیراسته‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آل‌ها، آل‌های مؤثر، آل‌های اختصاصی، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار، مهاجرت مؤثر، فاصله و شباهت ژنتیکی (Nei, ۱۹۷۸) با استفاده از برنامه GenAlex ۶.۳ (Peakall and Smouse, ۲۰۰۶) تعیین شد. تفاوت در پیراسته‌های تنوع ژنتیکی نیز با استفاده از آزمون Wilcoxon-Mann-Whitney در SPSS ارزیابی شد (Zar, ۲۰۱۰). روش Linkdis در Genetix

برای بررسی عدم تعادل پیوستگی استفاده شد (Belkhir *et al.*, ۱۹۹۹). بررسی جمعیت‌ها از نظر انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از نرم‌افزار ۳,۴ GenePop (Raymond and Rousset, ۱۹۹۵) انجام شد. ضریب تصحیح بونفرونی نیز برای تنظیم سطح معنی‌داری تست‌ها اعمال شد (Rice, ۱۹۸۹). شاخص درون آمیزی و تمایز ژنتیکی (FST; Weir and Cockerham, ۱۹۸۴) با استفاده از نرم‌افزار ۲,۹,۳ FSTAT (Goudet, ۲۰۰۱) و شاخص تمایز RST نیز با استفاده از RSTCALC (Goodman, ۱۹۹۷) تعیین شد. بررسی رابطه بین جمعیت‌ها با استفاده از دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی Nei نیز از طریق برنامه ۱,۲,۳۰ Populations (Langella, ۲۰۰۲) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار ۳,۱ Arlequin (Excoffier *et al.*, ۲۰۰۷) نیز آنالیز واریانس مولکولی جهت تعیین نحوه توزیع تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها انجام شد.

نتایج

در پژوهش حاضر، تنوع ژنتیکی *A. nicolausi* با استفاده از شش جایگاه STRs مورد ارزیابی قرار گرفت که تمامی جایگاه‌های مورد استفاده چندشکلی نشان دادند. در مجموع، ۶۸ آلل در سطح جایگاه‌های مورد بررسی مشاهده شد. تنوع آللی ۱۱/۳ بود که جایگاه‌های $Albi^{22}$ و $LieC$ ۰,۹۰ (۱۵ آلل) بیشترین و $Albi^{61}$ (۷ آلل) کمترین تعداد آلل را نشان دادند (جدول ۱). اندازه قطعه‌های تکثیرشده بین ۹۶ تا ۳۸۰ جفت باز بود (جدول ۱). با استناد به نتایج Microchecker، خطای دسته‌بندی و امکان از دست دادن آلل‌های بزرگ در سطح جایگاه‌های مورد بررسی وجود نداشت. همچنین عدم تعادل پیوستگی معنی‌داری در هیچ‌یک از جایگاه‌ها پس از اعمال تصحیح بونفرونی مشاهده نشد ($P > 0/05$). نتایج مربوط به تعداد آلل‌های واقعی مشاهده‌شده، آلل‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار در سطح جمعیت و جایگاه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار در سطح نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب در محدوده ۰/۷۸۷ تا ۱/۰۰۰ (میانگین: ۰/۹۵۸) و ۰/۷۰۹ تا ۰/۸۹۸ (میانگین: ۰/۸۱۵) قرار داشت. تعداد آلل‌های مشاهده‌شده و مؤثر نیز به ترتیب در محدوده ۴ تا ۱۳ و ۳/۴۴ تا ۹/۸۰ بود که پایین‌ترین و بالاترین میزان برای هر دو پیراسنجه به ترتیب در سطح جایگاه‌های $Albi^{61}$ و $LieC$ ۰,۹۰ برای نمونه‌های جوشان مشاهده شد. در مقایسه بین جمعیتی، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار برای نمونه‌های جوشان به ترتیب ۰/۹۷۶ و ۰/۸۱۳ و برای نمونه‌های حوضیان به ترتیب ۰/۹۴۰ و ۰/۸۱۷ به دست آمد که از این نظر تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد ($P > 0/05$). همچنین با وجود اینکه تنوع آللی مشاهده‌شده در نمونه‌های جوشان (۷/۸۳) کمی پایین‌تر از نمونه‌های حوضیان (۸/۵۰) بود، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$; Wilcoxon). تعداد ۱۷ و ۲۱ آلل اختصاصی به ترتیب در نمونه‌های جوشان و حوضیان مشاهده شد. میانگین آلل‌های اختصاصی نیز به ترتیب ۲/۸۳ و ۳/۵۰ برای نمونه‌های جوشان و حوضیان به دست آمد. تعداد آلل‌های اختصاصی مشاهده‌شده در سطح جایگاه و جمعیت در جدول ۲ آورده شده است. اطلاعات مربوط به فراوانی آلل‌های اختصاصی نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲: پیراسنجه‌های تنوع ژنتیکی برای گونه *Alburnoides nicolausi* (استان لرستان، ۱۳۹۶).

میانگین	$LieC$ ۰,۹۰	$LieA$ ۰,۷۱	$Albi^{62}B$	$Albi^{62}A$	$Albi^{61}$	$Albi^{22}$	
A_o	۱۳	۵	۸	۸	۴	۹	
A_e	۹/۸۰	۳/۶۶	۶/۱۲	۸۸/۶	۴۴/۳	۶۴/۶	
H_o	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۸۵۷	جوشان
H_e	۰/۸۹۸	۰/۷۲۷	۰/۸۳۷	۰/۸۵۵	۰/۷۰۹	۰/۸۴۹	
A_p	۷	۲	۰	۳	۱	۴	
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	pHWE

Albi ^{۲۲}	Albi ^{۶۱}	Albi ^{۶۲A}	Albi ^{۶۲B}	LieA- ^{۰۷۱}	LieC- ^{۰۹۰}	میانگین	
-۰/۰۰۹	-۰/۴۱۰	-۰/۱۷۰	-۰/۱۹۵	-۰/۳۷۵	-۰/۱۱۴	-۰/۲۱۲	F _{is}
۱۱	۶	۸	۱۱	۷	۸	۸/۵۰	A _o
۷/۱۳	۴/۵۱	۳/۸۸	۷/۵۴	۵/۲۳	۶/۵۳	۵/۸۰	A _e
۰/۷۸۷	۱/۰۰۰	۰/۹۲۹	۱/۰۰۰	۰/۹۲۹	۱/۰۰۰	۰/۹۴۰	H _o
۰/۸۶۰	۰/۷۷۸	۰/۷۴۲	۰/۸۶۷	۰/۸۰۹	۰/۸۴۷	۰/۸۱۷	H _e
۶	۳	۳	۳	۴	۲	۳/۵۰	A _p
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	pHWE
۰/۰۸۶	-۰/۲۸۵	-۰/۲۵۱	-۰/۱۵۳	-۰/۱۴۸	-۰/۱۸۱	-۰/۱۵۵	F _{is}

A_o: تعداد آل‌های مشاهده‌شده، A_e: تعداد آل‌های مؤثر، H_o: هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، A_p: آل‌های اختصاصی، pHWE: تست احتمال تعادل هاردی-وینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی (ns: عدم معنی‌داری، *P<۰/۰۰۸، **P<۰/۰۰۱، ***P<۰/۰۰۰۱) (P<۰/۰۰۰۱).

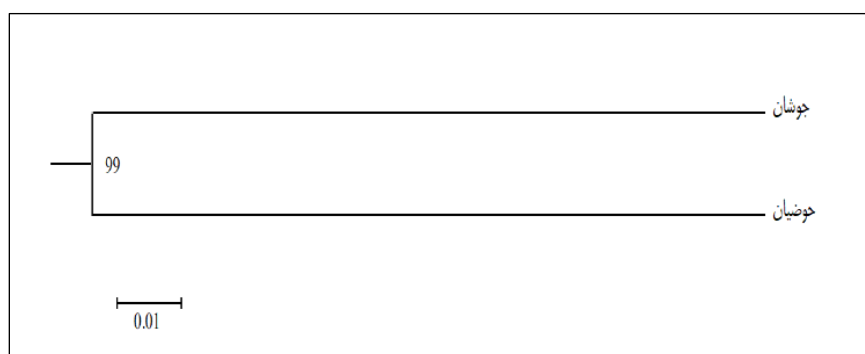
انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در سطح جمعیت-جایگاه مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۲ تست مورد ارزیابی (۲ جمعیت ۶×جایگاه)، در دو مورد انحراف معنی‌دار از تعادل وجود داشت که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، در تعادل قرار گرفت. میانگین شاخص FIS برای نمونه‌های جوشان و حوضیان به ترتیب ۰/۲۱۲- و ۰/۱۵۵- به دست آمد. تنها در نمونه‌های حوضیان در سطح جایگاه Albi^{۲۲} کسری هتروزیگوسیتی اندکی مشاهده شد (P>۰/۰۵). در این راستا، احتمال وجود آل‌های نول در سطح جایگاه‌های مورد نظر تأیید نشد. افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده نیز در جایگاه Albi^{۶۱} برای نمونه‌های جوشان و حوضیان و LieA-^{۰۷۱} برای نمونه‌های جوشان معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج مربوط به شاخص FIS در جدول ۲ نشان داده‌شده است.

در بررسی روابط ژنتیکی بین جمعیتی، میزان FST و RST به عنوان شاخص‌های تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۰۶۲ و ۰/۰۸۶ به دست آمد. با توجه به نتایج آنالیز واریانس مولکولی، ۱۸ درصد از تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در بین جمعیت‌ها وجود داشت درحالی‌که تنوع بین افراد درون جمعیت و تنوع درون افراد به ترتیب ۲/۶۳ و ۷۹/۳۷ درصد بود. در بررسی شباهت ژنتیکی بین جمعیتی، میزان این شاخص بین نمونه‌های مورد بررسی، ۰/۴۲۰ بود. همچنین میزان شاخص مهاجرت مؤثر (N_m) بین نمونه‌های مورد بررسی ۴/۳۰ به دست آمد. بر اساس دندروگرام مبتنی بر فاصله ژنتیکی نیز می‌توان بیان داشت که احتمالاً دو جمعیت مورد بررسی جدا از هم هستند (شکل ۳).

جدول ۳: اطلاعات مربوط به فراوانی آل‌های خاص برای گونه *Alburnoides nicolausi* (استان لرستان، ۱۳۹۶).

جوشان		حوضیان	
جایگاه	آل	جایگاه	آل
Albi ^{۲۲}	۱۱	Albi ^{۲۲}	۱
Albi ^{۲۲}	۱۲	Albi ^{۲۲}	۲
Albi ^{۲۲}	۱۴	Albi ^{۲۲}	۳
Albi ^{۲۲}	۱۵	Albi ^{۲۲}	۴
Albi ^{۶۱}	۱	Albi ^{۲۲}	۵
Albi ^{۶۲a}	۹	Albi ^{۲۲}	۶
Albi ^{۶۲a}	۱۰	Albi ^{۶۱}	۵
Albi ^{۶۲a}	۱۱	Albi ^{۶۱}	۶
L ^۱ ea- ^{۰۷۱}	۱	Albi ^{۶۱}	۷
L ^۱ ea- ^{۰۷۱}	۲	Albi ^{۶۲a}	۱
L ^۱ ea- ^{۰۹۰}	۹	Albi ^{۶۲a}	۳

جوشان			حوضیان		
جایگاه	آلل	فراوانی	جایگاه	آلل	فراوانی
L ¹ eC-۰۹۰	۱۰	۰/۱۰۷	Albi ^۴ ۶۲a	۴	۰/۱۰۷
L ¹ eC-۰۹۰	۱۱	۰/۰۳۶	Albi ^۴ ۶۲b	۱	۰/۱۰۷
L ¹ eC-۰۹۰	۱۲	۰/۰۳۶	Albi ^۴ ۶۲b	۴	۰/۱۴۳
L ¹ eC-۰۹۰	۱۳	۰/۰۷۱	Albi ^۴ ۶۲b	۱۱	۰/۰۳۶
L ¹ eC-۰۹۰	۱۴	۰/۰۳۶	L ¹ ea-۰۷۱	۵	۰/۲۸۶
L ¹ eC-۰۹۰	۱۷	۰/۰۳۶	L ¹ ea-۰۷۱	۷	۰/۱۴۳
			L ¹ ea-۰۷۱	۸	۰/۰۳۶
			L ¹ ea-۰۷۱	۹	۰/۰۷۱
			L ¹ eC-۰۹۰	۱	۰/۰۷۱
			L ¹ eC-۰۹۰	۲	۰/۱۴۳



شکل ۳: دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی برای گونه *Alburnoides nicolausi* (استان لرستان، ۱۳۹۶).

بحث و نتیجه‌گیری

ساختار جمعیتی گونه‌های مختلف ماهیان می‌تواند در اثر عوامل گوناگون فیزیکی و زیستی همچون ورود آلاینده‌ها، تخریب زیستگاه، جهش، درون آمیزی و ... طی زمان تغییر کند (Nasren et al., ۲۰۰۹). در این خصوص، تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از سطوح اصلی تنوع زیستی برای پایداری گونه‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر مهم بوده (Vellend and Geber, ۲۰۰۵) و کاهش تنوع ژنتیکی می‌تواند منجر به کاهش قابلیت بازمانی و افزایش احتمال انقراض به‌ویژه برای گونه‌هایی شود که با شرایط پرتنش محیطی مواجه هستند (Martinez et al., ۲۰۱۸). بنابراین، آگاهی از تنوع ژنتیکی موجود به‌ویژه برای گونه‌هایی با جمعیت‌های کوچک و یا در معرض کاهش جمعیت از اهمیت بسیاری برخوردار است. در پژوهش حاضر، تمامی جایگاه‌های مورد استفاده برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی *A. nicolausi* چندشکلی نشان دادند. در ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، هتروزایگوسیتی و تعداد آلل‌های مشاهده‌شده به‌عنوان پیراسنجه‌های مهم مطرح بوده و مرتبط با ویژگی‌های مهمی همچون رقابت و بقا می‌باشند (Hakansson and Jensen, ۲۰۰۵). هر هتروزایگوت ناقل آلل‌های متفاوت بوده و نشان‌دهنده تنوع می‌باشد. با این وجود، از آنجایی که هتروزایگوسیتی نسبت به تنوع آللی کمتر تحت تأثیر اندازه جمعیت می‌باشد، این شاخص ممکن است در جمعیت‌هایی که در معرض اندازه پایین جمعیت مؤثر و یا تنگنای ژنتیکی قرار دارند، همچنان در سطح بالایی قرار داشته باشد (Petit et al., ۱۹۹۸). Cardova-

Alarcon و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیان داشتند که هتروزایگوسیتی ممکن است در شرایط وجود برخی عوامل همچون تغییرات دموگرافیک، زیرساختارهای جمعیتی و جریان ژنی افزایش موقت و ناپایداری نشان دهد. در این خصوص، تنوع آلی شاخص مناسب‌تری در تعیین سطح تنوع جمعیت‌ها بوده و بالا بودن آن نشان‌دهنده بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر است (Diz and Presa, ۲۰۰۹). در این پژوهش، میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۹۵۸ و ۰/۸۱۵ به دست آمد. در مقایسه بین جمعیتی نیز، تفاوت معنی‌داری از نظر هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار بین نمونه‌های جوشان و حوضیان مشاهده نشد ($P > 0.05$ Wilcoxon). در بررسی تنوع آلی، میانگین آل‌های مشاهده‌شده ۸/۱۶ بود. در این راستا، باوجود بالاتر بودن تعداد آل‌های مشاهده‌شده در نمونه‌های جوشان نسبت به نمونه‌های حوضیان تفاوت موجود از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$ Wilcoxon). در این راستا حقیقی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی ساختار ژنتیکی *Alburnoides echiwaldii* در گرگان رود و چالوس، میانگین آلی را ۴/۸۶ گزارش کردند که پایین‌تر از میزان مشاهده‌شده، در این پژوهش بود. این در حالی است که جهانگیری و همکاران (۱۳۹۳) در مقایسه ژنتیکی دو جمعیت *A. echiwaldii* در استان گلستان، تنوع آلی قابل‌توجهی (۱۶/۵) را گزارش نمودند. همچنین میزان هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده (۰/۹۶) در پژوهش حقیقی و همکاران (۱۳۹۳) تقریباً مشابه با میزان مشاهده‌شده در پژوهش حاضر بود درحالی‌که این میزان توسط جهانگیری و همکاران (۱۳۹۳) کمی پایین‌تر (۰/۸۳۳) گزارش شد. در بررسی دیگری روی گونه *Alburnoides bipunctatus* در آب‌های جمهوری چک، تنوع آلی و هتروزایگوسیتی پایینی گزارش شد (به ترتیب ۵/۴۱ و ۰/۴۳) (Mendel et al., ۲۰۰۸). متأسفانه، تاکنون گزارشی در خصوص وضعیت ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *A. nicolausi* منتشر نشده تا به توان با داده‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق مقایسه نمود. بااین‌حال، با توجه به مطالعه مروری انجام‌شده توسط DeWoody و Avise (۲۰۰۰) روی ۱۳ گونه آب شیرین (میانگین آلی و هتروزایگوسیتی به ترتیب: ۷/۵ و ۰/۴۶) به نظر می‌رسد نمونه‌های *A. nicolausi* در مناطق موردبررسی، از سطح تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار باشند.

جمعیت‌ها ممکن است تحت تأثیر پدیده‌هایی مانند جفت‌گیری غیر تصادفی و به‌گزینی، اثر وهلاند و ترکیب دو جمعیت مختلف، درون آمیزی و رانش ژنتیکی (Li et al., ۲۰۰۷) و یا برخی عوامل دیگر همچون تعداد کم نمونه، اشتباه در تفسیر آل‌ها مانند وجود آل‌های نول (Borrell et al., ۲۰۰۸) انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دهند. در پژوهش حاضر در ارزیابی جمعیت‌ها از نظر تعادل هاردی-وینبرگ، ۲ مورد از تست‌های موردنظر انحراف از تعادل نشان دادند که پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی انحراف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در یک مورد برای نمونه‌های حوضیان در سطح جایگاه Albi^{۲۲} کسری هتروزایگوسیتی اندکی مشاهده شد (FIS: ۰/۰۸۶). در این خصوص، احتمال وجود آل نول تأیید نشد. در سطح جایگاه Albi^{۶۱} برای نمونه‌های جوشان و حوضیان و همچنین LiEa-۰۷۱ برای نمونه‌های جوشان نیز افزایش هتروزایگوسیتی معنی‌داری مشاهده شد. اشتباه هنگام خوانش آل‌ها، خطای پی‌سی آر و انحراف تصادفی از عوامل بروز افزایش هتروزایگوسیتی هستند (Li et al., ۲۰۰۹). با توجه به نتایج، احتمال خطا هنگام خوانش رد شد. همچنین شرایط پی‌سی آر نیز برای جایگاه‌های موردبررسی بهینه بود. در این راستا، انحراف تصادفی را شاید به توان به‌عنوان یک عامل بالقوه در نظر گرفت. در مطالعات پیشین صورت گرفته توسط کشیری و همکاران (۱۳۹۴)، رضایی و همکاران (۱۳۹۱) و Kashiri و همکاران (۲۰۱۹) روی سایر گونه‌های آب شیرین نیز انحراف تصادفی به‌عنوان یک عامل بالقوه در بروز افزایش هتروزایگوسیتی بیان شده است. به‌هرحال، کسری و افزایش هتروزایگوسیتی در جمعیت‌های طبیعی پدیده‌های پیچیده‌ای بوده که نمی‌توان به‌تنهایی با یک عامل آن را توجیه نمود و احتمالاً ترکیبی از عوامل مختلف می‌توانند در این زمینه تأثیرگذار باشند.

بر اساس مطالعات انجام‌شده، در جمعیت‌های کوچک احتمال وقوع رانش ژنتیکی وجود داشته که این امر باعث افزایش تمایز ژنتیکی می‌گردد (Zhai et al., ۲۰۱۹). در پژوهش حاضر، تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های *A. nicolausi* با استفاده از پیراسنجه‌های FST و RST ارزیابی شد. با توجه به معیار Wright (۱۹۷۸) میزان FST بین ۰ تا ۰/۰۵، ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ و ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ به ترتیب نمایانگر تمایز جمعیتی پایین، تمایز و تفکیک جمعیتی متوسط و درنهایت اختلاف ژنتیکی بالا می‌باشد. جمعیت‌های کوچک به دلیل این که بیشتر مستعد رانش ژنتیکی هستند در پژوهش

حاضر، میزان F_{ST} ، ۰/۰۶۲ به دست آمد که معنی‌دار بود و با توجه به معیار Wright (۱۹۷۸) نشان‌دهنده سطح متوسطی از تمایز ژنتیکی بین جمعیتی است. در این ارتباط Wachirachakarn و همکاران (۲۰۰۹) بیان داشتند که شاخص R_{ST} به دلیل استفاده از اطلاعات اندازه آللی پیراسته کارآمدتری در برآورد تمایز جمعیت می‌باشد. در این پژوهش میزان R_{ST} بین نمونه‌های مورد بررسی ۰/۰۸۶ به دست آمد که کمی بالاتر از میزان مشاهده‌شده برای F_{ST} بود. بر اساس Hardy و همکاران (۲۰۰۳) و Slatkin (۱۹۹۵) میزان R_{ST} تحت مدل جهش SMM، بالاتر از F_{ST} می‌باشد. به‌هرحال، در شرایط نرخ بالای مهاجرت و کوتاه بودن زمان جدایی جمعیت‌ها که تمایز وابسته به مدل جهش نباشد، میزان دو شاخص F_{ST} و R_{ST} می‌تواند نزدیک به هم نیز باشد (Rousset, ۱۹۹۶). آنالیز واریانس مولکولی در پژوهش حاضر نشان داد که بخش عمده تنوع مشاهده‌شده مربوط به درون افراد جمعیت می‌باشد. در این خصوص Diz و Presa (۲۰۰۹) بیان داشتند که در صورتی که تنوع بین جمعیت‌ها پایین‌تر از تنوع درون جمعیتی باشد، در بین جمعیت‌ها ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد. باین‌حال، ۱۸ درصد از کل تنوع بین جمعیت‌ها مشاهده شد که میزان قابل‌توجهی می‌باشد. همچنین در بین ۶۸ آلل مشاهده‌شده در نمونه‌های مورد بررسی، تعداد قابل‌توجهی آلل اختصاصی در جمعیت‌ها مشاهده شد به‌نحوی که به ترتیب ۱۷ و ۲۱ آلل اختصاصی در نمونه‌های جوشان و حوضیان وجود داشت. شاخص N_m نیز که بیانگر سطح تبادلات ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Zhang et al., ۲۰۲۰)، ۴/۳۰ به دست آمد. این امر حاکی از آن است که مهاجرت بالایی بین نمونه‌های مورد بررسی وجود ندارد. در این راستا، هر چه نرخ مهاجرت بین جمعیت‌ها بالاتر، تنوع بین جمعیتی و میزان شاخص‌های تمایز جمعیتی نیز پایین‌تر می‌باشد (Pinera et al., ۲۰۰۷). درواقع، هر چه تبادل بین افراد بیشتر، تبادل ژن‌ها نیز بیشتر و در نتیجه تمایز بین جمعیت‌ها پایین‌تر می‌شود. نتایج حاصل از بررسی فاصله و شباهت ژنتیکی نیز مؤید وجود فاصله ژنتیکی قابل‌توجه بین نمونه‌های جوشان و حوضیان می‌باشد. روی‌هم‌رفته با توجه به نتایج حاصل از روابط ژنتیکی و همچنین دندروگرام مبتنی بر فاصله ژنتیکی به نظر می‌رسد نمونه‌های مورد بررسی احتمالاً متعلق به دو جمعیت جدا باشند. در این راستا حقیقی و همکاران (۱۳۹۳) نیز دو جمعیت متمایز از *Alburnoides echiwaldii* را در رودخانه‌های کرگان رود و چالوس شناسایی کردند. این در حالی است که Mendel و همکاران (۲۰۰۸) شباهت ژنتیکی بالایی را برای گونه *Alburnoides bipunctatus* در آب‌های جمهوری چک گزارش نمودند. به‌هرحال جهت اظهار نظر قطعی در خصوص امکان متمایز بودن جمعیت‌های *A. nicolausi* انجام مطالعات تکمیلی، شناسایی رفتارها و ویژگی‌های بیولوژیکی این گونه ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر به نظر می‌رسد *A. nicolausi* به‌عنوان یک گونه آب شیرین از تنوع آللی و ژنی مطلوبی برخوردار بوده و احتمالاً جمعیت‌های جدایی را در رودخانه‌های مورد بررسی تشکیل می‌دهند. باین‌حال، با توجه به مسائلی همچون خشک‌سالی، ورود آلودگی‌های مختلف و تغییر شرایط زیستگاهی، ممکن است تنوع مشاهده‌شده و بقای این گونه ارزشمند بومی در درازمدت تحت تأثیر قرار گیرد. با در نظر گرفتن این موضوع و همچنین با توجه به عدم وجود اطلاعات کافی در ارتباط با گونه *A. nicolausi*، انجام مطالعات و بررسی‌های تکمیلی در خصوص نیازها و ویژگی‌های زیستی و اکولوژیکی و همچنین شرایط محیطی حاکم بر رودخانه‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد، چراکه این اطلاعات برای حفاظت از ذخایر ماهیان آب شیرین کشور از اهمیت بالایی برخوردار است.

منابع

- جولاده، آ.، رحمانی، ح.، وطن‌دوست، ص.، نجفی، م. و رحیمی، ق.، ۱۳۹۴. بازنگری آرایه‌شناسی چهار گونه توصیف‌شده از جنس *Alburnoides* با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۵ (۲): صفحات ۱۷-۱.
- جهانگیری، ل.، شعبانی، ع. و رضایی، ح. ر.، ۱۳۹۳. مقایسه ژنتیکی دو جمعیت ماهی خیاخه (*Alburnoides eichwaldi*) در رودخانه‌های تیل‌آباد و شیرآباد گلستان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. فصلنامه علمی-پژوهشی محیط‌زیست جانوری، ۶ (۱): صفحات ۴۳-۳۵.

- حقیقی، ا.، ستاری، م.، درافشان، س. و کیوانی، ی.، ۱۳۹۳. ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides echiwaldii*) در رودخانه‌های گرگان رود و چالوس. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۶ (۱۹): صفحات ۱۴-۱.
- رضایی، م.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب. و کشیری، ح.، ۱۳۹۱. تنوع ریز ماهواره‌ای و ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید *Rutilus Frisii kutum* در سواحل استان مازندران. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۵ (۴): صفحات ۵۴۸-۵۵۸.
- صادقی، ح.، شجیعی، ه. و شرقی، ش.، ۱۳۹۱. شناسایی فون و بررسی پراکنش ماهیان قنات‌های شهرستان شاهرود. زیست‌شناسی جانوری، ۵ (۲): صفحات ۷۷-۶۳.
- کشیری، ح.، شعبانی، ع. و قدسی، ز.، ۱۳۹۴. بررسی ساختار جمعیتی *Oxynoemacheilus angorae* (Steindachner, ۱۸۹۷) در رودخانه‌های قشلاق (استان کردستان)، سفید برگ و گاماسیاب (استان کرمانشاه) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۵ (۳): صفحات ۱۱-۱.
- Abdul-moneer, P. M., ۲۰۱۴. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation Strategies. Genetics Research International, PP. ۱-۱۱.
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J. and Bonhomme, F., ۱۹۹۹. Genetix: software for Windows for population genetics, Version ۴.۰۲. Montpellier (France): Laboratory Genome and Pollution, CNRS-UPR, University of Montpellier II (in French).
- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P. and Mergeai, G., ۲۰۰۶. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, ۱۰: ۷۷-۸۱.
- Bogutskaya, N. G. and Coad, B. W., ۲۰۰۹. A review of vertebral and fin-ray counts in the genus *Alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae) with a description of six new species. Zoosystematica Rossica, ۱۸: ۱۲۶-۱۷۳.
- Borrell, Y. J., Bernardo, D., Blanco, G., Vazquez, E. and Sanchez, J. A., ۲۰۰۸. Spatial and temporal variation of genetic diversity and estimation of effective population sizes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations from Asturias (Northern Spain) using microsatellites. Conservation Genetics, ۹: ۸۰۷-۸۱۹.
- Cardova-Alarcon, V., Araneda, C., Jilberto, F., Magnolfi, P., Toledo, M. I. and Lam, N., ۲۰۱۹. Genetic diversity and population structure of *Genypterus chilensis*, a commercial benthic marine species of the South Pacific. Frontiers in Marine Science, ۶: ۱-۱۲.
- Chiou, C. Y., Shih, H. C., Tsai, C. C., Jin, X. L., Ko, Y. Z., Mantiquilla, J. A. and Weng, I. S. and Chiang, Y. C., ۲۰۲۰. The genetic relationships of Indian jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) cultivars using SSR markers. Heliyon, ۶: e۰۵۰۷۸.
- Coad, B. W. and Bogutskaya, N. G., ۲۰۰۹. *Alburnoides qanati*, a new species of cyprinid fish from southern Iran (Actinopterygii, Cyprinidae). ZooKeys, ۱۳: ۶۷-۷۷.
- Coad, B. W. and Bogutskaya, N. G., ۲۰۱۲. A new species of riffle minnow, *Alburnoides holciki*, from the Hari River basin in Afghanistan and Iran (Actinopterygii: Cyprinidae). Zootaxa, ۳۴۵۳: ۴۳-۵۵.
- Coad, B. W., ۲۰۱۳. Freshwater fishes of Iran. Available at: <http://www.briancoad.com>.
- Curto, M. A., Tembrock, L. R., Puppo, P., Nogueira, M., Simmons, M. P. and Meimberg, H., ۲۰۱۳. Evaluation of microsatellites of *Catha edulis* (qat; Celastraceae) identified using pyrosequencing. Biochemical Systematics and Ecology, ۴۹: ۱-۹.
- DeWoody, J. A. and Avise, J. C., ۲۰۰۰. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compares with other animals. Journal of Fish Biology, ۵۶: ۴۶۱-۴۷۲.
- Diz, A. P. and Presa, P., ۲۰۰۹. The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). Aquaculture, ۲۸۷: ۲۷۸-۲۸۵.
- Dubut, V., Martin, J. F., Gilles, A., Van Houdt, J., Chappaz, R. and Costedoat, C., ۲۰۰۹. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the dace complex: *Leuciscus leuciscus* (Teleostei: Cyprinidae). Molecular Ecology Recourses, ۹: ۱۱۷۹-۱۱۸۳.

- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., ۲۰۰۷.** Arlequin (version ۳.۰): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, ۱: ۴۷-۵۰.
- Freyhof, J., ۲۰۱۱.** *Alburnoides maculatus*. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T۱۸۴۴۵۳A۸۲۷۸۸۳۸.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J. A. and Brook, B. W., ۲۰۱۴.** Genetics in conservation management: Revised recommendations for the ۵۰/۵۰۰ rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, ۱۷۰: ۵۶-۶۳.
- Freyhof, J. and Kottelat, M., ۲۰۰۸.** *Alburnoides ohridanus*. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T۱۳۵۶۱۷A۴۱۶۳۰۹۹.
- Geist, J., Kolahsa, M., Gum, B. and Kuehn, R., ۲۰۰۹.** The importance of genetic cluster recognition for the conservation of migratory fish species: the example of the endangered European huchen *Hucho hucho* (L.). *Journal of Fish Biology*, ۷۵: ۱۰۶۳-۱۰۷۸.
- Goodman, S. J., ۱۹۹۷.** RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, ۶: ۸۸۱-۸۸۵.
- Goudet, J., ۲۰۰۱.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version ۲.۹.۳). Available from <http://www.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E. and Salin, F., ۲۰۱۱.** Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, ۱۱(۴): ۵۹۱-۶۱۱.
- Hakansson, J. and Jensen, P., ۲۰۰۵.** Behavioural and morphological variation between captive populations of red jungle fowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. *Biological Conservation*, ۱۲۲: ۴۳۱-۴۳۹.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Freville, H. and Heuertz, M., ۲۰۰۳.** Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, ۱۶۳(۴): ۱۴۶۷-۱۴۸۲.
- Kashiri, H., Shabani, A., Gorgin, S., Rezaei, M. and Jabale, A. R., ۲۰۱۹.** Temporal stability of genetic diversity revealed by microsatellite markers in restocked populations of Caspian roach, *Rutilus caspicus* (Yakovlev, ۱۸۷۰). *Animal Biology*, ۶۹: ۳۲۷-۳۴۷.
- Kottelat, M. and Freyhof, J., ۲۰۰۷.** Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. ۶۴۶ pp.
- Langella, O., ۲۰۰۲.** Population genetic software, POPULATIONS ۱.۲.۳. Retrieved from <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>.
- Li, Q., Xu, K. and Yu, R., ۲۰۰۷.** Genetic variation in Chinese's hatchery populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) inferred from microsatellite data. *Aquaculture*, ۲۹۶: ۲۱۱-۲۱۹.
- Li, J., Wang, G. and Bai, Z., ۲۰۰۹.** Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, ۲۸۷: ۲۸۶-۲۹۱.
- Martinez, A. S., Willoughby, J. R. and Christie, M. R., ۲۰۱۸.** Genetic diversity in fishes is influenced by habitat type and life-history variation. *Ecology and Evolution*, ۸(۲۳): ۱۲۰۲۲-۱۲۰۳۱.
- Mendel, J., Lusk, S., Halacka, K., Luskova, V., Vetesnik, L., Caleta M. and Ruchin, A., ۲۰۰۸.** Genetic diversity of spirin, *Alburnoides bipunctatus*, with notes on its occurrence. *Biodiversita Ichtyofauna CR*, ۷: ۲۵-۳۷.
- Mkare, T. K., Vuuren, J. and Teske, P. R., ۲۰۱۷.** Conservation implications of significant population differentiation in an endangered estuarine seahorse *Biodiversity and Conservation*, ۲۶: ۱۲۷۵-۱۲۹۳.
- Mousavi-Sabet, H., Anvarifar, H. and Azizi, F., ۲۰۱۵a.** *Alburnoides tabarestanensis*, a new species of riffle minnow from the southern Caspian Sea basin in Iran (Actinopterygii: Cyprinidae). *International Journal of Ichthyology*, ۲۱: ۱۴۴-۱۵۲.
- Mousavi-Sabet, H., Vatandoust, S. and Doadrio, I., ۲۰۱۵b.** Review of the genus *Alburnoides Jeitteles*, ۱۸۶۱ (Actinopterygii, Cyprinidae) from Iran with description of three new species from the Caspian Sea and Kavir basins. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, ۱۳(۴): ۲۹۳-۳۳۱.

- Mousavi-Sabet, H., Heidari, A. and Vatandoust, S., ۲۰۱۷.** Length-weight and length-length relationships for ۱۱ species of the genus *Alburnoides* Jeitteles, ۱۸۶۱ (Cyprinidae) from Iran. *Journal of Applied Ichthyology*, ۳۳(۳): ۶۰۹-۶۱۲.
- Nasren, S. H., Islam, M. N., Quader Khan, M. G., Islam, M. D. S. and Alam, M. D. S., ۲۰۰۹.** Genetic variation and differentiation in the Stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch), population assessed by heterologous microsatellite DNA markers. *Indian Journal of Biotechnology*, ۸: ۸۵-۹۰.
- Nei, M., ۱۹۷۸.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*, ۸۹: ۵۸۳-۵۹۰.
- Peakall, R. and Smouse, P. E., ۲۰۰۶.** GenAlEx ۶: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Molecular Ecology Notes*, ۶: ۲۸۸-۲۹۵.
- Petit, R. J., Mousadik, A. E. and Pons, A. O., ۱۹۹۸.** Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, ۱۲: ۸۴۴-۸۵۵.
- Pinera, J. A., Blanco, G., Vázquez, E. and Sanchez, J. A., ۲۰۰۷.** Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology*, ۱۵۱: ۲۱۵۳-۲۱۵۸.
- Raymond, M. and Rousset, F., ۱۹۹۵.** GENEPOP (version ۱.۲): population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, ۸۶: ۲۴۸-۲۴۹.
- Rezamand, A., Pouladi, M., Qadermarzi, A., Ghorbani, R. and Mohammadi Movahed, M., ۲۰۱۸.** Length-weight relationships of two endemic species of *Alburnoides nicolausi* (Bogutskaya & Coad, ۲۰۰۹) and *Alburnus zagrosensis* (Coad, ۲۰۰۹) in Houzian River, Lorestan Province, Iran. *Journal of Applied Ichthyology*, ۳۴(۳): ۷۵۸-۷۵۹.
- Rice, W. R., ۱۹۸۹.** Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, ۴۳: ۲۲۳-۲۲۵.
- Rosenfeld, J., ۲۰۰۳.** Assessing the habitat requirement of stream fishes: an overview and evaluation of different approaches. *Transaction of the American Fisheries Society*, ۱۳۲: ۹۵۲-۹۶۸.
- Rousset, F., ۱۹۹۶.** Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, ۱۴۲: ۱۳۵۷-۱۳۶۲.
- Slatkin, M., ۱۹۹۵.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, ۱۳۹: ۴۵۷-۴۶۲.
- Sundaray, J. K., Rasal, K. D., Chakrapani, V., Swain, P., Kumar, D., Ninawe, A. S., Nandi, S. and Jayasankar, P., ۲۰۱۶.** Simple sequence repeats (SSRs) markers in fish genomic research and their acceleration via nextgeneration sequencing and computational approaches. *Aquaculture International*, ۲۴(۴): ۱۰۸۹-۱۱۰۲.
- Tibihika, P. D., Curto, M., Dornstauder-Schrammel, E., Winter, S., Alemayehu, E., Waidbacher, H. and Meimberg, H., ۲۰۱۹.** Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. *Conservation Genetics*, ۲۰: ۳۵۷-۳۷۲.
- Urbankova, S., Mendel, J. and Vyskocilova, M., ۲۰۱۳.** Microsatellite loci for population studies of the genus *Alburnoides* and four other critically endangered and vulnerable cyprinids in the Czech Republic. *Molecular Ecology Research*, ۱۳(۳): ۵۴۶-۵۴۹.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F. D., Wills, D. P. M. and Shipley, P., ۲۰۰۴.** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, ۴: ۵۳۵-۵۳۸.
- Vellend, M. and Geber, M. A., ۲۰۰۵.** Connections between species diversity and genetic Diversity. *Ecology Letters*, ۸(۷): ۷۶۷-۷۸۱.
- Wachirachaikarn, A., Rungsin, W., Srisapoome, P. and Na-Nakorn, U., ۲۰۰۹.** Crossing of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, ۱۸۲۲), strains based on strain selection using genetic diversity data. *Aquaculture*, ۲۹۰: ۵۳-۶۰.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C., ۱۹۸۴.** Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, ۳۸: ۱۳۵۸-۱۳۷۰.
- Wright, S., ۱۹۷۸.** *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. ۴: Variability within and among natural populations. Chicago, USA, University of Chicago Press, ۵۹۰ pp.

- Xia, J. H., Wan, Z. Y., Ng, Z. L., Wang, L., Fu, G. H., Lin, G., Feng, L. and Gen, H. Y., ۲۰۱۴.** Genome-wide discovery and in silico mapping of gene-associated SNPs in Nile tilapia. *Aquaculture*, ۴۳۲: ۶۷-۷۳.
- Xia, J. H., Bai, Z., Meng, Z., Zhang, Y., Wang, L., Liu, F., Jing, W., Wan, Z. Y., Li, J., Lin, H. and Yue, G. H., ۲۰۱۵.** Signatures of selection in tilapia revealed by whole genome resequencing *Scientific Reports*, ۵: ۱۴۱۶۸.
- Yang, W., Dan, Y. and Xinzhi, L., ۲۰۲۰.** Genetic Diversity of *Toona ciliata* Populations Based on SSR Markers. *Journal of Resources and Ecology*, ۱۱(۵): ۴۶۶-۴۷۴.
- Zhai, D., Zhang, Z., Zhang, F., Liu, H., Cao, W. and Gao, X., ۲۰۱۹.** Genetic diversity and population structure of a cyprinid fish (*Ancherythroculter nigrocauda*) in a highly fragmented river. *Applied Ichthyology*, ۳۵(۳): ۱-۸.
- Zhao, N., Ai, W., Shao, Z. I., Zhu, B., Brosse, S. and Chang, J., ۲۰۰۵.** Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, ۲۱: ۷-۱۳.
- Zhang, Q., Sun, C., Zhu, Y., Xu, N. and Liu, H., ۲۰۲۰.** Genetic diversity and structure of the round-tailed paradise fish (*Macropodus ocellatus*): Implications for population management. *Global Ecology and Conservation*. ۲۱: e۰۰۸۷۶.
- Zar, J. H., ۲۰۱۰.** Biostatistical Analysis. ۵th Edition. Pearson, Prentice Hall, NJ, USA.

