



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۹۶

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید *Rutilus kutum* Kamensky, 1901 با استفاده از ده نشانگر ریزماهوره

حدیثه کشیری^{۱*}، علی شعبانی^۲، سعید گرگین^۱، محمد رضایی^۳ و احمدرضا جبله^۳

^۱استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۱۱/۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۹

چکیده

ماهی سفید (*R. kutum*) یکی از مهم‌ترین ماهیان استخوانی دریای خزر بوده که بازسازی ذخایر آن از طریق رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی به طبیعت انجام می‌گیرد. در بررسی حاضر، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی (خلیج گرگان و گمیشان) و کارگاهی مورد استفاده در بازسازی ذخایر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. بدین منظور از ده جایگاه ریزماهوره استفاده شد که همگی چند شکلی نشان دادند. میانگین آللی برای نمونه‌های وحشی گمیشان و خلیج گرگان و همچنین نمونه‌های کارگاهی به ترتیب ۰/۹/۹، ۰/۸/۹ و ۰/۷۹۸، ۰/۷۲۸ و ۰/۷۹۸، ۰/۸۰، ۰/۷۹۸ و ۰/۷۲۸ برای نمونه‌های وحشی گمیشان و خلیج گرگان و نمونه‌های کارگاهی به دست آمد. با وجود پایین‌تر بودن تنوع آللی و هتروزیگوسیتی نمونه‌های کارگاهی نسبت به وحشی، تفاوت معنی‌داری از این لحاظ مشاهده نشد. از ۳۰ تست مورد ارزیابی، ۲۶ مورد انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دادند. همچنین کسری هتروزیگوسیتی بالایی در برخی از جایگاه‌ها مشاهده شد. متوسط میزان F_{st} و R_{st} به‌عنوان شاخص‌هایی از تمایز ژنتیکی به ترتیب ۰/۰۱۸ و ۰/۰۴۴ بدست آمد که حاکی از تمایز پایین بین نمونه‌های مورد بررسی بود. بالاترین میزان فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های کارگاهی و خلیج گرگان مشاهده شد. بر طبق نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام UPGMA نیز نمونه‌های وحشی در گروهی جدا از نمونه‌های کارگاهی قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد جمعیت‌های وحشی ماهی سفید در مناطق مورد بررسی از غنای آللی و تنوع ژنی مناسبی

* نویسنده مسئول: hadiskashiri@gmail.com

برخوردار می‌باشند. با این وجود باتوجه به تداوم برنامه‌های بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی، ایجاد تدابیر مناسبی جهت حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده در جمعیت‌های وحشی امری ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *R. kutum*، ساختار ژنتیکی، جمعیت وحشی، جمعیت کارگاهی

مقدمه

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus kutum* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ماهیان استخوانی دریای خزر با بازار پسندی بالا در منطقه مطرح می‌باشد. این گونه بالاترین میزان صید ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر را تشکیل می‌دهد (Abdoli, 2000; Esmaeili et al., 2014). تحقیقات صورت گرفته حاکی از نوسانات چشمگیر ذخایر این گونه با ارزش طی دهه‌های گذشته در دریای خزر می‌باشد. در این خصوص بالاترین میزان صید ثبت شده طی دهه‌های گذشته در سال ۱۳۱۸ (۵۸۵۴ تن) بوده است، این در حالیست که طی سال‌های بعد بنا به دلایل مختلف همچون صید بی‌رویه، نامساعد شدن مناطق تخم‌ریزی طبیعی، ورود آلاینده‌های مختلف و همچنین کاهش سطح آب دریای خزر میزان صید ماهی سفید روند کاهشی نشان داد به‌نحوی که به حداقل میزان خود در اوایل دهه ۶۰ (حدود ۳۵۰ تن) رسید (Ghaninezhad et al., 1999). در این راستا، شیلات ایران از سال ۱۳۶۱ اقدام به بازسازی ذخایر ماهی سفید از طریق رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی نموده است. بیش از ۳۰ سال از رهاسازی انبوه بچه ماهیان سفید در دریای خزر می‌گذرد و طی این مدت سهم تکثیر طبیعی در ذخایر موجود ماهی سفید روند کاهشی داشته است (Khanipour and Valipour, 2011). در حال حاضر بخش قابل توجهی از ذخایر ماهی سفید در حوضه جنوبی دریای خزر از تکثیر مصنوعی می‌باشد (Razavi, 2003; Khanipour and Valipour, 2011). اگرچه تکثیر مصنوعی به عنوان روشی معمول در احیای ذخایر ماهیان شناخته شده اما همچنان میزان اثر بخشی این روش و اثرات احتمالی آن بر جمعیت‌های طبیعی مورد بحث بسیاری از محققین می‌باشد (Araki et al., 2011; Einum and Fleming, 2001; Araki et al., 2007; 2008; Berntson et al., 2011). لاروهای تولید شده در شرایط کارگاهی به طبیعت می‌تواند اثرات ژنتیکی پیچیده و غیر قابل پیش‌بینی در بر داشته باشد (Reisenbichler et al., 2004). در این خصوص یکی از فاکتورهای ضروری برای موفقیت چنین برنامه‌هایی، وجود سطح مناسبی از تنوع ژنتیکی می‌باشد. اندازه جمعیت موثر پایین و اثر فاندوم همچون استفاده از تعداد محدودی مولد برای تکثیر مصنوعی می‌تواند منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های کارگاهی گردد (Loukovitis et al., 2015). از آنجایی که تنوع ژنتیکی نمایان‌گر ساختار و پتانسیل بازمانی جمعیت‌ها می‌باشد (Frankham et al., 2010)، آگاهی از ساختار و تنوع ژنتیکی ماهیان مورد استفاده در برنامه‌های بازسازی ذخایر امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

یکی از ابزارهایی که به‌طور موفقیت‌آمیزی در مطالعات ژنتیکی ماهیان کاربرد یافته است، نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد (Piorski *et al.*, 2008). ریزماهواره‌ها، نمایان‌گر نوع خاصی از توالی‌های ژنومی تکراری و پشت‌سر هم می‌باشند که به فراوانی در سراسر ژنوم وجود دارند (Selkoe and Toonen, 2006). این نشانگرها به‌دلیل سطح بالای چند شکلی (Liu *et al.*, 2009) و همچنین تبعیت از توارث مندلی، چند شکلی بالا، قابلیت تکثیر خوب (Ferreira *et al.*, 2014) و همچنین مدل‌های تکاملی ساده (Hughes and Simons, 2015; Yi *et al.*, 2015) کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌های مختلف ماهیان یافته‌اند (Kaczmarczyk and Wolnicki, 2016). لذا در بررسی حاضر از نشانگرهای ریزماهواره جهت ارزیابی ساختار ژنتیکی ماهی سفید استفاده شد. در این راستا، مطالعات صورت گرفته روی ماهی سفید محدود به جمعیت‌های وحشی موجود در برخی نواحی جنوبی دریای خزر بوده که شامل بررسی‌های انجام شده توسط رضایی و همکاران (Rezaii *et al.*, 2010 and 2012) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و کلنگی میاندره و همکاران (Kolangi-Miandare *et al.*, 2015) با استفاده از ژن سیتوکروم b می‌باشد. تاکنون بررسی در خصوص تعیین ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کارگاهی مورد استفاده در بازسازی ذخایر ماهی سفید و همچنین جمعیت‌های موجود در مناطق خلیج گرگان و گمیشان صورت نپذیرفته است. بنابراین در تحقیق حاضر با توجه به اهمیت بالای ماهی سفید و همچنین با در نظر گرفتن اهمیت ارزیابی مداوم و آگاهی از وضعیت ژنتیکی گونه‌های تحت برنامه‌های بازسازی ذخایر، به ارزیابی و مقایسه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی (خلیج گرگان و گمیشان) و کارگاهی ماهی سفید پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در بهار ۱۳۹۴ از تعداد ۶۰ قطعه ماهی سفید (*R. kutum*) نمونه‌برداری به عمل آمد که در این میان ۳۰ قطعه متعلق به تالاب گمیشان و ۳۰ قطعه متعلق به خلیج گرگان بود. همچنین تعداد ۳۰ قطعه ماهی سفید موجود در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال واقع در استان گلستان (ماهیان مورد استفاده در بازسازی ذخایر ماهی سفید) نیز مورد نمونه‌برداری قرار گرفت. به‌منظور انجام آنالیز مولکولی، بخشی از باله دمی هر نمونه جداسازی و به‌طور مجزا در تیوب‌های حاوی اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبیان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافت. DNA هر نمونه با استفاده از کیت مخصوص (Gene All) مطابق با پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید. رسوب DNA بدست آمده در آب مقطر استریل حل و تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دمای 20°C - نگهداری شد. به‌منظور اطمینان از

کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها تحت الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد قرار گرفتند. همچنین کمیت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه بایوفتومتر (Eppendorf, Germany) تعیین گردید. براساس مطالعات انتشار یافته، از تعداد ده جایگاه ریزماهوره جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده گردید: Ca1, Ca3 (Dimsoski *et al.*, 2000), CypG3, CypG24, CypG27, CypG30 (Baerwald and May, 2004), Rru4, Rru1, Lid1 (Barinova *et al.*, 2004) و Z21908 (<http://zfin.org>). ویژگی‌های مربوط به هر یک از جایگاه‌های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. برای انجام PCR، میزان ۲۵/۶ میکرولیتر کیت مخصوص PCR (Jena Bioscience) و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس به ۲ میکرولیتر از DNA هر نمونه اضافه شد. پس از افزودن ۲۵/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل برای رسیدن به حجم نهایی ۵/۱۲ میکرولیتر، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio-RAD MJ Mini Thermal Cycler, USA) قرار گرفتند. شرایط چرخه دمایی برای هر یک از جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات مربوط به ده جایگاه ریزماهوره مورد استفاده برای ماهی سفید (*R. kutum*)

توالی	کد دستیابی در بانک ژن	دمای اتصال ($^{\circ}\text{C}$)	جایگاه ریزماهوره
F: AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC R: CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA	AF277573	۵۵	Ca1
F: GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC R: TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG	AF277575	۵۲	Ca3
F: AGT AGG TTT CCC AGC ATC ATT GT R: GAC TGG ACG CCT CTA CTT TCA TA	AY439122	۵۹	CypG3
F: CTG CCG CAT CAG AGA TAA ACA CTT R: TGG CGG TAA GGG TAG ACC AC	AY439142	۵۸	CypG24
F: AAG GTA TTC TCC AGC ATT TAT R: GAG CCA CCT GGA GAC ATT ACT	AY439145	۴۹	CypG27
F: GAA AAA CCC TGA GAA ATT CAA AAG A R: GGA CAG GTA AAT GGA TGA GGA GAT A	AY439148	۵۲	CypG30
F: TAA AAC ACA TCC AGG CAG ATT R: GGA GAG GTT ACG AGA GGT GAG	AB112732	۵۱	Lid1
F: TTC CAG CTC AAC TCT AAA GA R: GCA CCA TGC AGT AAC AAT	AB112738	۴۶	Rru1
F: TAA GCA GTG ACC AGA ATC CA R: CAA AGC CTC AAA AGC ACA A	AB112740	۵۴	Rru4
F: ATT GAT TAG GTC ATT GCC CG R: AGG AGT CAT CGC TGG TGA GT	G40277	۵۹	Z21908

جدول ۲- شرایط چرخه دمایی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید (*R. kutum*)

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۴
	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
۳۵	اتصال	۳۰ ثانیه	۵۹-۴۶ (جدول ۱)
	بسط	۱ دقیقه	۷۲
۱	بسط نهایی	۳ دقیقه	۷۲

پس از اتمام واکنش، محصولات PCR تحت الکتروفورز عمودی با ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد قرار گرفتند. بدین منظور از لدر ۱۰۰bp (Fermentas) به‌عنوان شاخص در تعیین اندازه آلی استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل‌های حاصل از الکتروفورز (Bassam *et al.*, 1991)، تصاویر هر یک از ژل‌ها با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل (Bio-RAD, USA) ثبت و طول قطعات با نرم‌افزار Gel pro analyzer 3.0 تعیین گردید.

پارامترهای تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و موثر (Ne) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و موثر (He)، با استفاده از نرم‌افزار GeneAlex 6.3 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه گردید. همچنین میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی، تمایز ژنتیکی (شاخص‌های Fst (طبق مدل آلی بی‌نهایت) و Rst (طبق مدل جهش گام به گام)) و جریان ژنی (Nm) با استفاده از همین نرم‌افزار تعیین گردید. دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار PopGene 1.3.1 ترسیم گردید (Yeh *et al.*, 1999). معنی‌داری یا عدم معنی‌داری تفاوت مشاهده شده از نظر تنوع آلی و هتروزیگوسیتی بین نمونه‌های مورد بررسی نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت تست ویلکاکسون غیر پارامتریک تعیین شد (Zar, 1998). احتمال وجود آلل‌های پوچ، از دست رفتن آلل‌های بزرگ و خطای دسته بندی با استفاده از نرم‌افزار Microchecker 2.2.1 مورد ارزیابی قرار گرفت (Oosterhout *et al.*, 2004). تست احتمال انحراف جمعیت‌ها از تعادل هاردی-وینبرگ، همچنین تست عدم تعادل پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Genepop 1.3 (Raymond and Rousset, 2003) انجام و در بررسی علت انحراف از تعادل، شاخص درون‌آمیزی (Fis) و معنی‌داری یا عدم معنی‌داری کسری و افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شده با استفاده از نرم‌افزار FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) محاسبه و ارزیابی شد.

نتایج

هر ده جایگاه ریزماهور مورد استفاده در تحقیق حاضر دارای چند شکلی بودند. نتایج مربوط به پارامترهای تنوع ژنتیکی در جدول ۲ آورده شده است. تعداد آل‌های واقعی و مورد انتظار به ترتیب در دامنه ۱۴-۳ و ۲/۵۳-۹/۳۶ قرار داشت. در این میان، بالاترین میزان آل واقعی و موثر به ترتیب در سطح جایگاه‌های Ca3 (گمیشان و خلیج گرگان) و CypG27 (گمیشان) مشاهده شد. در مقایسه بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی، میانگین آلی برای نمونه‌های وحشی گمیشان و خلیج گرگان و همچنین نمونه‌های کارگاهی به ترتیب ۹/۴، ۸/۹ و ۸ به دست آمد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب در محدوده ۱-۰/۲۱۶ و ۰/۸۹۶-۰/۶۳۴ قرار داشت. همچنین در مقایسه بین نمونه‌های وحشی گمیشان، خلیج گرگان و نمونه‌های کارگاهی میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۰، ۰/۷۹۸ و ۰/۷۲۸ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب ۰/۸۲، ۰/۸۲ و ۰/۷۶ به دست آمد. در مجموع از نظر تنوع آلی و هتروزیگوسیتی تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($p > 0.05$). در بررسی جمعیت‌ها از نظر امکان انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ، در اکثر جایگاه‌های مورد بررسی انحراف از تعادل بالایی مشاهده شد به نحوی که از ۳۰ تست مورد ارزیابی (۱۰ جایگاه \times ۳ جمعیت)، ۲۶ مورد انحراف معنی‌دار پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی نشان دادند و تنها جایگاه Ca1 در تمامی نمونه‌های مورد بررسی و جایگاه CypG24 در نمونه‌های کارگاهی در تعادل قرار داشتند (جدول ۲). در این راستا، کسری هتروزیگوسیتی معنی‌داری در جایگاه‌های CypG3، CypG27، CypG30، Lid1 و CypG30 در تمامی نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد (جدول ۲). همچنین در برخی از جایگاه‌ها نیز افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شد که این افزایش تنها در جایگاه‌های Rru4 و Z21908 معنی‌دار بود ($p \leq 0.02$). باتوجه به نتایج حاصل از نرم‌افزار Microchecker، آل‌های نول در جایگاه‌های CypG3، CypG27، CypG30، Lid1 مشاهده شد اما علائمی دال بر امکان از دست رفتن آل‌های بزرگ و خطای دسته‌بندی وجود نداشت.

در بررسی میزان تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی، میانگین شاخص‌های Fst و Rst به ترتیب ۰/۰۱۸ و ۰/۰۴۴ بدست آمد (جدول ۳). در این خصوص، بالاترین میزان تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های کارگاهی و خلیج گرگان مشاهده شد. این در حالی بود که پایین‌ترین میزان تمایز بین نمونه‌های خلیج گرگان و گمیشان وجود داشت. همچنین جریان ژنی بالایی (۱۷/۶) بین نمونه‌های گمیشان و خلیج گرگان مشاهده شد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که بخش اعظم تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها ۳ درصد تنوع در بین جمعیت‌ها وجود داشت. در بررسی فاصله و شباهت ژنتیکی نیز، بالاترین میزان فاصله و پایین‌ترین میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های کارگاهی و خلیج گرگان وجود داشت. نتایج مربوط به فاصله و شباهت ژنتیکی در جدول ۴

آورده شده است. همچنین براساس دندروگرام ترسیم شده بر پایه میزان فاصله ژنتیکی، نمونه‌های کارگاهی در شاخه‌ای مجزا از نمونه‌های گمیشان و خلیج گرگان قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی ارزیابی شده برای جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید (*R. kutum*)

Z21908	Rru4	Rru2	Lid1	CypG30	CypG27	CypG24	CypG3	Ca3	Ca1	
۵	۵	۸	۹	۹	۱۲	۱۳	۱۲	۱۴	۷	Na
۲/۹۴	۳/۱۶	۶/۹۸	۵/۰۲	۶/۱۲	۹/۳۶	۸/۶۳	۶/۵۴	۸/۹۶	۵/۱۱	Ne
۱	۱	۰/۹۸۶	۰/۵۸۹	۰/۳۲۴	۰/۶۵۲	۰/۹۶۷	۰/۵۷۲	۰/۹۳۶	۰/۹۸۳	H _o
۰/۶۹۴	۰/۷۲۱	۰/۷۸۱	۰/۸۵۴	۰/۸۶۳	۰/۸۸۲	۰/۸۷۷	۰/۸۷۹	۰/۸۸۶	۰/۷۸۱	H _e
-۰/۴۲۶	-۰/۳۶۳	۲۳۴/۰	-۰/۳۲۱	۰/۶۳۵	-۰/۲۸۴	-۰/۰۸۱	۰/۳۶۱	-۰/۰۲۴	-۰/۲۳۶	Fis
***	***	***	***	***	*	*	***	***	Ns	pHw
۳	۵	۹	۸	۹	۱۱	۱۲	۱۱	۱۴	۷	Na
۲/۸۱	۳/۲۸	۵/۴۸	۵/۶۳	۵/۱۲	۶/۴۸	۸/۲۴	۶/۹۳	۸/۸۴	۵/۳۷	Ne
۱	۱	۰/۹۷۳	۰/۶۲۸	۰/۴۱۲	۰/۶۳۴	۰/۹۸۱	۰/۴۸۶	۰/۸۷۳	۱	H _o
۰/۶۸۳	۰/۶۹۴	۰/۸۶۱	۰/۸۴۷	۰/۸۷۴	۰/۸۹۶	۰/۸۷۳	۰/۷۶۴	۰/۸۸۱	۰/۸۲۴	H _e
-۰/۴۵۲	-۰/۴۱۸	-۰/۱۰۱	۰/۲۸۳	۰/۵۳۶	۰/۳۱۴	-۰/۰۸۱	۰/۳۷۴	-۰/۰۲۶	-۰/۱۶۸	Fis
***	***	**	***	***	***	*	***	*	ns	pHw
۴	۴	۸	۷	۸	۹	۱۰	۱۲	۱۱	۷	Na
۲/۵۳	۲/۸۴	۶/۱۲	۴/۹۱	۴/۵۸	۶/۵۱	۷/۷۶	۶/۸۴	۶/۹۸	۵/۳۱	Ne
۱	۰/۹۷۷	۰/۹۷۱	۰/۴۶۳	۰/۲۱۶	۰/۴۴۷	۰/۹۶۳	۰/۵۱۲	۰/۷۶۵	۰/۹۷۴	H _o
۰/۶۳۴	۰/۶۵۱	۰/۸۶۲	۰/۷۶۶	۰/۷۳۲	۰/۷۴۸	۰/۸۵۱	۰/۸۲۳	۰/۷۸۳	۰/۷۵۳	H _e
-۰/۵۶۷	-۰/۴۸۱	-۰/۱۰۹	۰/۴۰۶	۰/۷۱۶	۰/۴۱۵	-۰/۱۰۶	۰/۳۸۴	۰/۰۵۱	-۰/۲۷۴	Fis
***	***	**	***	***	*	ns	***	*	ns	pHw

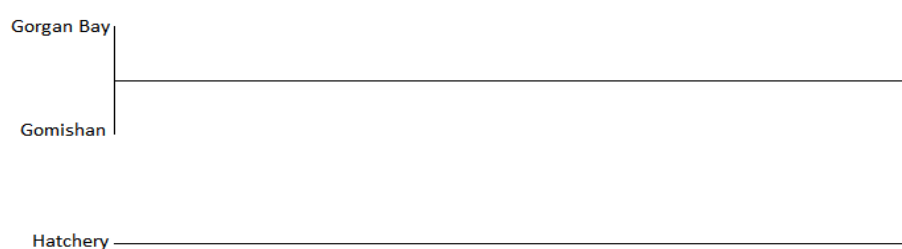
Na: تعداد آل‌های واقعی، Ne: تعداد آل‌های مورد انتظار، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Fis: ضریب درون آمیزی (مقادیر معنی‌دار پر رنگ شده است)، pHw: تست احتمال تعادل هاردی-وینبرگ پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی (ns: عدم معنی‌داری، $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$)

جدول ۴- تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید (*R. kutum*) (اعداد بالای و پایین قطر به ترتیب نشان‌دهنده شاخص‌های Rst و Fst می‌باشند)

منطقه	گمیشان	خلیج گرگان	کارگاه سیجوال
گمیشان	۰/۰۰۰	۰/۰۳۱	۰/۰۴۸
خلیج گرگان	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰	۰/۰۵۴
کارگاه سیجوال	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱	۰/۰۰۰

جدول ۵- فاصله و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید (*R. kutum*) (اعداد بالای و پایین قطر به ترتیب نشان‌دهنده شباهت و فاصله ژنتیکی می‌باشند)

منطقه	گمیشان	خلیج گرگان	کارگاه سیجوال
گمیشان	۰/۰۰۰	۰/۸۶۸	۰/۸۳۰
خلیج گرگان	۰/۱۴۶	۰/۰۰۰	۰/۸۰۲
کارگاه سیجوال	۰/۱۸۱	۰/۲۰۵	۰/۰۰۰



شکل ۱- دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید (*R. kutum*)

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر از ده جایگاه ریزماهواره برای مقایسه تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید (*R. kutum*) استفاده شد که همه ده جایگاه چند شکلی نشان دادند. همچنین عدم تعادل پیوستگی در هیچ یک از جفت جایگاه‌ها مشاهده نشد لذا به نظر می‌رسد جایگاه‌های مورد استفاده از کارایی مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ماهی سفید برخوردارند. تنوع ژنتیکی به‌عنوان منبع زیستی اولیه در تکثیر موفق برای همه گونه‌ها می‌باشد (Chen *et al.*, 2008)، لذا آگاهی از تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از اولویت‌های اساسی در طراحی برنامه‌های مدیریتی مناسب جهت حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی و به حداقل رساندن خطر درون‌آمیزی در جمعیت‌های کارگاهی می‌باشد (Aguilar *et al.*, 2013). مطالعه پیشین توسط برخی محققین روی ۷۸ گونه مختلف از ماهیان نشان داد که روند کاهشی از نظر سطح تنوع ژنتیکی از ماهیان آب شور به سمت ماهیان رودکوچ و سپس آب شیرین وجود دارد (Dewoody and Avise, 2000). در تحقیق حاضر متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده به‌عنوان شاخصی از تنوع ژنتیکی، ۰/۷۹۹ بدست آمد که کمی بالاتر از میزان گزارش شده برای ماهیان آب شیرین و رودکوچ (به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۶۸) می‌باشد. در مقایسه با هتروزیگوسیتی، غنای آلی به‌عنوان شاخص مهم‌تری در سنجش تنوع مطرح می‌باشد چرا که جمعیت‌هایی که برای دوره‌های طولانی با کاهش اندازه جمعیت مؤثر مواجه شده و یا در معرض

تنگنای ژنتیکی قرار گرفته‌اند می‌توانند هتروزیگوسیتی خود را حتی در شرایطی که بخشی از آلل‌های خود را از دست داده‌اند، در سطح بالایی حفظ نمایند (Page and Scribner, 2004). در این بررسی، میانگین آللی جمعیت‌های وحشی (۹/۱۵) بالاتر از میانگین گزارش شده برای ماهیان آب شیرین (۷/۵) بود، در حالی که نسبت به ماهیان رودکوچ (۱۱/۳) (Dewoody and Avise, 2000) پایین‌تر بود. این امر در تطابق با مطالعات پیشین صورت گرفته در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید در مناطق تجن و تنکابن (میانگین آللی: ۸/۴، میانگین هتروزیگوسیتی: ۰/۸) (Rezaii *et al.*, 2012) و چشمه کیله و گرگان‌رود (میانگین آللی: ۷/۹۵، میانگین هتروزیگوسیتی: ۰/۷۷) (Rezaii *et al.*, 2010) می‌باشد. در مقایسه بین جمعیت‌های وحشی و کارگاهی ماهی سفید، تنوع ریزماهوره‌ای مشاهده شده در جمعیت‌های وحشی بالاتر از جمعیت کارگاهی (میانگین آللی: ۸، میانگین هتروزیگوسیتی: ۰/۷۲۸) بدست آمد هر چند تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). پایین‌تر بودن غنای آللی و هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های کارگاهی در مقایسه با جمعیت‌های وحشی در برخی مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Elliott and Reilly, 2003; Li *et al.*, 2016). در این خصوص، به‌گزینی، تکثیر با استفاده از تعداد محدودی مولد و در نتیجه فشار درون‌آمیزی به‌عنوان عوامل بالقوه کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های کارگاهی مطرح می‌باشد (An *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016). در تحقیق حاضر اگرچه تفاوت آماری معنی‌داری از نظر تنوع آللی و هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌های کارگاهی و وحشی وجود نداشت ($p > 0.05$) اما همین کاهش اندک مشاهده شده در پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت کارگاهی را نباید نادیده گرفت زیرا رهاسازی انبوه چنین لاروهایی می‌تواند در دراز مدت اثرات منفی روی ذخیره ژنی سازگار شده گذاشته و منجر به کاهش رشد و سازگاری جمعیت‌های وحشی گردد (Thanh *et al.*, 2015). همچنان‌که مطالعات صورت گرفته نشان داده که ضریب رشد ماهی سفید طی سال‌های اخیر کاهش قابل توجهی یافته که می‌تواند مرتبط با برنامه بازسازی ذخایر سالانه این گونه باشد (Khanipour and Valipour, 2011). بیش از ۳۰ سال از رهاسازی بچه‌ماهیان سفید حاصل از تکثیر مصنوعی به دریای خزر می‌گذرد. متأسفانه اطلاعاتی درخصوص ساختار و تنوع ژنتیکی ماهی سفید قبل از شروع برنامه تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر وجود ندارد. در این خصوص، به‌نظر می‌رسد به‌کارگیری تدابیری در زمینه مولدین مورد استفاده در تکثیر مصنوعی برای حفظ و تقویت تنوع جمعیت کارگاهی و سودمند واقع شدن برنامه تکثیر مصنوعی به‌عنوان استراتژی جهت حفاظت و بازسازی ذخایر ماهی سفید، امری اجتناب‌ناپذیر باشد.

در بررسی جمعیت‌ها از نظر تعادل هاردی-وینبرگ، انحراف از تعادل بالایی هر دو گروه وحشی و کارگاهی مشاهده شد به‌نحوی که تنها ۴ مورد از ۳۰ تست مورد بررسی (جمعیت × جایگاه) در تعادل قرار داشتند. در این زمینه، در مطالعات قبلی صورت گرفته روی جمعیت‌های وحشی ماهی سفید در مناطق

تجن و تنکابن (Rezaii *et al.*, 2012) و همچنین چشمه‌کیله و گرگان‌رود (Rezaii *et al.*, 2010) نیز انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در اغلب جایگاه‌ها مشاهده شد که محققین علت امر را به کسری هتروزیگوسیتی نسبت دادند. در پژوهش حاضر، کسری هتروزیگوسیتی بالایی در برخی جایگاه‌های مورد بررسی مشاهده شد که وجود آل‌های نول را می‌توان به‌عنوان یکی از دلایل مهم در بروز چنین کسری در نظر گرفت. نقش آل‌های نول در ایجاد کسری هتروزیگوسیتی در مطالعات پیشین صورت گرفته توسط برخی محققین (Berdugo and Barandica, Matsumoto and Hilsdorf, 2009) نیز گزارش شده است. علاوه بر این، کسری هتروزیگوسیتی می‌تواند ناشی از عوامل دیگری همچون به‌گزینی، آمیزش خویشاوندی، اثر وهلاند و یا ترکیبی از عوامل فوق باشد. اثرات فاندنر نیز به عنوان یکی از دلایل عمده کسری هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های کارگاهی مطرح می‌باشد (Kohlmann *et al.*, 2007; Lundrigan *et al.*, 2005). در تحقیق حاضر باتوجه به تمایز ژنتیکی پایین مشاهده شده بین نمونه‌ها، احتمال وجود اثر وهلاند ضعیف به‌نظر می‌رسد. در عین حال، باتوجه به نتایج بدست آمده از نرم‌افزار Microchecker، نقش آل‌های نول در بروز کسری مشاهده شده را نمی‌توان نادیده گرفت. همچنین باتوجه به برنامه بازسازی ذخایر ماهی سفید و امکان ترکیب ذخایر ژنی متمایز نقش به‌گزینی در کسری مشاهده شده را نیز نمی‌توان رد نمود. علاوه بر این، وقوع آمیزش خویشاوندی نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از دلایل احتمالی مطرح باشد. بررسی‌ها نشان داده که صید بی‌رویه می‌تواند با تأثیر بر اندازه جمعیت مؤثر، گونه‌های آبری را بیش از پیش در معرض درون‌آمیزی قرار دهد (Hoarau *et al.*, 2005).

آگاهی از ساختار جمعیتی گونه‌های مختلف ماهیان به عنوان امری مهم در حفظ و ابقای سلامت ژنتیکی آن‌ها شمرده می‌شود (Li *et al.*, 2016). در این خصوص، آنالیز واریانس مولکولی روشی مناسب در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌باشد (Grassi *et al.*, 2004). در بررسی حاضر نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که بیشتر واریانس مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. پایین‌تر بودن تنوع بین جمعیتی در مقایسه با تنوع درون جمعیتی می‌تواند حاکی از آن باشد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارز و متمایزی وجود ندارد (Diz and Presa, 2009). متوسط میزان F_{st} به عنوان شاخص مهمی از تمایز ژنتیکی، $0/018$ به‌دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد. در بررسی‌های پیشین صورت گرفته توسط رضایی و همکاران (Rezaii *et al.*, 2010 and 2012) نیز میزان تمایز ژنتیکی پایینی بین نمونه‌های مورد بررسی ماهی سفید گزارش شد. در تحقیق حاضر، متوسط میزان R_{st} به عنوان شاخص دیگری از تمایز ژنتیکی، $0/044$ به‌دست آمد که کمی بالاتر از متوسط F_{st} مشاهده شده بود. باتوجه به ماهیت ریزماهورها و نوع جهش‌های مؤثر در آن، R_{st} می‌تواند شاخص مناسب‌تری برای نمایان ساختن تمایز

ژنتیکی بین جمعیت‌ها باشد چرا که تست Rst مبتنی بر اطلاعات مربوط به اندازه آلی می‌باشد (Wachirachai Karn *et al.*, 2009). روی هم رفته مقادیر هر دو شاخص Fst و Rst حاکی از وجود بالاترین تمایز بین جمعیت‌های کارگاهی و خلیج گرگان (۰/۰۲۱) و پایین‌ترین تمایز بین جمعیت‌های گمیشان و خلیج گرگان (۰/۰۱۴) بود. در این خصوص، علاوه بر فاصله جغرافیایی، نقش برنامه‌های مربوط به تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر را در میزان تمایز مشاهده شده، نمی‌توان نادیده گرفت. مولدین مورد استفاده جهت تولید لارو در کارگاه سیجوال عمدتاً از رودخانه گرگان‌رود تامین می‌شوند. در این راستا، رهاسازی لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی در مکان‌های مختلف بدون توجه به محل تخم‌ریزی مولدین آن‌ها می‌تواند در میزان جریان ژنی و تمایز بین جمعیت‌های مختلف تاثیر گذار باشد. نتایج بدست آمده نیز موید این مطلب بود که جریان ژنی بالایی بین نمونه‌های مورد بررسی وجود دارد. علاوه بر این موارد، عدم به‌گزینی طبیعی در برخی جایگاه‌های مورد استفاده نیز می‌تواند عامل دیگری در سطح تمایز مشاهده شده باشد. در بررسی فاصله و شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی نیز بالاترین میزان فاصله و پایین‌ترین میزان شباهت بین جمعیت‌های کارگاهی و خلیج گرگان مشاهده شد. در مطالعه قبلی انجام شده با استفاده از ژن سیتوکروم b، فاصله ژنتیکی پایینی بین نمونه‌های ماهی سفید مناطق گهرباران، تجن، سفید رود، گرگان‌رود و قره‌سو مشاهده شد. این در حالی بود که بالاترین قرابت ژنتیکی بین نمونه‌های قره‌سو با گرگان‌رود وجود داشت (Kolangi-Miandare *et al.*, 2015). مقادیر فاصله ژنتیکی بدست آمده در این تحقیق، براساس معیار شاکلی و همکاران (Shaklee *et al.*, 1982)، در محدوده گونه‌های هم‌جنس قرار دارد. نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام UPGMA براساس فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که نمونه‌های گمیشان و خلیج گرگان در گروهی جدا از نمونه‌های کارگاهی قرار گرفتند.

با توجه به نتایج بدست آمده به‌نظر می‌رسد با وجود برنامه‌های بازسازی ذخایر صورت گرفته روی ماهی سفید، این گونه توانسته تا حدی تنوع ژنتیکی خود را حفظ نماید. البته اطلاعاتی در خصوص ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سفید قبل از آغاز برنامه‌های تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر وجود ندارد تا بتوان اثر احتمالی چنین برنامه‌هایی را بر ساختار ژنتیکی ماهی سفید تعیین نمود. به هر حال با توجه به ضرورت تکثیر مصنوعی ماهی سفید به‌دلیل کاهش ذخایر طبیعی آن به‌کارگیری اصول صحیح ژنتیکی چه در انتخاب مولدین و چه در رهاسازی لاروهای تولیدی به طبیعت، امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. همچنین با توجه به رهاسازی سالانه تعداد زیادی لارو حاصل از تکثیر مصنوعی به محیط‌های طبیعی، ارزیابی ساختار ژنتیکی مولدین مورد استفاده در تکثیر مصنوعی، لاروهای تولیدی و همچنین جمعیت‌های هدف در دوره‌های زمانی معین ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

- Abdoli A. 2000. The inland water fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. 377P. (In Persian).
- Aguiar J., Schneider H., Gomes F., Carneiro J., Santos S., Rodrigues L.R., Sampaio I. 2013. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 85(4): 1439-1447.
- An H.S., Yang S.G., Moon T.S., Park J.Y., Hong C.G., Hwang H.K., Myeong Y.J., An C.M. 2014. Comparison of genetic diversity between wild-caught broodstock and hatchery-produced offspring populations of the vulnerable Korean kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) by microsatellites. *Genetics and Molecular Research*, 13(4): 9675-9686.
- Araki H., Berejikian B.A., Ford M.J., Blouin M.S. 2008. Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evolutionary Applications*, 1(2): 342-355.
- Araki H., Waples R.S., Arden W.R., Cooper B., Blouin M.S. 2007. Effective population size of steelhead trout: influence of variance in reproductive success, hatchery programs, and genetic compensation between life-history forms. *Molecular Ecology*, 16(5): 953-966.
- Baerwald M.R., May B. 2004. Characterization of microsatellite loci for five members of the minnow family Cyprinidae found in the Sacramento-San Joaquin Delta and its tributaries. *Molecular Ecology Notes*, 4: 385-390.
- Barinova A., Yadrenkina E., Nakajima M., Taniguchi N. 2004. Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in *Leuciscus idus* and Siberian roach *Rutilus rutilus*. *Molecular Ecology Notes*, 4: 86-88.
- Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff G.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 84: 680-683.
- Berdugo G.O., Barandica J.C.N. 2014. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genetics and Molecular Biology*, 37(1): 37-45.
- Berntson E.A., Carmichael R.W., Flesher M.W., Ward E.J., Moran P. 2011. Diminished reproductive success of steelhead from a hatchery supplementation program (Little Sheep Creek, Imnaha Basin, Oregon). *Transactions of the American Fisheries Society*, 140(3): 685-698.
- Chen L., Li Q., Yang J. 2008. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicas selenka*) from northern China. *Aquaculture Research*, 39: 1541-1549.

- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1–29.
- Dewoody J.A., Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in Marine, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.
- Dimoski P., Toth G.P., Bagley M.J. 2000. Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 9: 2187–2189.
- Diz P.A., Presa P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*, 287(3–4): 278–285.
- Einum S., Fleming I.A. 2001. Ecological interactions between wild and hatchery salmonids. *Nordic Journal of Freshwater Research*, 75: 56-70.
- Elliott N.G., Reilly A. 2003. Likelihood of a bottleneck even in the history of the Australian population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 215: 31-44.
- Esmaeili H.R., Coad B.W., Mehraban H.R., Masoudi M., Khaefi R., Abbasi K., Mostafavi H., Vatandoust S. 2014. An updated checklist of fishes of the Caspian Sea basin of Iran with a note on their zoogeography. *Iranian Journal of Ichthyology*, 1(3): 152–184.
- Ferreira D.G., Galindo B.A., Frantini-Silva W., Almeida F.S., Sofia S.H. 2014. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation Genetics*, 16: 151–166.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 644P.
- Ghaninezhad D., Moghim M., Abdolmaleki S.H. 1999. Assessment of bony fish stocks of Caspian Sea in 1998-1999. Guilan Fisheries Research Center, Bandar Anzali, 74P. (In Persian).
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grassi F., Imazio S., Gomasca 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.
- Hoarau G., Boon E., Jongma D.N., Ferber S. 2005. Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Proceeding of the Royal Society B: Biological Science*, 272: 497-503.

- Hughes P.W., Simons A.M. 2015. Microsatellite evidence for obligate autogamy, but abundant genetic variation in the herbaceous monocarp *Lobelia inflata* (Campanulaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 8(11): 2068-2077.
- Kaczmarczyk D., Wolnicki J. 2016. Genetic Diversity of the Critically Endangered Lake Minnow *Eupallasella percnurus* in Poland and Its Implications for Conservation. *PLOS One*, 12(2): 1-16.
- Khanipour A.A., Valipour A.R. 2011. Kutum fish, the jewel of Caspian Sea. Iranian Fisheries Organization. 84P. (In Persian).
- Kohlmann K., Kersten P., Flajshans M. 2007. Comparison of microsatellite variability in wild and cultured tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*, 272: 47-51.
- Kolangi-Miandare H., Shabani A., Hojati M. 2015. The study of genetic diversity of *Rutilus kutum* (Kamensky, 1901) in some rivers of southern parts of Caspia Sea using mitochondrial cytochrome *b* sequencing (mtDNA *cytb*). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 3(2): 1-12. (In Persian).
- Li X., Deng Y., Yang K., Gan W., Zeng R., Deng L., Song Z. 2016. Genetic Diversity and Structure Analysis of *Percocypris pingi* (Cypriniformes: Cyprinidae): Implications for Conservation and Hatchery Release in the Yalong River. *PLOS One*, 11(12): 1-18.
- Liu Y., Liu R., Ye L., Liang J., Xuan F., Xu Q. 2009. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the coastal waters of the East China Sea. *Hydrobiologia*, 618: 125-137.
- Loukovitis D., Ioannidi B., Chatzaplis D., Kotoulas G., Magoulas A., Tsigenopoulos C.S. 2015. Loss of genetic variation in Greek hatchery populations of the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Mediterranean Marine Science*, 16: 197-200.
- Lundrigan T.A., Reist J.D., Ferguson M.M. 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture*, 244: 63-75.
- Matsumoto C.K., Hilsdorf A.S. 2009. Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Bryconinsignis steindachner*, 1877: Implications for its conservation sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, 7: 395-402.
- Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Page K.S., Scribner, K.T. 2004. Genetic Diversity of Wild and Hatchery Lake Trout Populations: Relevance for Management and Restoration in the Great Lakes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133: 674-691.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

- Piorski N.M., Sanches A., Carvalho-Costa L.F., Hatanaka T., Carrillo-Avila M., Freitas P.D., Galetti P.M. 2008. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 1039-1050.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (Ver. 1.3): Population genetic software for exact tests and ecumenicisim. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Razavi B. 2003. National project of Kutum fish. Iranian Fisheries organization, Tehran. 11P.
- Reisenbichler R.R., Rubin S., Wetzel L., Phelps S. 2004. Natural selection after release from a hatchery leads to domestication in steelhead, *Oncorhynchus mykiss*. In: Leber M, Kitada S, Blankenship HL, Svas T (Eds.). *Stock Enhancement and Sea Ranching*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 371–384.
- Rezaii M., Shabani A., Shabanpour B., Kashiri H. 2010. Genetic comparison of *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) in Gorgan river and Cheshmekile (Tonekabon) using microsatellite markers. *Taxonomy and Biosystematics Journal*, 1(2): 1-14. (In Persian).
- Rezaii M., Shabani A., Shabanpour B., Kashiri H. 2012. Microsatellite diversity and genetic structure of *Rutilus frisii kutum* in Mazandaran coasts. *Iranian Journal of Biology*, 25(4): 548-558. (In Persian).
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615 – 629.
- Shaklee J.B., Tamaru C.S., Waples R.S. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studies by electrophoresis analysis of proteins. *Pacific Science*, 36: 141-157.
- Thanh H.N., Liu Q.G., Zhao L.J., Zhang H., Liu J. 2015. Genetic diversity of the cultured giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in China based on microsatellite markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015: 59: 144-154.
- Wachirachaikarn A., Rungsin W., Srisapoome P. 2009. Crossing of African cat fish (*Clarias gariepinus*) strains based on strain selection using for microsatellite loci. *Aquaculture*, 290(1-2): 53-60.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Window bases Freeware for population Genetic Analysis. Available: www.uallberta.ca/fyeh/. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research.
- Yi J.Y., Chung J.W., Lee Y.Y., Kwak J.G., Lee S.Y. 2015. Morphological and genetic stability of dormant apple winter buds after cryopreservation. *Korean Journal of Plant Research*, 28(6): 697-703.
- Zar J.H. 1998. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River New Jwesity. 929P.

