



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره اول، شماره دوم، تابستان ۹۲

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

مقایسه ژنتیکی سگ ماهی جویباری (*Oxynoemacheilus argyrogramma* (Heckel, 1847)

در دو رودخانه سپیدبرگ و گاماسیاب کرمانشاه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

کتایون اصغری^۱، محمد هرسیج^۲ و *حامد کلنگی میاندره^۳

^۱دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، ^۲استادیارگروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس

^۳استادیارگروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ ارسال: ۹۲/۲/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۸

چکیده

سگ ماهی جویباری *O. argyrogramma* یکی از گونه‌های جنس *Oxynoemacheilus* بوده و پراکندگی آن مربوط به آبهای شیرین ایران و عراق است. در این مطالعه، ساختار ژنتیکی و تنوع ژنتیکی ۱۰۰ عدد ماهی *O. argyrogramma* در حوضه دو رودخانه سپیدبرگ و گاماسیاب با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بررسی شد. نتایج مطالعه سه جایگاه ریزماهوره در جمعیت این دو منطقه نشان داد که میانگین تعداد ال ۱۳ می‌باشد که از دامنه گزارش شده برای ماهیان آب شیرین بالاتر است. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۶۵۲ و ۰/۸۷۶ به دست آمد. تقریباً اکثر جایگاه‌های ژنی انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را نشان دادند. فاصله و شباهت ژنتیکی بین دو منطقه به ترتیب ۰/۳۴۶ و ۰/۷۰۷ بود. بر اساس آنالیزهای موجود به نظر می‌رسد که گونه *O. argyrogramma* دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی در مناطق مورد بررسی است.

واژه‌های کلیدی: *O. argyrogramma*، تنوع ژنتیکی، ریزماهوره، رودخانه سپیدبرگ، رودخانه گاماسیاب

*مسئول مکاتبه: hkolangi@gau.ac.ir

مقدمه

در میان ماهیان آب‌های داخلی ایران، خانواده کپور ماهیان با ۸۱ گونه و ۴۸ درصد فراوانی، فون غالب و خانواده سگ ماهی جویباری با ۲۳ گونه و ۱۱ درصد فراوانی رتبه دوم فون ماهیان را به خود اختصاص داده‌اند (Coad, 2012). از لحاظ زیستگاهی، سگ ماهیان، قسمت‌های فوقانی و میانی رودخانه‌های با بستر سنگلاخی و قله‌های سنگی (آب‌های سرد و غنی از اکسیژن) را برای زیستن ترجیح داده، در هنگام روز در زیر سنگ‌ها مخفی می‌شوند و گونه‌هایی شب فعال هستند (Abdoli, 1998; Cihar, 1976). *O. argyrogramma* از خانواده Nemacheilidae است. پراکندگی آن در ایران مربوط به غرب (استان‌های کرمانشاه و کردستان) می‌باشد.

یکی از مشکلات امروز ذخایر آبزیان در دنیا، کاهش تنوع ژنتیکی است که بر اثر فعالیت‌های متعدد بشر، اعم از ایجاد آلودگی‌ها، صید بی رویه، تخریب زیستگاه، مسدود کردن مسیر مهاجرت اتفاق می‌افتد (Ferguson et al., 1995; Zhao et al., 2005). 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 طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon et al., 1996). نشانگرهای مولکولی به‌طور مستقیم قادرند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند (Ferguson et al., 1995). تنوع ژنتیکی از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در میان افراد حاصل می‌شود (Utter, 1991). به‌طور کلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است (Pujolar et al., 2009). امروزه، نشانگرهای ریزماهوره در مطالعات ژنتیک جمعیت به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به‌فردی نظیر: پلی مورفیسم بالا، گسترده‌گی بالا در ژنوم و جهش بالا، کاربرد فراوانی دارند (Sun et al., 2009). نشانگرهای ریز ماهوره برای درک ساختار ژنتیک جمعیت، تنوع ژنتیکی و تاریخچه گونه هدف مفید بوده، برای تعدادی از گونه‌های خانواده لوچ ماهیان به‌طور اختصاصی شناسایی شده‌اند (Taylor et al., 2001; Bang et al., 2009). در حال حاضر هیچ نشانگر ریزماهوره اختصاصی برای ماهی *O. argyrogramma* گزارش نشده‌است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *O. argyrogramma* در دو رودخانه سپیدبرگ و گاماسیاب با استفاده از جایگاه ریزماهوره بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج DNA: در کل، تعداد ۱۰۰ نمونه از دو رودخانه سپید برگ و گاماسیاب استان کرمانشاه از میان‌دست و پایین‌دست رودخانه جمع‌آوری شد. فاصله بین دو رودخانه در حدود ۱۰۰ کیلومتر است. کل DNA ژنومی از بافت باله سینه‌ای و شکمی با استفاده از پروتئیناز K و روش فنول-کلروفرم استخراج شد (Hillis et al., 1996). کمیت و کیفیت DNA به‌ترتیب با استفاده از روش

اسپکتوفتومتری و ژل آگاروز یک درصد ارزیابی گردید. DNA استخراجی در دمای ۲۰- تا زمان استفاده نگهداری شد.

آنالیز مولکولی: در این مطالعه برای بررسی تنوع ژنتیکی، از سه جایگاه ریزماهوره Bbar8, Bbar5, Bbar9 (Taylor *et al.*, 2001) استفاده شد (جدول ۱). هر واکنش زنجیره پلی مرز در حجم ۲۵ میکرولیتر با ۰/۲ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میکرومولار نوکلئوتید، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ واحد بین المللی DNA پلیمرز (*Taq* DNA polymerase)، بافر PCR 1X، ۱۰۰ نانوگرم DNA و آب مقطر انجام گرفت. سیکل دمایی برای هر جایگاه عبارت بود از: ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه، با یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۳ دقیقه. محصول زنجیره پلی مرز بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد (غیر یونیزه شده) جداسازی و به وسیله روش نیترا ت نقره رنگ آمیزی شد (Bassam *et al.*, 1991).

جدول ۱- خصوصیات جایگاه ژنی مورد استفاده در این تحقیق

جایگاه ژنی	وزن (جفت باز)	تعداد ال	پرایمر	دمای اتصال
Bbar5	۱۲۰ - ۸۴	۱۲	F: ATAATCACAGCCCCGCAGAG R: GGGTGGTGAATATATTGAAA	۵۵
Bbar8	۴۹۲ - ۳۶۰	۱۴	F: GAGCAACAGCTGCTGTAGGA R: GTCGGACCAACCTGAAAACCT	۵۰
Bbar9	۲۴۸ - ۱۷۶	۱۲	F: NED-AATACGAAAACCTACTTGTAATGGC R: GTGAAAAGGTCCAGTTAAAAGC	۴۸

آنالیز آماری: تعداد ال در هر جایگاه ژنی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He)، تعداد ال های مشاهده شده (Na)، تعداد ال موثر (Ne)، تعادل هاردی- واینبرگ، مقادیر Fst و جریان ژنی با استفاده از نرم افزار Genealex ver.6.5 (Peakall and Smouse, 2012) محاسبه شد. به منظور تعیین فاصله و شباهت ژنتیکی (Nei, 1978) و رابطه فیلوژنیک جمعیت ها از نرم افزار PopGene ver 1.31 استفاده شد (Yeh *et al.*, 1999). وجود ال نول با استفاده از نرم افزار MICROCHECKER بررسی گردید.

نتایج

در این مطالعه از سه جایگاه ژنی ریزماهوره استفاده شد. در مجموع تعداد ۷۶ ال برای هر دو منطقه به دست آمد که در دامنه ۴۹۲-۸۴ بودند. متوسط ال مشاهده شده (Na) در رودخانه های سپیدبرگ و گاماسیاب به ترتیب ۱۴ و ۱۲ به دست آمد. کمترین و بیشترین ال مشاهده شده به ترتیب ۱۱ و ۱۶ برای دو جایگاه Bbar9 و Bbar8 به ترتیب در رودخانه های گاماسیاب و سپیدبرگ مشاهده شد. میزان ال

مشاهده شده (Na)، الل مورد انتظار (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، مورد انتظار (He) و شاخص درون آمیزی در جدول ۲ نشان داده شده است. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۶۵۲ و ۰/۸۷۶ به دست آمد. نتایج مربوط به بررسی تعادل هاردی-واینبرگ باز تست موجود ۴ تست انحراف از تعادل را نشان دادند (جدول ۲). بر اساس آنالیز با استفاده از نرم‌افزار MICROCHECKER وجود الل نول را در جایگاه Bbar5 نشان داد. متوسط جریان ژنی (Nm) در بین مناطق ۱۳/۸۷۲ به دست آمد. کمترین و بیشترین میزان آن به ترتیب برای جایگاه‌های Bbar9 (۸/۱۵۵) و Bbar8 (۲۰/۷۰۷) محاسبه شد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس مولکولی و شاخص Fst در سطح ۹۹ درصد نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی (۹۸ درصد) در درون مناطق و تنوع پایینی (۲ درصد) در بین مناطق وجود دارد. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی نیز بر اساس شاخص ژنی به ترتیب ۰/۳۴۶ و ۰/۷۰۷ به دست آمد و بر اساس شاخص فاصله ژنتیکی، دندروگرام UPGMA نشان داد که این دو منطقه در دو شاخه مجزا قرار دارند.

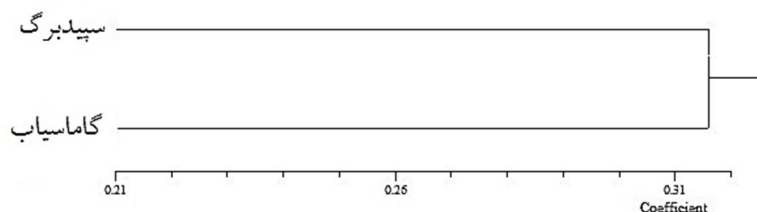
جدول ۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در دو جمعیت *O. argyrogramma* در رودخانه‌های سپیدبرگ و گاماسیاب.

Bbar9	Bbar9	Bbar9	
۱۳	۱۶	۱۲	Na
۷/۴۴۶	۹/۷۷۸	۷/۶۸۳	Ne
۰/۸۶۶	۰/۸۹۸	۰/۸۷۰	Ho
۰/۸۶۶	۰/۸۹۸	۰/۸۷۰	He
۰/۰۰۲	۰/۵۴۴	۰/۲۶۸	Fis
ns	***	**	pHw
۱۱	۱۲	۱۲	Na
۷/۶۸۳	۶/۹۶۴	۹/۵۸۴	Ne
۰/۸۲۶	۰/۶۰۹	۰/۳۰۴	Ho
۰/۸۷۰	۰/۸۵۶	۰/۸۹۶	He
۰/۱۱۲	۰/۴۱۶	۰/۱۸۸	Fis
**	***	ns	pHw

Na: تعداد الل، Ne: تعداد الل موثر، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Fis: ضریب درون آمیزی، 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 (Fst) در سطح سه جایگاه ژنی مورد استفاده

میانگین	Bbar9	Bbar8	Bbar5	جایگاه ژنی
۱۳/۸۷۲	۸/۱۵۵	۲۰/۷۰۷	۱۲/۷۵۴	Nm
۰/۰۳	۰/۰۱۶	۰/۰۱۲	۰/۰۱۹	Fst



شکل ۴- مقایسه فاصله ژنتیکی دو جمعیت *O. argyrogramma* در رودخانه‌های سپیدبرگ و گاماسیاب بر اساس دندروگرام UPGMA.

بحث

تنوع ژنتیکی برای فرآیندهای تکاملی محیط زیست و اکولوژیکی در محدوده عملکرد اکوسیستم‌ها بسیار مهم و حیاتی است (Rezvani Gilkolaei *et al.*, 2012). هتروزیگوسیتی، یک شاخص تکاملی مهم در تعیین پویایی و بقای جمعیت‌هاست (Reed, 2009). در این مطالعه، تعداد ال و هتروزیگوسیتی مشاهده شده ($H_o=0.652$, $N_a=13$) از میانگین گزارش شده برای ماهیان آب شیرین ($H_o=0.46$, $N_a=7/5$) بالاتر بود (Dewoody and Avise, 2000). اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالایی در درون جمعیت‌های مورد بررسی و تنوع پایینی در بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. با این حال، هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین نشان‌دهنده وضعیت ساختار ژنتیکی جمعیت *O. argyrogramma* در میان دست و پایین دست دو رودخانه سپیدبرگ و گاماسیاب است (اثر Wahlund's). هر دو منطقه انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند. با توجه به اینکه تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس جفت‌گیری تصادفی در یک جمعیت است، انتظار انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت‌های وحشی وجود دارد (Dixon *et al.*, 2008). جمعیت‌های طبیعی زیادی از ماهیان انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داده‌اند (Castric *et al.*, 2002; Yue *et al.*, 2006; 2004; Lucentini *et al.*, 2006; 2009; Bang *et al.*, 2009). بر اساس آنالیزهای مربوطه و با استفاده از نرم‌افزار MICROCHECKER، وجود ال نول در هر دو منطقه نشان داده شد. کسر هتروزیگوسیتی ممکن است در جمعیت‌های طبیعی از طریق همخونی، نمونه‌برداری غیر تصادفی، ساختار درون جمعیتی (Castric *et al.*, 2002)، رانش ژنتیکی، ال نول (Angel *et al.*, 2006)، فشار ماهی‌گیری (Bergh and Getz, 1989) و یا ترکیبی از عوامل فوق به وقوع پیوندد. در این رودخانه‌ها شاید ترکیبی از عوامل فوق دلیل کسر هتروزیگوسیتی و انحراف از تعادل هاردی واینبرگ باشد. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) معیاری مناسب برای بررسی ساختار جمعیت، تعیین میزان تمایز و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها است (Grassi *et al.*, 2004). بر اساس شاخص F_{st} ، تنوع ژنتیکی بین این دو منطقه ۲ درصد محاسبه شد. میانگین F_{st} نیز حدود ۰/۰۲ به‌دست آمد. این موضوع، تمایز بسیار پایین این مناطق را نشان می‌دهد. بر اساس معیار

رایت (Wright, 1987)، میزان F_{st} کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز پایین بین جمعیت‌ها است. در این آزمایش، میانگین جریان ژنی (Nm) بین دو منطقه ۱۳/۸۷۲ گزارش شد. براساس گزارش Li و همکاران (۲۰۰۷) هرگاه $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی عامل اصلی در تمایز ژنتیکی بوده و هرگاه $Nm < 1$ باشد، رانش ژنی عامل اصلی تمایز ژنتیکی است. از این رو، نتایج نشان می‌دهد که جریان ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی بین این دو منطقه می‌باشد. الگوی ساختار ژنتیکی گونه *O. argyrogramma* در این دو رودخانه به احتمال زیاد به دلیل جریان ژنی در طول تاریخ شکل گرفته است. بیولوژی رفتار تولید مثلی و تغذیه نیز بر ساختار ژنتیکی ماهیان تاثیر گذار است (Abbas et al., 2010). ماهیان بالغ در زمان تولید مثل مهاجرت چندانی ندارند و در حوالی محل زندگی خود اقدام به تخم‌ریزی می‌کنند. بچه ماهیان در بین سنگها و علف‌های حاشیه رودخانه زندگی می‌کنند. ماهی پس از تخم‌ریزی هیچ‌گونه مراقبت والدینی از تخم‌ها نمی‌کند. این گونه در مسیر جریان آب در بین و زیر سنگ‌ها تخم‌ریزی می‌کند. سرعت جریان بالای آب و رسوبات به تخم‌آبزیان خسارت جدی وارد می‌کند (Wei et al., 1997). هتروزیگوسیتی پایین با توجه به کاهش اندازه جمعیت و افزایش ضریب همخونی ویژگی چنین جمعیت‌هایی است (Abbas et al., 2010). بر اساس آنالیزهای موجود به نظر می‌رسد، گونه *O. argyrogramma* دارای تنوع ژنتیکی مطلوبی در مناطق مورد بررسی است و با توجه به اهمیت اکولوژیک این گونه در پالایش رودخانه‌ها حفظ تنوع ژنتیکی آن در مناطق مورد بررسی، لازم و ضروری می‌نماید. رودخانه‌های مورد بررسی از نظر میزان جریان آبی، حوضه آبی، ارتفاع از سطح دریا، شرایط بستر رودخانه و شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک حوضه رودخانه کاملاً متفاوت هستند. با توجه به این نتایج، نشان داده شده که جدایی جغرافیایی و تفاوت‌های موجود در شرایط زیست محیطی موجود در این مناطق، منجر به ایجاد وجود تنوع ژنتیکی در بین و درون مناطق مورد بررسی شده است.

منابع

- Abdoli A. 1998. Freshwater fishes of Iran. Museum of Nature and Wildlife Iran. 378 pp.
- Abbas Kh., Zhou X., Li Y., Gao Z., Wang W. 2010. Microsatellite diversity and population genetic structure of yellowcheek, *Elopichthys bambusa* (Cyprinidae) in the Yangtze River. J.bse. 38, 806-812.
- Angel P., Mercedes G., Philippe L., Concepcion M., Jose A. 2006. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. Biol. Conserv. 129, 244-255.
- Bang I., Kim W.J. Rolee I. 2009. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Miho spine loach (*Iksookimia choii*) and cross-species amplification within the Cobitidae family. Mol. Ecol. Res. 9, 281-284.

- Bassam B.J., Caetano-Anolles G. Gresshoff G.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 680-683.
- Bataillon T.M., David J.L., Schoen D.J. 1996. Neutral genetic markers and conservation: simulated Germplasm collections. *Genet.* 144, 409-417.
- Bergh M.O., Getz W.M. 1989. Stability and harvesting of competing populations with genetic variation in life history strategy. *Genet.* 113, 939-965.
- Castric V., Bernatchez L., Belkhir K., Bonhomme F. 2002. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus Fontinalis* Mitchell (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. *Heredity*, 89, 27-35.
- Cihar J. 1976. A color guide to familiar freshwater fishes. Octopus Books limited London. 165pp.
- Coad B.W. 2012. Freshwater fishes of Iran. www.briancoad.com
- Dewoody J.A., Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Fish biology* 56: 461-473.
- Dixon T.J., Coman G.J., Arnold S.J., Sellars M.J., Lyons R.E., Dierens D., Preston N.P. Li Y. 2008. Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. *J. Aquaculture.* 283, 1-6.
- Ferguson A., Taggart J.B., Prodohl P.A., McMeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P. Hynes R.A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish. Bio.* 47, 103-126.
- Grassi F., Imazio S., Gomarasca S., Citterio S., Aina R., Sgorbati S., Sala F., Patrignani G. Labra M. 2004. Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. *J. PlantSci.* 166, 1437-1441.
- Hillis D.M., Mortiz C. Mable B.K. 1996. Molecular systematic. Signature associated.
- Lucentini L., Palomba A., Lancioni H., Gigliarelli L., Natali M., Panara, F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius*). *Fish. Res.* 80, 251-262.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genet.* 89, 583-590.
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* In press.
- Pujolar J.M., Deleo G.A., Ciccotti E., Zane L. 2009 Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. *J. Fish. Bio.* 74, 2034-2046.
- Reed D.H. 2009. When It Comes to Inbreeding: Slower Is Better. *Mol. Ecol.* 18, 4521-4522.

- Rezvani Gilkolaei S., Kavan S.L., Safari R. 2012. A Study of Genetic Structure of *Rutilus frisii kutum* in Anzali Lagoon, Using Microsatellite Markers. J. Agr. Sci. Tech. 14: 327-337.
- Sun Y.F., Sun H.Y., Zhao Y., Qian G.H., Zhao Y., Zhao Q., Liu N.F. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* and cross-species amplification in related taxa (Decapoda: Brachyura). J. Crustacean Biol. 29, 273–274.
- Taylor M., Blust R., Verheyen E. 2001. Characterization of microsatellite loci in the stone loach, *Barbatula barbatula* L. Mol. Eco. Not. 1, 96-97
- Utter F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. J. Fish. Bio. 39, 1-20.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes 4, 535–538.
- Wei Q., Ke F., Zhang J., Zhuang P., Luo J., Zhou R. 1997. Biology, fisheries and conservation of sturgeons and paddlefish in China. Environ. Biol. Fishes 48, 241–255.
- Wright S. 1987. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh F.C., Yang R.C. Boyle T. 1999. POPGENE version 1.3.1. Microsoft Windows-based Freeware for population Genetic Analysis. Retrieved from <http://www.uallberta.ca/fyeh>. On: 11 September 2008.
- Yue G.H., Li Y., Lim L.C., Orban L. 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. J. Aquaculture 237, 89–102.
- Zhao N., Shao Z., Ai W., Zhu B., Brosse S., Chang, J. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis Gray*) genetic variability. J. Ichthyology. 21, 7-13.