

(OPEN ACCESS)

Genetic diversity of round goby (*Neogobius fluviatilis*) of the coast of Golestan province using microsatellite molecular markers

Shiva Sheikh¹, Ali Shabani^{*2}, Roghieh Safari³, Hadiseh Kashiri⁴

1. M.Sc. Student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shiva.sheikh.aquaculture@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shabani@gau.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
4. Associate Prof., Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hadiskashiri@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 06.18.2022

Revised: 06.18.2022

Accepted: 06.19.2022

Keywords:

Genetic diversity,
Golestan province,
Microsatellite,
Molecular marker,
Neogobius fluviatilis

ABSTRACT

In this study, the genetic structure of the Monkey goby population (*Neogobius fluviatilis*) of the Caspian Sea was investigated using microsatellite method. For this purpose, 90 samples were collected from Gomishan wetland, Gorgan River and Gorgan Bay in Golestan province. Genomic DNA was extracted using phenol-chloroform method. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using seven pairs of microsatellite primers and the product was electrophoresed on 8% polyacrylamide gel and then stained with silver nitrate. All applied loci showed polymorphism. The results showed that Monkey goby has proper allelic diversity (mean number of alleles: 2.466) and heterozygosity (average heterozygosity observed: 0.44) in the studied areas. Of the 21 loci-population locus tests, only 1 were in the Hardy-Weinberg equilibrium. Fst value as an indicator of genetic differentiation was 2.5. In this regard, the relatively high gene flow (Nm:4.491) could be considered as an important factor in the low genetic differentiation between the samples of the studied area. The observed gene flow is probably related to factors such as contamination, floods, and the species life history. The results of molecular analysis of variance also showed that most of the observed diversity is within populations. The highest similarity was observed between the samples of Gorgan River and Gorgan Bay.

Cite this article: Sheikh, Shiva, Shabani, Ali, Safari, Roghieh, Kashiri, Hadiseh. 2026. Genetic diversity of round goby (*Neogobius fluviatilis*) of the coast of Golestan province using microsatellite molecular markers. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (2), 253-268.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2022.20338.1676

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی تنوع ژنتیکی گاوماهی شنی (*Neogobius fluviatilis*) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

شیوا شیخ^۱، علی شعبانی^{۲*}، رقیه صفری^۳، حدیثه کشیری^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shiva.sheikh.aquaculture@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shabani@gau.ac.ir
۳. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com
۴. دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hadiskashiri@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: ژنتیک جمعیت، تعیین وسعت تنوع ژنتیکی در بین افراد متعلق به یک گونه می‌باشد یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین ویژگی‌های هر جمعیت برای بقای آن، تنوع ژنتیکی می‌باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف آبزیان به دلیل حفاظت، پایداری و مدیریت ذخایر آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای دارد. در این مطالعه ساختار ژنتیک جمعیت گاوماهی شنی (<i>Neogobius fluviatilis</i>) دریای خزر با استفاده از روش میکروستلایت مورد بررسی قرار گرفت، بدین‌منظور تعداد ۹۰ قطعه ماهی از مناطق تالاب گمیشان، گرگان رود و خلیج گرگان واقع در استان گلستان جمع‌آوری شد. DNA ژنومی با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج گردید. واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) با استفاده از هفت جفت آغازگر میکروستلایت صورت گرفت. نتایج نشان داد که گاوماهی شنی از غنای اللی (میانگین تعداد ال: ۱۰/۴۷۶) و هتروزیگوسیتی مناسبی (میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده: ۰/۷۱۴) در مناطق مورد بررسی برخوردار است. از ۲۱ تست جایگاه ژنی-جمعیت، تنها ۱ تست در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. میزان Fst به عنوان شاخص تمایز ژنتیکی ۰/۰۳۳ به‌دست آمد. در این خصوص جریان ژنی نسبتاً بالای مشاهده شده (Nm: ۴/۴۹۱) را می‌توان به‌عنوان عامل مهمی در تمایز ژنتیکی پایین به‌دست آمده بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی در نظر گرفت.	واژه‌های کلیدی: استان گلستان، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، گاوماهی شنی، نشانگر مولکولی

جریان ژنی مشاهده شده نتایج آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که بخش عمده تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت‌ها می‌باشد. بالاترین میزان شباهت بین نمونه‌های مناطق خلیج گرگان با گرگان‌رود مشاهده شد.

استناد: شیخ، شیوا، شعبانی، علی، صفری، رقیه، کشیری، حدیثه (۱۴۰۵). بررسی تنوع ژنتیکی گاوماهی شنی (*Neogobius fluviatilis*) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۲)، ۲۴۸-۲۵۳.

Doi: 10.22069/japu.2022.20338.1676



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

از اهداف کلی ژنتیک جمعیت، تعیین وسعت تنوع ژنتیکی در بین افراد متعلق به یک گونه می‌باشد (۱). یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین ویژگی‌های هر جمعیت برای بقای آن، تنوع ژنتیکی می‌باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف آبزیان به دلیل حفاظت، پایداری و مدیریت ذخایر آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای دارد (۲). فعالیت‌های انسانی نظیر: اصلاح زیستگاه‌ها، پیوند زدن ذخایر غیربومی به داخل ذخایر بومی، معرفی نژادهای پرورشی و صید بی‌رویه که سبب مهاجرت ماهیان می‌گردند، باعث تغییراتی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت می‌شوند. عدم تنوع ژنتیکی می‌تواند در اثر بهگزینی طولانی‌مدت و از بین رفتن هتروزیگوسیتی به دلیل آمیزش خویشاوندی و یا جداسازی جمعیت‌ها باعث کاهش بقای یک جمعیت گردد. آمیزش خویشاوندی و پیشامد ژنتیکی، از خطرات اصلی در زیرجمعیت‌های ماهیان می‌باشد که منجر به تثبیت ژن‌ها و از بین رفتن قابلیت زیست باروری و مقاومت به بیماری می‌گردد و در نهایت باعث انهدام جمعیت‌های بومی می‌شود؛ بنابراین بهتر آن است که گروه‌های مجزایی از ماهیان به عنوان یک ذخیره ژنتیکی در نظر گرفته شوند و به طور جداگانه کنترل گردند (۳).

تنوع ژنتیکی که از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA در بین افراد حاصل می‌گردد، به عنوان اولین پیش نیاز جهت حفظ سازگاری جمعیت‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر مطرح بوده و دارای اهمیتی حیاتی برای مدیریت و حفاظت از منابع طبیعی آبی می‌باشد (۴)، به‌طوری که کاهش تنوع بین افراد و جمعیت‌ها می‌تواند منجر به کاهش قدرت سازگاری و پتانسیل بازمانی ماهیان در طبیعت گشته و بقای آن‌ها را به مخاطره اندازد. تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها (بین جمعیت‌ها و در میان افراد جمعیت) به عنوان بخشی از تنوع زیستی، نتیجه تفاوت در سطوح

مختلف (نوکلئوتید، ژن، کروموزوم و ژنوم) می‌باشد (۵)؛ در واقع آگاهی از ذخایر توارثی و تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه بسیار حایز اهمیت بوده و داشتن اطلاعات ژنتیکی جزئی ضروری از برنامه‌های مدیریتی در علم زیست‌شناسی حفاظت در نظر گرفته می‌شود (۶). داده‌های توالی DNA منابع اولیه اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی بوده که در پایگاه‌های بین‌المللی ذخیره شده و مدیریت می‌شوند (۷). کاهش تنوع ژنتیکی ممکن است منجر به کاهش بقا جمعیت و افزایش احتمال انقراض، به ویژه برای جمعیت با شرایط محیطی پرفشار شود (۸، ۹ و ۱۰).

گاوماهی شنی (*Neogobius fluviatilis*) یکی از گونه‌های مهم اکولوژیکی است که در آب‌های شیرین، لب‌شور و بتتوپلاژیک (بستر و دور از بستر) زیست نموده (۱۱) و بومی اوراسیا (حوضه‌های دریای سیاه و آزوف) و دریای خزر است (fishbase.ir). این ماهی، جمعیت‌های غیربومی بزرگ در حوضه دریای مرمره، در مانیاس، ساپانکا و رودخانه کازولی، دریای سیاه و نواحی اطراف آن از جمله رودخانه دانوب و شاخه‌های آن، تالاب‌ها و مصب‌های شمال غربی دریای سیاه، دریای آزوف و رودخانه‌های قفقاز را ایجاد کرده است. اخیراً این گونه به عنوان یک گونه مهاجم در برخی از کشورهای اروپایی ثبت شده است. این ماهی بومی آب‌های ایرانی دریای خزر و رودهای آن نظیر: قره‌سو، گرگان‌رود، سفیدرود، تالاب گمیشان، سواحل آستارا، انزلی، چابکسر، چمخاله و ساحل نور، پارک ملی گلستان و رودخانه زرین گل (البرز شرقی) است (fishbase.ir). این ماهی دارای ارزش اکولوژیک به عنوان غذای ماهیان باارزش است. برای انسان نیز ارزش خوراکی دارد. در جنوب دریای خزر بهره‌برداری تجاری ندارد اما در شمال دریای خزر ۵۴ درصد از صید گاوماهیان را تشکیل می‌دهد (fishbase.ir).

تعیین هویت بسیار توانمند ساخته است. نشانگرهای ریز ماهواره مقدار بسیار کمی DNA نیاز داشته و به وسیله واکنش زنجیری پلیمرز قابل تکثیرند؛ به علاوه امتیازدهی آن‌ها آسان و دقیق است و در نهایت قابلیت استفاده از نشانگرهای گونه‌های بسیار نزدیک دیگر وجود دارد (۱۸).

مزیت نشانگرهای مولکولی را می‌توان براساس ظرفیت اطلاعات پلی‌مورفیک آن‌ها (PIC) سنجید. PIC به ارزش یک نشانگر جهت شناسایی پلی‌مورفسم اشاره می‌کند و به تعداد آلل‌های شناسایی شده و فراوانی آن‌ها بستگی دارد (۱۹).

تنوع در توالی DNA می‌تواند در مکان‌های خاص با روش‌هایی که تحت تأثیر جهش نیستند ایجاد شود. این توالی‌ها ممکن است خیلی کوچک (از ۱ تا ۱۰ bp) یا مقداری بزرگتر باشند، اما ویژگی کلیدی این توالی‌های تکراری این است که تعداد تکرارها بین افراد می‌تواند خیلی متفاوت باشد (۲۰). به خصوص در حال حاضر مارکرهای میکروستلایت به دلیل این که: هم بارز هستند (هر دو آلل قابل تشخیص هستند)؛ بنابراین می‌توانند تحت مدل هاردی-واینبرگ مورد آنالیز قرار بگیرند، از طرفی به عنوان DNA غیرقابل ترجمه می‌توانند به عنوان نمونه‌هایی که تحت فشار بهگزینی نیستند مورد توجه قرار گیرند، به علت تعداد بالای آلل و لکوس در هر جایگاه و حداقل به دلیل این که توالی‌یاب اتوماتیک DNA می‌تواند در لکوس میکروستلایت برای تعیین ژنوتیپ مورد استفاده قرار گیرد به طور فزاینده‌ای تعداد نمونه‌هایی که می‌تواند مورد بررسی قرار بگیرد را افزایش می‌دهد (۲۱).

اهمیت نشانگرهای نوع اول در زمینه ژنتیک آبزیان در مراحل ابتدایی بوده، اما واضح است که این نشانگرها بسیار مهم می‌باشند. علاوه بر عملکرد آن‌ها در مطالعات جمعیتی، در مطالعات پیوستگی ژنتیکی و

امروزه کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط دنیا توجه محققین را به اعمال روش‌های دقیق مولکولی جهت آگاهی از وضعیت جمعیت گونه‌های مختلف آبزی به خود جلب نموده است (۱۲). در ابتدا ارزیابی ساختار جمعیت‌ها، از طریق بررسی صفات مورفومتریک و مریستیک انجام می‌پذیرفت اما، با در نظر گرفتن عواملی همچون حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و یا محدود بودن داده‌های حاصل از تفسیر آن، نشانگرهای مولکولی گوناگونی توسعه یافتند که در بین آنها، نشانگرهای ریزماهواره کاربرد گسترده‌تری نسبت به سایرین در مطالعات ژنتیک جمعیت داشته (۱۳) و به عنوان ابزاری مناسب، دقیق و ساده جهت ارزیابی ساختار ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در بین ماهیان مطرح می‌باشند (۱۴).

ریزماهواره‌ها، توالی‌های کوتاه و تکراری DNA هستند که دارای کاربردهای فراوانی در ژنتیک تکاملی و حفاظتی می‌باشند (۱۵). این نشانگرها به علت بالا بودن تعداد آلل‌هایشان، در بین تمام نشانگرها بالاترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (۱۶). این چند شکلی بسیار بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره می‌توانند برای آنالیز ژنتیک جمعیت و تعیین نژادها بسیار مفید باشند (۱۷). علت اصلی کاربرد این نشانگرها قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه تحلیل‌های جمعیتی و همچنین مطالعات اکولوژیکی می‌باشد. نشانگرهای ریزماهواره دارای مزایای متعددی می‌باشند. از جمله این که دارای توارث همباز بوده و از توارث ساده مندلی تبعیت می‌کنند؛ به علاوه در ژنوم موجودات به فراوانی یافت می‌شوند و پراکندگی آن‌ها نیز در سطح ژنوم موجودات عالی یکنواخت می‌باشند. همچنین چندشکلی بالایی دارند؛ علاوه بر این توانایی آن‌ها در تشخیص میان افراد، در صورت استفاده از ترکیبی از جایگاه‌ها، این تکنیک را در مطالعه جریان ژنی و

تهیه نقشه QTL (Quantitative trait loci) اهمیت زیادی دارند و نشانگرهای نوع I در مطالعات ژنوم (مقایسه‌ای)، شناسایی ژن موردنظر و افزایش ارتباط بین مراکز تحقیقاتی مفید هستند. نشانگرهای نوع دوم مثل RAPD، ریزماهواره و AFLP به‌عنوان نشانگرهای غیرکدکننده در نظر گرفته می‌شوند. چنین نشانگرهایی در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده‌ای دارند و شناسایی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها براساس تعادل هاردی-واینبرگ انجام می‌شود (۱۹).

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۸۰ قطعه گاوماهی دم‌گرد از سواحل جنوب شرقی دریای خزر (گرگان رود ۳۰ نمونه)، (خلیج گرگان ۳۰ قطعه) و (تالاب گمیشان ۳۰ قطعه) واقع در استان گلستان طی بهار ۱۴۰۰ تا بهار ۱۴۰۱ به‌وسیله قلاب صید گردید. برای انجام تحقیق از باله پشتی ماهیان صید شده به وسعت تقریباً 1×1 سانتی‌متر از هر نمونه خارج و به‌طور جداگانه در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی اتانول ۹۶ درصد قرار گرفت، سپس نمونه‌ها جهت انجام مراحل آزمایش به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبزیان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند. DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم (۲۲) طبق پروتکل سازنده استخراج شد. طی این روش باله ماهی خرد شده و به آن ۵۰۰ میکرولیتر فنول اضافه و سپس ۵۰۰ میکرولیتر الکل خالص اضافه کرده و ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. سپس به نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد اضافه و دو دقیقه سانتریفیوژ کرده و در مرحله آخر ابتدا ۳۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده و در مرحله نهایی به هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر آب اضافه نموده و ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار گرفتند.

واکنش زنجیره پلیمرز با استفاده از پرایمر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا واکنش PCR ذخیره گردید. از ۷ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (Nme1، Nme3، Nme8، Nme10، Ame23، Ame24 و NG 92) (جدول ۱). به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی گاوماهی شنی استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از یک سیستم چرخه حرارتی با حجم واکنش ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. تکثیر جایگاه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (مدل MJ MiniTM) در چرخه‌های دمایی، ۹۴ درجه برای ۱ دقیقه (وا سرشته‌شدن اولیه)، ۹۴ درجه برای ۱۵ ثانیه (وا سرشته شدن)، ۵۵-۴۸ درجه برای ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه با تعداد ۳۰ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۲ دقیقه برای آغازگرهای Nme و برای آغازگرهای Ame و NG در چرخه‌های دمایی، ۹۴ درجه برای ۲ دقیقه (واسرشته‌شدن اولیه)، ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه (واسرشته شدن)، ۶۰-۵۸ درجه برای ۱ دقیقه (الحاق)، ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه برای گونه گاوماهی شنی انجام گرفت (۲۳). واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس با غلظت مصرفی ۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر فوروارد، ۱ میکرولیتر ریورس، ۶ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و میزان غلظت ۲ میکرولیتر DNA نمونه انجام شد. قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (۱:۲۹) اکریل آمید. بیس اکریل آمید، بافر TBE 10X، APS، TEMED و آب مقطر تزریقی

غیردنا توره در الکتروفورز عمودی بارگیری و سپس ژل آماده شده با استفاده از نیترا ت نقره (۲۴) رنگ آمیزی گردید. ژل در ولتاژ ۲۲۰ و به مدت ۴ ساعت بارگیری شد. در ادامه، تصویر ژل ها توسط اسکنر ثبت و طول قطعات با استفاده از نرم افزار GelAnalyzer محاسبه گردید. شاخص های تنوع شامل: تعداد آل واقعی، تعداد آل موثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، شاخص شانون و تعادل هاردی-واینبرگ در برنامه ژن الکس (ورژن ۶/۳) اندازه گیری شد.

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای گاوماهی شنی.

Table 1. Sequences and characteristics of microsatellite primers used for the Monkey goby.

جایگاه (مرجع) Locus (Reference)	شماره دسترسی بانک ژن GenBank accession no.	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	دامنه آلی Allele ranges	دمای اتصال Annealing (°C)
Nme 01 (25)	DQ999976	F: CGA GCG CTA AAA TAG AAG AAA A R: TCC AGT GGC TTG AGT GAT GT	212-340	48
Nme 03 (25)	DQ999978	F: GCG GGA GTC AAG AAT TGA AC R: TTG TTA GAA TGT ATT ATG CCA TAG CC	124-176	48
Nme 08 (25)	DQ999983	F: ATG GAG TTT CTG GGC AGT TG R: CTC CGT CGA TTG TGT TCT GA	271-285	55
Nme 10 (25)	DQ999985	F: GCG ATT ATG AGG TTC GGA GA R: ATC AGC AAC CCC TGA ACA GA	267-287	48
Ame 23 (26)	EU732740	F: AAA GCA TCA GCA GCA GTT GT R: TAT GTG AGT GTG CGG ATG GT	159-318	58
Ame 24 (26)	EU732741	F: CTC GAA AAC TTA GCA GTG CAG R: TCA ATG CGC CTC TAC TCT ACT C	191-287	58
NG 92 (27)	EF029939	F: AAG CAA CTC ACG CCA AAG TC R: AGT GCT GCC ATG TCA ATC TG	185-197	60

وینبرگ، شاخص FIS به عنوان ضریب درون آمیزی (کاهش یا افزایش هتروزیگوسیتی) و سطح معنی داری آن استفاده شد. از نرم افزار ۱,۳۱ PopGene (۳۱) نیز جهت تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی استفاده گردید.

نتایج

در این تحقیق، هر هفت جایگاه مورد مطالعه چندشکلی نشان دادند. تعداد آل های واقعی و موثر و همچنین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده است (جدول ۲). متوسط تعداد آل های واقعی و موثر

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم افزار ۶,۳ GenAlex (۲۸) به منظور ارزیابی تعداد آل موثر، تعداد آل در هر جایگاه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، جریان ژنی، نحوه توزیع تنوع مشاهده شده، شاخص Fst بر اساس مدل الی بی نهایت (IAM) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی استفاده شد. بررسی جمعیت ها از نظر انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ با مقایسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و عدم تعادل پیوستگی با نرم افزار ۳,۱ Genepop (۲۹) صورت گرفت. همچنین از نرم افزار 2.9.3 FSTAT (۳۰) جهت بررسی علت انحراف از تعادل هاردی-

به ترتیب ۱۰/۴۷۶ و ۷/۵۲۸ بود که در این میان بالاترین میزان الل‌های واقعی (Na:۱۸) و مؤثر (Ne:۱۳/۳۳۳) به ترتیب در جایگاه Nme1 (گرگان‌رود) و Ame23 (خلیج گرگان) مشاهده شد؛ هم‌چنین پایین‌ترین میزان الل‌های واقعی در جایگاه تالاب گمیشان (Na:۵) در سطح جایگاه Ame23 و NG92 و پایین‌ترین میزان الل‌های مؤثر در منطقه گرگان‌رود (Ne:۲/۸۹۹) در سطح جایگاه Nme3

به دست آمد. میانگین مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) نیز به ترتیب ۰/۷۱۴ و ۰/۸۴۵ به دست آمد. میانگین الل‌های خاص در نمونه‌های مربوط به تالاب گمیشان، گرگان‌رود و خلیج گرگان نیز به ترتیب ۱۱/۶۶، ۱۴ و ۱۵ به دست آمد. اطلاعات مربوط به الل‌های خاص بر حسب جمعیت‌های مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی برای هفت جایگاه ریزماهورای در گونه *N. fluviatilis*.

Table 2. Genetic diversity parameters for seven microsatellite loci in the species *N. fluviatilis*.

NG92	Ame24	Ame23	Nme10	Nme8	Nme3	Nme1	رودخانه/جایگاه River/Location
5.000	10.000	5.000	7.000	9.000	7.000	13.000	Na
3.828	7.143	4.103	5.161	7.692	4.444	10.811	Ne
1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	Ho
0.739	0.860	0.756	0.806	0.870	0.775	0.908	He
***	***	**	**	***	***	***	pHw
-0.354	-0.163	-0.322	-0.240	1.000	1.000	-0.102	FIS
12.000	13.000	12.000	12.000	7.000	6.000	18.000	Na
7.843	8.247	7.767	6.667	5.405	2.899	10.811	Ne
1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	Ho
0.873	0.879	0.871	0.850	0.815	0.655	0.908	He
***	**	ns	***	***	***	***	pHw
-0.146	-0.138	-0.148	-0.176	1.000	1.000	-0.102	FIS
11.000	14.000	16.000	10.000	8.000	8.000	17.000	Na
9.524	10.127	13.333	6.723	7.143	5.714	12.698	Ne
1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	Ho
0.895	0.901	0.925	0.851	0.860	0.825	0.921	He
***	***	**	***	***	***	***	pHw
-0.117	-0.110	-0.081	-0.175	1.000	1.000	-0.085	FIS
9.333	12.333	11.000	9.667	8.000	7.000	16.000	Na
7.065	8.506	8.401	6.184	6.747	4.352	11.440	Ne
1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	Ho
0.835	0.880	0.851	0.836	0.848	0.752	0.922	He
-0.206	-0.137	-0.184	-0.197	1.000	1.000	-0.096	FIS

Na: تعداد الل‌ها، Ne: تعداد الل‌های مؤثر، Ho: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزایگوسیتی مورد انتظار، pHw: تست احتمال تعادل هاردی-وینبرگ پس از ضریب تصحیح بونفرونی (ns: عدم معنی‌داری، *: $P<0.05$ ، **: $P<0.01$ ، ***: $P<0.001$)، FIS: ضریب درون‌آمیزی: مقادیر معنی‌دار به صورت پررنگ آورده شده است

Na: number of alleles; Ne: effective number of alleles; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; pHw: probability value for Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction (ns: not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$); FIS: inbreeding coefficient. Statistically significant values are indicated in bold

جدول ۳- اطلاعات مربوط به الل‌های خاص در رودخانه‌های مورد بررسی.

Table 3. Information on specific alleles in the studied rivers.

منطقه	جایگاه	الل	فراوانی
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	Nme8	9	0.050
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	Nme1	18	0.025
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	Nme10	11	0.050
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	Nme10	12	0.050
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	NG92	12	0.025
تالاب گمیشان Gomishan Wetland	Nme3	8	0.050
رودخانه گرگان رود Gorganrud River	Ame23	13	0.025
رودخانه گرگان رود Gorganrud River	Ame23	14	0.100
رودخانه گرگان رود Gorganrud River	Ame23	15	0.050
خلیج گرگان Gorgan Gulf	Ame23	16	0.050
خلیج گرگان Gorgan Gulf	Ame24	14	0.025

انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ نیز در سطح جایگاه-جمعیت مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). در اغلب جایگاه‌ها انحراف از تعادل بالایی در سطح سه منطقه مورد بررسی مشاهده شد. بین ۲۱ تست ممکن (۳ منطقه $7 \times$ جایگاه) تنها ۱ تست شامل جایگاه Ame23 (گرگان رود) در تعادل قرار داشت. در بررسی شاخص درون آمیزی متوسط FIS، 0.169 به دست آمد. در بیش‌تر جایگاه‌های مورد بررسی نیز افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شد (جدول ۲). عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) نیز بین هیچ‌یک از جایگاه‌های مورد استفاده مشاهده نشد.

در بررسی جریان ژنی بین مناطق مورد بررسی، متوسط شاخص Nm، 4.491 به دست آمد که بالاترین و پایین‌ترین جریان به ترتیب بین مناطق خلیج گرگان با گرگان‌رود ($7/689$) و گرگان رود با تالاب گمیشان ($2/351$) مشاهده شد (جدول ۴). تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های مناطق مورد نظر نیز با بررسی شاخص Fst ارزیابی گردید. متوسط شاخص Fst، 0.033 بود که بالاترین مقادیر بین نمونه‌های متعلق به گرگان‌رود و تالاب گمیشان به دست آمد (جدول ۵). نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی درون جمعیت‌ها وجود دارد (94 درصد). در بررسی شاخص‌های شباهت و فاصله

ژنتیکی، بالاترین و پایین‌ترین میزان فاصله به‌ترتیب
 بین نمونه‌های گرگان رود با تالاب گمیشان (۰/۵۸۴)
 و خلیج گرگان با گرگان رود (۰/۳۰۳) مشاهده
 گردید. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که ۹۳
 درصد از تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت
 و ۷ درصد مربوط به بین جمعیت بود.

جدول ۴- جریان ژنی (Nm) بین مناطق مورد بررسی.

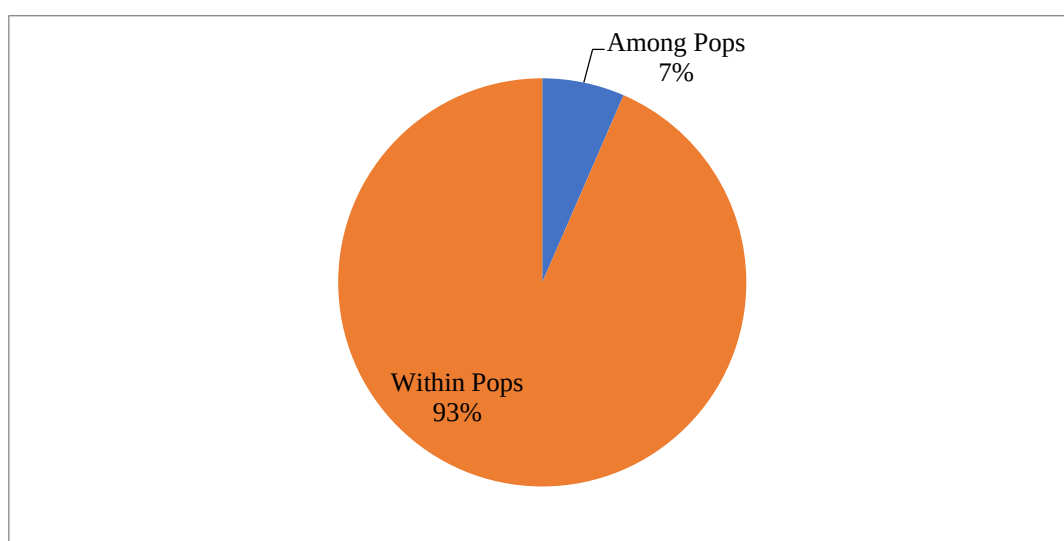
Table 4. Gene flow (Nm) among the studied areas.

خلیج گرگان Gorgan Gulf	رودخانه گرگان‌رود Gorganrud River	تالاب گمیشان Gomishan Wetland	مناطق نمونه‌برداری Sampling areas
-	-	0.000	تالاب گمیشان Gomishan Wetland
-	0.000	2.351	رودخانه گرگان رود Gorganrud River
0.000	7.689	3.433	خلیج گرگان Gorgan Gulf

جدول ۵- تمایز ژنتیکی بین مناطق مورد بررسی.

Table 5. Genetic differentiation among the studied regions.

خلیج گرگان Gorgan Gulf	رودخانه گرگان‌رود Gorganrud River	تالاب گمیشان Gomishan Wetland	مناطق نمونه‌برداری Sampling areas
-	-	0.000	تالاب گمیشان Gomishan Wetland
-	0.000	0.046	رودخانه گرگان رود Gorganrud River
0.000	0.022	0.033	خلیج گرگان Gorgan Gulf



شکل ۱- آنالیز واریانس مولکولی جمعیت گاوماهی شنی.

Figure 1. Analysis of molecular variance of the Monkey goby population.

بحث

امروزه نشانگرهای ریزماهواره به دلیل مزایای بیش‌تر، کاربرد گسترده‌تری نسبت به سایر نشانگرها در مطالعات ژنتیک جمعیت و تنوع ژنتیکی دارند (۱۹). تنوع ژنتیکی به عنوان شاخص مهمی از وضعیت اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی مطرح بوده (۳۲) که آگاهی از آن جهت مدیریت و حفظ ذخایر ماهیان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. هتروزیگوسیتی نیز شاخص بسیار مهمی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بوده و در مطالعات ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیاری دارد، زیرا هر هتروزیگوت ناقل ال‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (۴). در این راستا، پیراسنجه‌های مرتبط با تنوع ژنتیکی هم‌چون غنای الی و هتروزیگوسیتی از نظر مواجهه جمعیت‌ها با تغییرات محیطی بسیار مهم بوده (۳۳) و بر ویژگی‌های مهمی هم‌چون توانایی رقابت، بقا و اندازه بدن تأثیرگذار می‌باشد (۳۴) به‌طوری‌که کاهش تعداد ال‌های مشاهده شده در سطح جمعیت‌ها می‌تواند بیانگر کاهش سطح تنوع ژنتیکی (۳۵) و بالا بودن آن بیانگر بالاتر بودن اندازه مؤثر جمعیت باشد. دوودی و آویسه (۲۰۰۰) در ارزیابی تنوع ریزماهواره‌ای ۷۸ گونه مختلف آب شیرین، رودکوچ و دریایی نشان دادند که روند کاهشی از نظر غنای الی و هتروزیگوسیتی به‌ترتیب از ماهیان دریایی به رود کوچ و سپس آب شیرین وجود دارد (۳۶). در بررسی حاضر، میانگین الی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب ۱۰/۴۷۶ و ۰/۷۱۴ به‌دست آمد که کمی بالاتر از مقادیر گزارش شده برای ماهیان آب شیرین (میانگین الی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب: ۵/۷ و ۴۶/۰) توسط دوودی و آویسه (۲۰۰۰) می‌باشد (۳۶). بنابراین با توجه به میزان ال و هتروزیگوسیتی به‌دست آمده در تحقیق حاضر و مقایسه آن با مقادیر گزارش شده برای ماهیان آب

شیرین می‌توان بیان داشت که گاوماهی دم‌گرد از غنای الی و هتروزیگوسیتی مناسبی در مناطق مورد بررسی برخوردار است.

در شرایط بزرگ بودن بیش از اندازه جمعیت، تصادفی بودن آمیزش‌ها و عدم وجود جهش، به‌گزینی و مهاجرت، فراوانی الی و ژنوتیپی می‌تواند از نسلی به نسل دیگر ثابت بماند که تحت عنوان تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌شود. با توجه به این موضوع، انتظار انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت‌های وحشی وجود دارد (۳۷). در تحقیق حاضر، تنها ۱ تست از ۲۱ تست ممکنه (۷ جایگاه $\times$ ۳ جمعیت) در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشت. انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ می‌تواند ناشی از عوامل متعددی هم‌چون اندازه کوچک نمونه، اشتباه در خواندن و تفسیر ال‌ها مثلاً وجود ال‌های نول (۳۸)، مهاجرت، رانش ژنتیکی و به‌گزینی (۳۹) باشد. در پژوهش حاضر کسری هتروزیگوسیتی معنی داری در سطح جایگاه Nme3 و Nme8 مشاهده شد. دلایل زیستی کسری هتروزیگوسیتی به خوبی شناخته نشده و عوامل بسیاری هم‌چون درون‌آمیزی و ال‌های نول در بروز چنین کسری دخیل می‌باشند. در این خصوص، با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزار Microchecker، وجود ال‌های نول را می‌توان به‌عنوان عاملی مهم در کسری مشاهده شده معرفی نمود. جدا از دلایل بیولوژیکی معمول در ایجاد کسری هتروزیگوسیتی، ریزماهواره‌ها نیز به‌طور خاص مستعد این پدیده می‌باشند (۴). به هر حال، یک عامل به تنهایی نمی‌تواند علت انحراف از تعادل را نمایان سازد و عوامل مختلفی می‌توانند در بروز این انحراف مؤثر باشند. در این خصوص، متوسط شاخص FIS، بالاتر از صفر (۰/۱۶۹) به‌دست آمد که می‌تواند حاکی از آمیزش خویشاوندی و اختلاط جمعیت‌ها باشد (۳۱). این امر به عنوان مسأله‌ای مهم در جمعیت‌های

ماهیان مطرح بوده که افزایش آن در درازمدت می‌تواند منجر به کاهش هتروزیگوسیتی، کاهش مقاومت و بقا و در معرض خطر قرار گرفتن جمعیت‌های بومی شود (۳). تمامی عوامل ذکر شده در کنار جریان ژنی مشاهده شده (میانگین: ۴/۴۹۱) می‌تواند علت انحراف از تعادل مشاهده شده را توجیه نماید. هم‌چنین در این بررسی در بیش‌تر جایگاه‌های مورد استفاده افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شد که این افزایش تنها در مورد جایگاه‌های Nme10، Ame23 و Ame24 معنی‌دار بود. انحراف ژنتیکی تصادفی و خطای PCR را می‌توان از عوامل احتمالی این افزایش مطرح نمود (۴۰). با توجه به این‌که شرایط PCR برای جایگاه‌های مورد استفاده بهینه بود، انحراف ژنتیکی تصادفی را می‌توان به عنوان عامل اصلی افزایش هتروزیگوسیتی در نظر گرفت. جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی بین مناطق باشد. این موضوع به‌ویژه در رودخانه‌هایی که باهم در ارتباط هستند می‌تواند منجر به کاهش تنوع و تمایز ژنتیکی بین افراد گردد. در واقع، با تبادل افراد، تبادل ژن‌ها نیز پیش می‌آید و تبادل بیش‌تر منجر به کم شدن تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌گردد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز حاکی از تباین ژنتیکی بالا در داخل گروه‌ها بوده به‌طوری که ۹۳ درصد تنوع مشاهده شده در داخل جمعیت‌ها و تنها ۷ درصد تنوع در بین نمونه‌های مناطق مورد بررسی مشاهده گردید. این موضوع بیانگر آن است که بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (۴).

طبق تقسیم‌بندی رایت (۱۹۷۸)، مقادیر F_{st} ۰-۰/۰۵، ۰/۰۵-۰/۱۵ و ۰/۱۵-۰/۲۵ به‌ترتیب نشان‌دهنده سطح پایین، متوسط و بالای تمایز ژنتیکی می‌باشد (۴۱). در مطالعه قبلی صورت گرفته روی گاوماهی خزری در سواحل انزلی و بندرترکمن میزان شاخص F_{st} ۰/۱۴۷ به دست آمد که نشان از تباین جمعیت‌های

مورد بررسی بود (۴۲). هم‌چنین در پژوهشی دیگر توسط پورغلام و همکاران (۱۳۹۰) شاخص F_{st} ۰/۰۳۴ بین نمونه‌های گاوماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) سواحل مازندران و گلستان گزارش شد (۴۳). در تحقیق حاضر نیز متوسط شاخص F_{st} ۰/۰۳۳ به‌دست آمد. اگرچه میزان F_{st} مشاهده شده در محدوده تمایز پایین قرار دارد اما می‌تواند بیانگر تمایز ژنتیکی مهمی باشد (۴۴). پایین بودن میزان تمایز بین جمعیت‌ها نشان‌دهنده وجود جریان ژنی قابل‌توجه می‌باشد (۴۵). در این بررسی میانگین شاخص جریان ژنی (Nm)، ۴/۴۹۱ به‌دست آمد که در این میان بالاترین میزان جریان بین نمونه‌های خلیج گرگان با گرگان‌رود (۷/۶۸۹) مشاهده شد. احتمال می‌رود جریان ژنی مشاهده شده مرتبط با تاریخچه زندگی این گونه در راستای گسترش ال‌های سودمند بین جمعیت‌ها و افزایش سازگاری به تغییرات محیطی نیز باشد. ممکن است شباهت ژنتیکی مشاهده شده بین جمعیت‌ها ناشی از یک اثر فاندرینگ معمول باشد که این الگوی تاریخی تا به امروز هم ادامه داشته است زیرا جریان ژنی بالا می‌تواند از تحلیل آن از طریق رانش، جلوگیری نماید. از طرفی ممکن است زمان کافی از هنگام کلونیزه شدن تا رسیدن به تعادل مهاجرت-رانش ژنتیکی سپری نشده باشد چرا که به دنبال یک رویداد فاندرینگ تا رسیدن به تعادل ده‌ها تا صدها نسل زمان نیاز است (۴۶ و ۴۷). به هر حال، میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها بر اساس F_{st} ممکن است بالاتر از حد برآورد گردد چرا که احتمال دارد شباهت مشاهده شده ناشی از اجداد آن‌ها باشد. مثلاً هنگامی که میزان F_{st} پایین است احتمالاً جریان ژنی بالایی برآورد خواهد شد در حالی که در واقع ممکن است تعداد کمی از افراد جمعیت‌ها مبادله شوند (۴۸). به هر حال، با توجه به این‌که توانایی لاروها، بچه‌ماهیان و

شباهت بین نمونه‌های رودخانه‌های خلیج گرگان و گرگان رود مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد گاوماهی شنی به‌عنوان یک گونه آب شور از تنوع ژنتیکی مطلوبی در رودخانه‌های مورد بررسی برخوردار باشد، با این وجود مسائلی مانند: خشکسالی، احداث سد، تغییر زیستگاه، بهره‌برداری از آب و هم‌چنین آلودگی‌های مختلف به‌ویژه آلودگی‌های ناشی از رواناب‌های کشاورزی و فاضلاب‌های صنعتی که رودخانه‌های موردنظر با آن مواجه هستند، ممکن است تنوع مشاهده شده و بقای این گونه بومی را در درازمدت تحت‌تأثیر قرار دهد. در واقع دستکاری و تغییرات رو به افزایش رودخانه‌ها از یک سو و عدم وجود اطلاعات کافی از سوی دیگر، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر در زمینه بیولوژی و اکولوژی این ماهی را نمایان می‌سازد، چرا که فقدان اطلاعات علمی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مسائل در امر حفاظت از ماهیان آب شور ایران مطرح می‌باشد.

ماهیان بالغ در نرخ مهاجرت این ماهیان به خوبی شناخته نشده، نیاز به تحقیقات بیشتر در آینده به‌ویژه در زمینه بیولوژی، الگوها و نرخ پراکنش آن‌ها می‌باشد. در این خصوص روش‌های فیلوجغرافیایی می‌تواند به‌عنوان ابزاری سودمند جهت برآورد بهتر جریان ژنی مورد استفاده قرار گیرد (۴۹ و ۵۰).

نتایج مربوط به آزمون واریانس مولکولی نیز بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در داخل گروه‌ها و تنوع پایین بین آن‌ها می‌باشد. طبق پارامترهای پیشنهادی توسط تورپ (۱۹۸۲)، مقادیر شباهت ژنتیکی جمعیت‌های متعلق به گونه مشابه و گونه‌های متعلق به جنس مشابه به‌ترتیب در محدوده ۰/۸-۰/۹ و ۰/۳۵-۰/۸۵ قرار داشته و مقدار شباهت گونه‌هایی با جنس متفاوت پایین‌تر از ۰/۳۵ می‌باشد (۵۱). میانگین شاخص شباهت ژنتیکی در تحقیق حاضر ۰/۶۴۵ به‌دست آمد که در محدوده گونه‌های هم‌جنس قرار دارد. بالاترین میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های خلیج گرگان و گرگان رود و پایین‌ترین میزان جریان ژنی نیز بین این دو منطقه مشاهده شد. هم‌چنین پایین‌ترین فاصله ژنتیکی و در عین حال بالاترین

منابع

- Çiftçi, Y., & Okumuş, İ. (2002). Fish population genetics and applications of molecular markers to fisheries and aquaculture: I-Basic principles of fish population genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2(2).
- Radkhah, A., & Sadeghi Nejad Masouleh, E. (2019). Application of single nucleotide polymorphism (SNP) as a molecular marker in the study of genetic diversity of aquatic populations. *Journal of Ornamental Aquatics*, 6(2), 11-19. [In Persian]
- Ferguson, M. (1995). 4 The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. *Molecular Genetics in Fisheries*, 4(3), 81.
- Diz, A. P., & Presa, P. (2009). The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*, 287(3-4), 278-285.
- Dudu, A., & Georgescu, S. E. (2015). Evaluation of Genetic Diversity in Fish Using Molecular. *Molecular approaches to genetic diversity*, 163.
- Ludwig, A. (2006). A sturgeon view on conservation genetics. *European Journal of Wildlife Research*, 52(1), 3-8.
- Brunak, S., Danchin, A., Hattori, M., Nakamura, H., Shinozaki, K., Matise, T., & Preuss, D. (2002). Nucleotide sequence database policies. *Science*, 298(5597), 1333-1333.

8. Vandewoestijne, S., Schtickzelle, N., & Baguette, M. (2008). Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. *Bmc Biology*, 6(1), 46.
9. Markert, J. A., Champlin, D. M., Gutjahr-Gobell, R., Grear, J. S., Kuhn, A., McGreevy Jr, T. J., ... & Nacci, D. E. (2010). Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 205.
10. Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
11. Smirnov A. I. (1986). Perch-likes (gobiids), scorpionfishes, flatfishes, clingfishes, anglerfishes. *Fauna of Ukraine*, 8(5), 320. [In Russian]
12. Lin, Y. S., Poh, Y. P., Lin, S. M., & Tzeng, C. S. (2002). Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. *Zoological Studies-Taipei*, 41(4), 421-430.
13. Verspoor, E., & Jordan, W. C. (1989). Genetic variation at the Me-2 locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. *Journal of Fish Biology*, 35, 205-213.
14. Rashed, M. A., Saad, Y. M., Atta, A. H., & Ahmed, N. E. (2011). Reconstruction of phylogenetic relations among Four Tilapia species. *World Applied Science Journal*. 14(3), 456-462.
15. Angers, B., & Bernatchez, L. (1998). Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidea) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15(2), 143.
16. Liu, Z. (2007). Microsatellite markers and assessment of marker utility. *Aquaculture Genome Technologies*, 43-58.
17. Dunham, R. (2023). Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches, Cabi.
18. O'reilly, P., & Wright, J. M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of fish biology*, 47, 29-55.
19. Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4), 1-37.
20. Beaumont, A. R., & Hoare, K. (2003). Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell publishing company.
21. Carvalho, G. R., & Pitcher, T. J. (1996). DNA analysis. *Fishery Bulletin*, 94, 31-40.
22. Hillis, D. M. (1996). Nucleic acids IV: sequencing and cloning. *Molecular Systematic*, 321-81.
23. Rezaei, M., Shabani, A., Shabanpour, B., & Kashiri, H. (2011). Microsatellites reveal weak genetic differentiation between *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) populations south of the Caspian Sea. *Animal Biology*, 61(4), 469-483.
24. Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2).
25. Dufour, B. A., Hogan, T. M., & Heath, D. D. (2007). Ten polymorphic microsatellite markers in the invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1205-1207.
26. Feldheim, K. A., Willink, P., Brown, J. E., Murphy, D. J., Neilson, M. E., & Stepien, C. A. (2009). Microsatellite loci for Ponto-Caspian gobies: markers for assessing exotic invasions. *Molecular Ecology Resources*, 9(2), 639-644.
27. Vyskočilová, M., Ondračková, M., Šimková, A., & Martin, J. F. (2007). Isolation and characterization of microsatellites in *Neogobius kessleri* (Perciformes, Gobiidae) and cross-

- species amplification within the family Gobiidae. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 701-704.
28. Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
29. Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.
30. Goudet, J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3.2). [http:// www.unil.ch/izea/ softwares/ fstat.html](http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html).
31. Yeh, F. C. (1999). POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft window-bases freeware for population genetic analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
32. Zhou, J., Wu, Q., Wang, Z., & Ye, Y. (2004). Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 40(10), 1144-1148.
33. Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular ecology*, 17(1), 325-333.
34. Håkansson, J., & Jensen, P. (2005). Behavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*)—possible implications for conservation. *Biological conservation*, 122(3), 431-439.
35. Lind, C. E., Evans, B. S., Knauer, J., Taylor, J. J., & Jerry, D. R. (2009). Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture*, 286(1-2), 12-19.
36. DeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56(3), 461-473.
37. Dixon, T. J., Coman, G. J., Arnold, S. J., Sellars, M. J., Lyons, R. E., Dierens, L., ... & Li, Y. (2008). Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. *Aquaculture*, 283(1-4), 1-6.
38. Borrell, Y. J., Bernardo, D., Blanco, G., Vázquez, E., & Sánchez, J. A. (2008). 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*, 9(4), 807-819.
39. Bhassu, S., Yusoff, K., Panandam, J. M., Embong, W. K., Oyyan, S., & Tan, S. G. (2004). The genetic structure of *Oreochromis* spp. (Tilapia) populations in Malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. *Biochemical Genetics*, 42(7), 217-229.
40. Li, J., Wang, G., & Bai, Z. (2009). Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 287(3-4), 286-291.
41. Wright, S. (1984). Variability within and among natural populations. *Evol Genet Popul.* 4.
42. Rezvani Gilkolaei, S., Ghotb Razmjoo, E., Lalouei, F., Taghavi, M. J., & Norouzi, M. (2011). Genetic comparison of Caspian goby in the west and east of the southern coasts of the Caspian Sea using microsatellite method. *Taxonomy and Biosystematics*, 3(6), 12-24. [In Persian]
43. Pourgholam, H., Zamini, A. A., Lalouei, F., Khara, H., & Taghavi, M. J. (2011). Investigation of the genetic population structure of the bighead goby (*Neogobius gorlap*) in the Caspian Sea along the coasts of Golestan and Mazandaran provinces using microsatellite markers. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 18(4), 25-36. [In Persian]

44. Hartl, D. L., Clark, A. G., & Clark, A. G. (1997). Principles of population genetics (Vol. 116, p. 542). Sunderland, MA: Sinauer associates.
45. Piñera, J. A., Blanco, G., Vázquez, E., & Sánchez, J. A. (2007). Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology*, 151(6), 2153-2158.
46. Kinnison, M. T., Bentzen, P., Unwin, M. J., & Quinn, T. P. (2002). Reconstructing recent divergence: evaluating nonequilibrium population structure in New Zealand chinook salmon. *Molecular ecology*, 11(4), 739-754.
47. Waples, R. S. (1988). Estimation of allele frequencies at isoloci. *Gene*.
48. Ramstad, K. M., Woody, C. A., Sage, G. K., & Allendorf, F. W. (2004). Founding events influence genetic population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Lake Clark, Alaska. *Molecular ecology*, 13(2), 277-290.
49. Baer, C. F. (1998). Species-wide population structure in a southeastern US freshwater fish, *Heterandria formosa*: gene flow and biogeography. *Evolution*, 52(1), 183-193.
50. Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47(1), 264-279.
51. Thorpe, J. P. (1982). The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 139-168.