

تجزیه ارتباطی بین صفات ریخت سنجی و نشانگرهای RAPD در سیاه ماهی *Capoeta capoeta gracilis* رودخانه تجن ساری

حسین انوری فر^۱، حمید فرحمدنده^{۲*}، محمدعلی نعمت‌اللهی^۳، حسین رحمانی^۴، محمود

کرمی^۵، بیتا خلیلی^۶

۱، ۲، ۳، ۵ و ۶- کارشناس ارشد، دانشیار، استادیار، استاد و کارشناس آزمایشگاه گروه شیلات
دانشگاه تهران

۴- استادیار، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hfarahmand@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

این مطالعه با هدف معرفی روش تجزیه ارتباطی و بیان صفات ریخت سنجی‌ای که نشان دهنده بیشترین ارتباط با صفات مولکولی در سیاه ماهی رودخانه تجن ساری می‌باشد صورت گرفته است. در این راستا در مجموع ۶۶ قطعه ماهی در دو ایستگاه بالادست (۳۵ قطعه) و پایین دست (۳۱ قطعه) سد شهید رجایی در رودخانه تجن ساری، توسط دستگاه الکتروشوکر صید گردید. ۲۶ صفت ریخت سنجی پس از ثبت، استاندارد سازی شدند و پروفیل DNA این ماهی نیز توسط نشانگر RAPD ثبت گردید. از بین ۱۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی، تعداد ۶ آغازگر با الگوی نواری تکرار پذیر انتخاب شد. در مجموع ۸۹ نوار پلی مورف (نشانگر) به دست آمد که دامنه قطعات تکثیری بین bp ۱۰۰۰-۵۰۰ متفاوت بود. در این مطالعه برای اولین بار در زمینه ژنتیک آبزی پروری از روش آنالیز تجزیه ارتباطی استفاده گردید که در آن با استفاده از روش دگرسیون چندگانه (گام به گام) ارتباط بین هر کدام از صفات ریخت سنجی و ۸۹ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ۷۷ نشانگر از ۸۹ نشانگر (۸۶/۵۱) درصد نوارهای پلی مورف، رابطه معنی داری با ۱۸ صفت ریخت سنجی داشتند ($P \leq 0.05$) که از این بین ۹ صفت که دارای رابطه معنی داری در سطح بسیار بالا بودند ($P \leq 0.01$)، انتخاب گردیدند که از این صفات می‌توان در بحث‌های مربوط به تنوع، تمایز و ساختار جمعیتی این ماهی بحث برداشت.

واژه‌های کلیدی

تجزیه ارتباطی،
رودخانه تجن ساری،
سیاه ماهی،
صفت ریخت سنجی،
نشانگرهای RAPD

مقدمه

ارتباط بین ژنتیک و مورفومتریک در بسیاری از مطالعات ناشناخته است (ST.Louis and Barlow 1987; Moskaleichik 2005). میزان ارتباط بین ژنتیک- مورفومتریک می‌تواند به وسیله بررسی ارتباط یا وابستگی شاخص‌های ژنتیکی مانند هتروزیگوتی با صفت‌های ریختی (مانند اندازه یا تنوع) توضیح داده شود (Mitton 1978; King 1985; Moskaleichik 2005) و این ارتباط علاوه بر این (Naesje et al. 2004) Silva et al. (2008) از آنالیز مانتل برای تشخیص ارتباط بین ژنتیک و صفات ریخت سنجی در تمایز جمعیت‌های ماهیان استفاده نمودند.

2005). این ماهی در دریاچه‌ها تا عمق ۳۵ متری و در رودخانه‌ها در بسترها قلوه سنگی، شنی و بر روی گیاهان آبری زیست و تخم ریزی می‌نماید و در تمام طول رودخانه با جریان آب سریع و کند یافت می‌شود (Turan 2008) و یک ماهی پوتامودروموس می‌باشد (Samaee et al. 2009). رژیم غذایی سیاه ماهی گیاه‌خواری است بطوری‌که از گیاهان پست، پریفیتون‌ها و مواد پوسيده گیاهی (دترتیت) تغذیه می‌کند. از این ماهی به لحاظ دارا بودن جیره غذایی مخصوص فاقد رقابت غذایی با دیگر گونه‌های ماهیان در بسیاری از رودخانه‌ها و دریاچه می‌باشد (Mostafavi and Abdoli 2005) همچنین این گونه از لحاظ ماهی‌گیری در آب‌های داخلی، آبری پروری، صید ورزشی و مطالعات جغرافیای جانوری مهم می‌باشد (Samaee et al. 2006). به دلیل پراکنش و زیستوده بالای سیاه ماهی در آب‌های داخلی، مطالعه ویژگی‌های زیستی آن به منظور ارائه اطلاعات بنیادی و استفاده از این داده‌ها در جهت بهینه‌سازی خصوصیات تغذیه‌ای، تکثیر و پرورش برای مصارف انسانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (کوهستان اسکندری، ۱۳۸۲). از مطالعات ژنتیکی و ریخت سنجی صورت گرفته بر روی سیاه‌ماهی می‌توان Sayad-Borani and et al. (Kohestan eskandari 2001), Ghaninezhad (1998) (2008), Samaee et al. (2006), Pourali Darestani (2006) و AnvariFar et al. (2011) اشاره نمود. با وجود تمام مطالعاتی که بر روی این ماهی و یا دیگر ماهیان رودخانه‌ای صورت گرفته، ولی هیچ‌کدام از این مطالعات ارتباط بین صفات ریخت سنجی و ژنتیک نپرداخته است. با توجه به این‌که تا به حال در زمینه آبری پروری و مطالعه ساختارهای جمعیتی از روش تجزیه ارتباطی^۱ استفاده نگردیده است، این مطالعه با هدف معرفی روش تجزیه ارتباطی و بیان صفات ریخت سنجی‌ای که نشان دهنده بیشترین ارتباط با صفات ژنتیکی در سیاه‌ماهی رودخانه تجن ساری می‌باشد صورت گرفته است. در این مطالعه از نشانگر RAPD برای مطالعات ژنتیکی استفاده گردید. تکنیک تکثیر تصادفی قطعات چند شکلی (RAPD) یکی از روش‌های مولکولی مورد استفاده در تشخیص گونه‌ها، زیر گونه‌ها، جمعیت‌ها و جنس‌ها می‌باشد

Yu et al., Savolainen and Neale, Gebhardt et al. (2004) (2004) و Roy et al. (2006) از روش تجزیه ارتباطی برای بیان ارتباط بین روش مورفومنتریک و ژنتیک در گیاهان استفاده نمودند. اولین بار روش تجزیه ارتباطی برای شناسایی آلل‌ها در بیماری‌های مربوط به انسان استفاده گردید و امروزه به طور گسترده‌ای در QTLs گیاهانی مانند برنج، گندم و ذرت بکار برده می‌شود (Yao et al. 2009). با وجود این ما تا کنون مطالعه‌ای مشاهده ننمودیم که از این روش در ژنتیک جمعیت ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه از لحاظ ژنتیکی و ریخت شناسی تمایز جمعیتی سیاه ماهی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت توضیح داده خواهد شد نتایج ژنتیک تا چه حد نتایج ریخت سنجی را تائید می‌نماید. مطالعه ماهیان در اکوسیستم‌های آبی از نظر تکاملی، بوم‌شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی، بهره برداری از ذخایر و پرورش آن‌ها حائز اهمیت است (AnvariFar et al. 2011). اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبیان و توسعه آبری پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژئی گونه‌های بومی، مورد مطالعه قرار گرفته و اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد، که این امر از نظر مدیریت شیلاتی و برنامه‌ریزی‌های حفاظتی گونه‌ها حائز اهمیت است (Coad 1980). رودخانه تجن یکی از مهم‌ترین رودخانه‌های استان مازندران و حوزه دریای خزر می‌باشد که با سرچشم‌گرفتن از ارتفاعات شمال البرز و پس از عبور از شهر ساری و گذر از جلگه کاملاً هموار، وارد دریای خزر می‌شود. در روی این رودخانه سد شهید رجایی احداث شده که از لحاظ طیقه‌بندی جزو سدهای بسیار بزرگ محسوب می‌گردد (McAllister et al. 2001). سیاه ماهی، ماهی غالباً این رودخانه و حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد (Samaee et al. 2009). جنس سیاه ماهی (*Capoeta spp.*) از مرکز تا غرب آسیا پراکنده‌گی دارد که این پراکنش شامل کشورهای ترکیه، آذربایجان، افغانستان، ارمنستان، گرجستان، عراق، ایران، فلسطین *Capoeta* و ازبکستان می‌شود (Turan 2008). سیاه ماهی (*Capoeta gracilis*) از ماهیان خانواده *Cyprinidae* و بومی ایران بوده که در تمام رودخانه‌های آب شیرین حوضه جنوبی دریای خزر و دریاچه ارومیه پراکنش دارد (Mostafavi and Abdoli

^۱ Association analysis



شکل ۱- موقعیت مکان‌های نمونه‌گیری در بالا دست (۱) و پایین دست (۲) سد شهید رجایی در رود تجن (برگرفته شده از Samaee et al. 2009)

استخراج DNA- استخراج DNA با استفاده از روش کیلاکس^۳ (Estoup et al. 1996) صورت پذیرفت. در این روش نمونه‌ای با اندازه 2×2 میلی متر از بافت باله را در یک میکروتیوب $1/5$ میلی لیتری استریل انداخته و مقدار 500 میکرولیتر محلول Chelex 10 درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد مقدار 15 میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (100 U/ml) به نمونه افزوده و جهت فعال نمودن کامل آنزیم پروتئیناز K، میکروتیوب‌های حاوی نمونه به مدت یک ساعت در بن ماری شیکردار در دمای 56 درجه سانتی- گراد قرار داده شدند و پس از آن، میکروتیوب‌ها به مدت 15 دقیقه در آب با دمای 100 درجه سانتی- گراد، بر روی حرارت جوشانیده شدند. هر بار قبل از استفاده نیز میکروتیوب‌ها را پس از یک ورتکس ساده (LMS)، به مدت $15 - 10$ ثانیه با دور rpm 6000 سانترفیوژ شدند. برای تعیین کمیت و خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفوتومتر با نور UV (با استفاده از طول موج‌های 260 و 280 نانومتر) و مشاهده نوارهای DNA بر روی ژل آگارز TAE 0.8 درصد (0.32 گرم آگارز جامد در 40 سی سی بافر ۱X) و مقایسه آن با فاز لامبدا استفاده گردید (Estoup et al. 1996). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)- DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای RAPD جهت تعیین چند شکلی مورد ارزیابی قرار گرفت. این آغازگرهای PCR به سفارش شرکت سینا ژن تهیه شدند. برای تعیین شرایط بهینه PCR ابتدا DNA با مقادیر متغیر از مواد مورد استفاده و در دماهای اتصال مختلف مورد تکثیر قرار گرفتند تا بهترین شرایط انتخاب گردد. از بین 10 آغازگر، تعداد 6 آغازگر که دارای تکرارپذیری بالاتر، بهترین شرایط تکثیر و بیشترین میزان پلی مورفیسم را داشتند انتخاب گشتند (جدول ۲).

³ Chelex protocol

.(Welsh and McClelland 1990; Williams et al. 1990) RAPD توان بالقوه‌ای برای شناسایی پلی مورفیسم‌ها داشته و دارای مزایای نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشد و نیز وراثت مندلی به شکل غالب^۱ دارد که به صورت حضور یا عدم حضور امتیاز دھی می‌شود (Liu and Cordes 2004). از معایب این نشانگر می‌توان مشکل بودن در توضیح وراثت مندلی لوکاس‌ها و ناتوانی در تشخیص بین هتروزیگوت و هموزیگوت غالب، حضور پارالوگوس^۲ محصول PCR و تکرارپذیری ضعیف باند اشاره نمود (Welsh & McClenlland 1990).

مواد و روش‌ها

این مطالعه در رودخانه تجن ساری که سد مخزنی شهید رجایی بر روی آن احداث گردیده، صورت گرفته است. در این بررسی دو ایستگاه یکی در بالادست سد و دیگری در پایین دست سد شهید رجایی انتخاب گردید که هر دو ایستگاه در مسیر اصلی رودخانه تجن قرار دارند. ایستگاه بالادست سد دارای موقعیت جغرافیایی $24^{\circ}41' 11''$ شمالی و $36^{\circ} 22/13''$ شرقی و ایستگاه پایین دست سد (بعد از سد) $15^{\circ}36' 16''$ شمالی و $51^{\circ}44' 12''$ شرقی می‌باشد (شکل ۱). نمونه برداری از ماهیان با استفاده از دستگاه الکتروشوکر با قدرت یک W و ولتاژ $200 - 300$ صورت پذیرفت. جهت مطالعات ریخت سنجی، ماهیان صید شده در فرمالین 10 درصد تثیت شدند و برای مطالعات بعدی به آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل یافتند. جهت مطالعات مولکولی باله‌های سینه‌ای و شکمی انتقال یافتند. جهت مطالعات مولکولی از صید جدا شده و در الکل 96 درصد اتانول فیکس شده و پس از 24 و 48 ساعت الکل آن‌ها تعویض گردیدند (AnvariFar et al. 2011). در مجموع تعداد 66 نمونه ماهی زیست‌سنجی کامل گردیدند که از این تعداد 35 نمونه ماهی مربوط به ایستگاه بالادست (ایستگاه اول) و 31 نمونه ماهی مربوط به ایستگاه دوم بودند. به منظور زیست‌سنجی ماهیان از کولیس دیجیتالی با دقت یک هزار میلی متر استفاده گردید.

¹ Dominant

² Paralogous

M_1 : مقادیر استاندارد شده صفات، M_0 : طول صفات مشاهده شده، L : میانگین طول استاندارد برای کل نمونه و برای همه مناطق، L_0 : طول استاندارد هر نمونه، b : ضریب رگرسیونی بین $\log M_0$ و $\log L_0$ برای هر منطقه سپس کارآیی داده‌های اصلاح شده از طریق آزمون معنی‌دار بودن همبستگی بین متغیر اصلاح شده و طول استاندارد مورد سنجش قرار گرفت. معنی‌دار نبودن این همبستگی نشان دهنده حذف کامل اثر اختلاف اندازه از داده‌ها می‌باشد (Turan 1999). برای یکنواختی واریانس و توزیع نرمال داده‌ها، به ترتیب از آزمون‌های تک متغیره لون^۵ و آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده گردید. میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات چندمتغیره^۶ کلیه صفات ریخت‌سنجی در هر منطقه محاسبه شدند. برای تجزیه داده‌های ریخت‌سنجی ابتدا باندها امتیاز دهی گردیدند. در صورت تکثیر وجود باند کد یک و در صورت عدم وجود باند کد صفر در نرم افزار Excel (Ver. 2003) وارد گردیده و سپس تجزیه رگرسیونی کلیه صفات ریخت‌سنجی در دو ایستگاه مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS (Ver. 11) با روش رگرسیون چند گانه (گام به گام) انجام شد. بدین صورت که در هر بار انجام تجزیه یکی از صفات ریخت‌سنجی به عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها به عنوان متغیر مستقل (X) در تجزیه وارد شدند. با استفاده از این روش می‌توان بیان نمود چه تعداد نشانگر کدکننده صفت ریخت‌سنجی مورد نظر می‌باشند و این تعداد نشانگر چند درصد تغییرات ریخت‌سنجی را توجیه می‌کنند علاوه بر این می‌توان بیان نمود که کدام نشانگر (یا ستون پلی مورف) یا چه طولی و از کدام آغازگر، بیشترین تغییر را ایجاد می‌نمایند.

نتایج و بحث

میانگین، انحراف معیار، حداقل و حدکثر برای ۲۶ صفت ریخت‌سنجی در بالادست و پایین‌دست سد شهید رجایی در رودخانه تجن در جدول یک آورده شده است. همواره میزان ضریب تغییرات کلی کمتر از ۲۵ درصد بوده است. در تست t ، آزمون لون نشان داد که تمامی صفات ریخت‌سنجی به غیر از عرض سر

⁵ Leven test for Equality of Variances

⁶ The multivariate generalization of the coefficient

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X (۱۰ mM Tris-HCl, pH 8.4)، ۲/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase میکرومول مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP)، ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و آب به مقدار متغیر (۱۴-۱۲) انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۷ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی اولیه^۱)، ۴۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، یک دقیقه در ۳۸ درجه سانتی‌گراد (الحق)^۲، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط^۳) و مرحله پایانی با ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط نهایی) انجام شد. الکتروفورز- پس از اتمام کار PCR محصولات حاصل بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (حاوی اتیدیوم بروماید) الکتروفورز شدند. برای مشاهده حرکت DNA بر روی ژل، Loading buffer Dye با غلظت ۶X به میزان ۱ µl به همراه هر محصول PCR به درون چاهک‌های سینی الکتروفورز تزریق شدند. در نهایت محصولات ایجاد شده با استفاده از دستگاه UVITEC مشاهده شده و با دستگاه مستند سازی ژل^۴ تصویر برداری شدند.

تجزیه داده‌های ریخت‌سنجی و ژنتیکی- برای تعیین ارتباط بین صفات ریخت‌سنجی و نتایج ژنتیکی از ۲۶ صفت ریخت‌سنجی استفاده شد. از آنجا که ویژگی‌های ریخت‌سنجی برخلاف ویژگی‌های شمارشی در سرتاسر دوران زندگی ثابت نمی‌باشد و به طور پیوسته‌ای با افزایش اندازه بدن ماهی تغییر می‌کند (Poulet et al. 2004) بنابراین باید اثر اندازه بدن را حذف نمود زیرا اختلاف بین گروه‌ها می‌بایست ناشی از اختلاف در شکل بدن باشد نه اختلاف در اندازه نسبی آن‌ها (Turan 1999). به منظور حذف اثر اندازه، داده‌های مورفومتریک قبل از تجزیه و تحلیل به کمک فرمول الیوت استاندارد شدند (Elliott et al. 1995). استاندارد کردن داده‌های مورفومتریک تغییرات ناشی از رشد آلومتریک را کاهش خواهد داد (Karakousis et al. 1999).

$$M_{(t)} = M_{(0)} \left(L / L_{(0)} \right)^b$$

¹ Denaturation

² Annealing

³ Extention

⁴ Gel documentation

تجزیه ارتباطی بین صفات ریخت سنجی و نشانگرهای RAPD در...

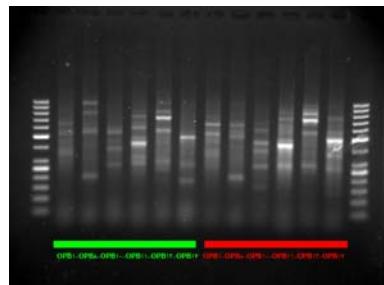
جدول ۱- میانگین، انحراف معیار، حداقل و حداقلتر صفات ریخت سنجی (بر حسب میلی متر) سیاه ماهی *C. c. gracilis* در رودخانه تجن

پایین دست سد (ایستگاه دوم)	بالا دست سد (ایستگاه اول)	منطقه مورد مطالعه	صفات مورد بررسی
انحراف معیار \pm	انحراف معیار \pm	میانگین	میانگین
۱۰۵/۴۹۲ \pm ۰/۹۴۵	۹۷/۲۶۵ \pm ۱۵/۹۰۵	طول استاندارد	
۲۶/۸۹۱ \pm ۱/۵۱۴	۲۳/۹۶۵ \pm ۱/۶۱۲	ارتفاع بدن	
۲۰/۲۴۰ \pm ۱/۲۵۵	۱۳/۷۴ \pm ۴/۷۴۷	طول ساقه دمی	
۱۱/۶۸۰ \pm ۰/۶۷۴	۱۱/۲۵۶ \pm ۰/۷۹۶	ارتفاع ساقه دمی	
۲۳/۹۰۴ \pm ۰/۷۶۶	۲۳/۶۱۱ \pm ۰/۸۶۸	طول سر	
۱۶/۳۳۴ \pm ۰/۹۹۸	۱۶/۴۴۵ \pm ۲/۹۷۶	عرض سر	
۱۷/۹۲۱ \pm ۰/۷۶۷	۱۷/۴۸۴ \pm ۰/۸۷۵	ارتفاع سر	
۸/۷۱۱ \pm ۰/۷۶۶	۸/۷۷۸ \pm ۰/۷۰۳	طول پوزه	
۴/۶۵۱ \pm ۰/۳۴۲	۴/۴۲۵ \pm ۰/۳۱۷	قطر چشم	
۱۱/۹۷۷ \pm ۰/۴۸۲	۱۱/۵۸۳ \pm ۰/۸۴۴	فاصله پشت چشم تا انتهای سریوش آیشش	
۹/۹۳۷ \pm ۰/۵۴۴	۹/۶۶۳ \pm ۰/۵۶۱	فاصله بین دو حدقه چشم	
۷/۲۹۶ \pm ۰/۵۹۱	۷/۴۴۲ \pm ۰/۶۰۹	طول فک بالایی	
۶/۶۶۰ \pm ۰/۵۹۲	۷/۱۷۰ \pm ۰/۷۲۸	طول فک پائینی	
۵۱/۵۴۲ \pm ۱/۱۸۷	۵۰/۰۱۴ \pm ۱/۷۸۴	فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه	
۶۱/۱۲۲ \pm ۰/۷۶۹	۵۹/۹۴ \pm ۱/۷۸۷	فاصله انتهای باله پشتی تا انتهای باله دمی	
۷۷/۳۲۵ \pm ۴/۶۴۲	۷۵/۷۷۲ \pm ۳/۱۶۸	فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله مخرجی	
۴۰/۴۷۴ \pm ۲/۴۳۶	۳۹/۸۷۷ \pm ۳/۳۸۵	فاصله انتهای باله مخرجی تا انتهای باله دمی	
۲۱/۹۰۶ \pm ۱/۲۶۰	۲۰/۴۰۵ \pm ۱/۱۸۸	طول باله پشتی	
۱۷/۶۶۴ \pm ۲/۴۱۴	۱۲/۸۵۲ \pm ۲/۳۰۴	ارتفاع باله پشتی	
۱۵/۷۸۰ \pm ۱/۱۵۱	۱۴/۲۰۰ \pm ۰/۹۶۲	پایه باله پشتی	
۱۸/۰۱۱ \pm ۱/۳۶۷	۱۸/۰۲۴ \pm ۱/۸۶۸	طول باله مخرجی	
۱۲/۲۹۷ \pm ۱/۷۷۹	۹/۶۲۰ \pm ۲/۱۱۷	ارتفاع باله مخرجی	
۸/۳۵۱ \pm ۰/۸۸۹	۸/۴۲۶ \pm ۱/۰۵۴	پایه باله مخرجی	
۱۷/۳۳۵ \pm ۰/۹۱۳	۱۵/۹۴۹ \pm ۱/۰۸۶	طول باله شکمی	
۲۰/۰۵۷ \pm ۱/۱۰۴	۱۹/۳۱۹ \pm ۱/۱۸۲	طول باله سینه‌ای	
۱۲/۳۰۰ \pm ۲/۶۸۲	۱۳/۲۵۷ \pm ۲/۰۸۴	فاصله بین بالهای شکمی و سینه‌ای	
۱۴/۰۸۰۴۴	۱۳/۲۷۰۸۴	ضریب تغییرات (C.V.)	

جدول ۲- توالی و نوع آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA ژنومی در PCR

تعداد نشانگرهای پایی مورف (تعداد سوتون‌های پلی مورف)	درصد GC	توالی نوکلئوتیدها	نام آغازگر	
۱۶	۶۰	۵'-GTTTCGCTCC-3'	OPB1	۱
۱۵	۷۰	۵'-GTCCACACGG-3'	OPB8	۲
۱۴	۷۰	۵'-CTGCTGGGAC-3'	OPB10	۳
۱۵	۶۰	۵'-GTAGACCCGT-3'	OPB11	۴
۱۴	۶۰	۵'-CCTTGACGCA-3'	OPB12	۵
۱۵	۶۰	۵'-AGGGAACGAG-3'	OPB17	۶
۸۹	-	-	جمع	

دارای واریانس یکنواخت می باشدند ($P \leq 0/05$). DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای RAPD جهت تعیین چند شکلی مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع ۶ آغازگر مورد استفاده، ۸۹ باند چند شکل یا نشانگر بدست آمد (جدول ۲). توالی آغازگر-های مورد استفاده به همراه تعداد نشانگرهای پلی مورف بدست آمده از هر آغازگر در جدول ۲ آمده است. شکل ۲ نمونه از الگوی باندینگ ۶ آغازگر را در دو نمونه ماهی که یکی مربوط به ایستگاه بالادست و دیگری مربوط به ایستگاه پایین دست می باشد را نشان می دهد. به منظور برقراری ارتباط بین نتایج ریخت سنجی و نتایج زنتیکی از تجزیه تجزیه ارتباطی استفاده گردید. جدول ۳ و ۴ تجزیه داده‌های ریخت سنجی و مولکولی را با استفاده از روش رگرسیون گیری گام به گام نشان می دهد. در این جدول به عنوان مثال در مورد صفت ارتفاع باله پشتی (۲۹ نشانگر از ۸۹ نشانگر)، کد کننده صفت مورد نظر بود که نشانگر RAPD آن‌ها را تکثیر کرده است که این تعداد نشانگر (۲۹ نشانگر) حدود ۳۱ درصد تغییرات صفت مورد نظر را توجیه می کند. در جدول ۳ بیشترین تعداد نشانگر برای صفت ارتفاع باله پشتی (۲۹ نشانگر) و کمترین مربوط به ارتفاع بدن (۷ نشانگر) می باشد و همچنین بیشترین R^2 کل مربوط به طول استاندارد و کمترین مربوط به قطر چشم می باشد. این تجزیه نشان می دهد که ۷۷ نشانگر از ۸۹ نشانگر (۸۶/۵۱) درصد نوارهای پلی مورف، رابطه معنی داری با ۱۸ صفت ریخت سنجی داشتند که از این بین ۹ نشانگر صفات بیشتری را کد می نمایند که بدین شرح می باشد.



شکل ۲- نمونه از الگوی باندینگ ۶ آغازگر در جمعیت‌های سیاه ماهی *C. c. gracilis* در ایستگاه‌های بالادست (سمت راست) و پایین دست سد (سمت چپ) شهید رجایی در رودخانه تجن ساری (۰/۱۵ درصد آغازگر)

ریخت سنجه قرار دارند و به همین دلیل تغییرات بیشتری را از صفات ریخت سنجه مورد بررسی نشان می‌دهند و نقش بیشتری در برقراری ارتباط بین نتایج دارند. همچنین می‌توان بیان نمود توالی آغازگرهای B10 و B11 در فرایندهای تکاملی سیاه‌ماهی بیشتر جا به جا شده‌اند و کپی‌های بیشتری از خود را در داخل ژنوم ایجاد کرده‌اند زیرا چند شکلی و میزان باندهای بیشتری تولید کرداند (که حاصل جا به جایی بیشتر در ژنوم می‌باشد). در این بررسی به علت عدم وجود اطلاعات کافی از توالی اولیه DNA سیاه‌ماهی، از نشانگر RAPD استفاده گردید. محققان بسیاری عنوان نمودند تکنیک RAPD بیش از سایر تکنیک‌ها می‌تواند جمعیت‌های ماهی را به زیر گونه، نژاد و حتی جمعیت‌های مشابه ماهی تمایز کند (Mamuris et al. 1998). Bardakci and Skibinski (1994) بیان نمودند تکنیک RAPD بسیار حساس‌تر از تجزیه‌های دیگر مرتبط با mtDNA در مطالعات درون جمعیتی ماهیان می‌باشد. به طور کل ویژگی‌های ریخت سنجه شناسی ماهیان در مقایسه با سایر مهره داران بیشتر دچار تغییرات درون و بین گونه‌ای شده و نسبت به تغییرات ناشی از محیط حساسیت بیشتری دارند بنابراین اثرات بعضی از فاکتورهای محیطی نظیر درجه حرارت، شوری، دسترسی به غذا و یا فاصله مهاجرت می‌تواند به طور بالقوه تفکیک ریختی ماهیان را تعیین کند (Turan et al. 2008). در گذشته تصور می‌شد که تغییرات ریختی صرفاً ژنتیکی است. اما امروزه مشخص شده که منشأ این تغییرات هم محیطی و هم ژنتیکی است (Akbarzadeh et al. 2007).

پژوهش‌های اخیر مشخص کرده است که اختلافات ریخت شناسی بین گروه‌های مختلف ماهیان الزاماً آنها را از لحاظ ژنتیکی جدا نمی‌کند و در عوض در پاره‌ای از موارد تفاوت‌های ریخت شناسی صرفاً ناشی از محیط بوده و اختلافات ژنتیکی هیچ نقشی در آن ندارد (Swain and Foote 1999).

عامل اصلی تغییرات ریختی به اثبات رسیده است (Tudela 1999). در این مطالعه بر ویژگی‌های ریخت‌سنجه و ژنتیکی سیاه ماهی تمرکز شده است و با استخراج نشانگرهای مربوط به ۲۶ صفت ریخت‌سنجه فوق، این نتیجه حاصل می‌گردد که ۷۷ نشانگر از ۸۹ نشانگر RAPD (۸۶/۵۱) درصد نشانگرها را رابطه

صفت	تعداد نشانگر (T)	R ² (%)max [*]	R ² (%)T [*]
ارتفاع باله پشتی	۲۹	۳۱/۱	۹۳/۸
ارتفاع باله مخرجی	۲۱	۱۵/۹	۷۲/۱
طول استاندارد	۲۰	۲۹/۶	۹۴/۳
پایه باله پشتی	۱۴	۱۸/۵	۷۱/۹
قطر چشم	۱۱	۱۳/۵	۵۴/۱
ارتفاع ساقه دمی	۱۱	۱۱/۰	۵۷/۶
طول باله مخرجی	۱۱	۸/۹	۵۱/۹
عرض سر	۱۰	۶/۵	۴۷/۶
ارتفاع بدن	۷	۲۸/۵	۵۹/۹
طول ساقه دمی	۶	۲۰/۱	۵۵/۹
طول پوزه	۵	۹/۹	۳۸/۳
طول باله شکمی	۴	۲۲/۲	۳۷/۹
طول باله سینه ای	۴	۱۷/۷	۴۰/۳
فاصله پشت چشم تا انتهای سریوش	۴	۱۲/۷	۳۶/۷
ارتفاع سر	۳	۱۰/۷	۲۶/۸
فاصله بین دو حدقه چشم	۳	۹/۴	۲۴/۵
فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه	۳	۱۴/۲	۲۶/۹
فاصله انتهای باله پشتی تا انتهای باله دمی	۳	۱۰/۷	۲۱/۱
طول باله پشتی	۳	۱۲/۸	۲۶
پایه باله مخرجی	۳	۶/۱	۱۷/۳
فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک ای	۳	۱۱/۱	۲۲/۷
فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله مخرجی	۲	۶/۲	۱۱/۵
صول سر	۲	۹/۳	۱۴/۴
طول فک پایینی	۱	۱۳/۵	۱۳/۵
فاصله انتهای باله مخرجی تا انتهای باله دمی	۱	۸/۰۲	۸/۰۲
طول فک بالایی	.	.	.

: تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات ریخت سنجه، R^2 adjusted T^{}: مجموع کل R^2 تعديل شده نشانگرهای آگاهی بخش برای کل صفات ریخت سنجه، R^2 adjusted max^{*}: بیشترین R^2 تعديل شده مربوط به یک نشانگر برای صفات ریخت شناسی

نشانگر ۳۷ با طول ۳۵۰ bp مربوط به آغازگر B10 دارای بیشترین R^2 (۳۱/۱) و (۲۸/۵) برای صفات ارتفاع باله پشتی و ارتفاع بدن، نشانگر ۱۷ با طول ۱۰۰ bp مربوط به آغازگر B8 دارای بیشترین R^2 برای صفت ارتفاع باله مخرجی، نشانگر ۴۶ با طول ۱۰۰ bp مربوط به آغازگر B11 دارای بیشترین R^2 (۲۹/۶ و ۱۳) برای صفات طول استاندارد و ارتفاع ساقه دمی، نشانگر ۸ با طول ۸۰ bp مربوط به آغازگر B1 دارای بیشترین R^2 (۱۸/۵) برای صفت پایه باله پشتی، نشانگر ۳۷ با طول ۴۰۰ bp مربوط به آغازگر B10 دارای بیشترین R^2 با توجه به این نتایج می‌توان گفت آغازگرهای B10 و B11 بیشتر از سایر آغازگرها در نواحی کد کننده صفات

جدول ۴- جزئیات تجزیه واریانس رگرسیون گام به گام ۸۹ باند چند شکل RAPD و ۹ صفت ریخت شناسی

RAPDcom	df	RAPDmax	df	منبع واریانس X (رگرسیون) (خطا) Y	میانگین مربعات		صفت
					ارتفاع باله پشتی	ارتفاع باله مخرجی	
۲۸/۳۱***	۲۵	۲۳۶/۹۱***	۱	X			ارتفاع باله پشتی
۰/۷۰۳	۴۰	۷/۸۰	۶۴	Y			ارتفاع باله مخرجی
۲۱/۸۲***	۱۳	۶۲/۶۵۱***	۱	X			ارتفاع باله مخرجی
۱/۵۶	۵۲	۴/۷۳۰	۶۴	Y			ارتفاع باله مخرجی
۶۹/۱۲***	۱۲	۲۷۲۸/۰۴***	۱	X			طول استاندارد
۱۴/۵۲	۲۲	۱۷۷/۹۶	۳۳	Y			طول استاندارد
۷/۲۱***	۱۲	۲۲/۲۰***	۱	X			پایه باله پشتی
۰/۴۸۶	۵۳	۱/۴۰	۶۴	Y			پایه باله پشتی
۰/۵۲۴***	۹	۱/۱۵***	۱	X			قطر چشم
.	۵۶	۰/۱۰۴	۶۴	Y			قطر چشم
۲/۶۹***	۹	۵/۴۸**	۱	X			ارتفاع ساقه دمی
۰/۲۴۹	۵۶	۰/۵۱۱	۶۴	Y			ارتفاع ساقه دمی
۱۱/۳۷***	۹	۱۸/۰۲°	۱	X			طول باله مخرجی
۱/۲۹	۵۶	۲/۴۵	۶۴	Y			طول باله مخرجی
۱۸/۴۵***	۱۰	۲۶/۲۱**	۱	X			عرض سر
۲/۶۶	۵۵	۴/۷۶	۶۴	Y			عرض سر
۲۷/۳۱***	۷	۸۸/۲۳***	۱	X			ارتفاع بدن
۱/۸۳	۵۸	۳/۲۷	۶۴	Y			ارتفاع بدن
۱۳۸/۱۲***	۶	۲۹/۵۷***	۱	X			طول ساقه دمی
۹/۳۹	۵۹	۱۷	۶۴	Y			طول ساقه دمی
۲/۹۷***	۵	۳/۱۸°	۱	X			طول پوزه
۰/۳۲۸	۶۰	۰/۴۷۹	۶۴	Y			طول پوزه
۱۰/۰۸***	۴	۲۳/۵۶***	۱	X			طول باله شکمی
۰/۹۲۵	۶۱	۱/۱۴	۶۴	Y			طول باله شکمی
۱۲/۴۷***	۴	۲۱/۶۹***	۱	X			طول باله سینه ای
۱/۰۴	۶۱	۱/۴۳	۶۴	Y			طول باله سینه ای
۲/۳۱***	۴	۴/۵۸**	۱	X			فاصله پشت چشم تا انتهای سریوش
۰/۳۱۸	۶۱	۰/۴۳۸	۶۴	Y			فاصله پشت چشم تا انتهای سریوش
۴/۷۲***	۳	۵/۶۸**	۱	X			ارتفاع سر
۰/۵۲۸	۶۲	۰/۶۴۴	۶۴	Y			فاصله بین دو حدقه چشم
۱/۹۴***	۳	۲/۲۵°	۱	X			فاصله بین دو حدقه چشم
۰/۲۴۲	۶۲	۰/۲۹۱	۶۴	Y			فاصله بین دو حدقه چشم
۲۵/۵۳***	۳	۳۸/۹۹***	۱	X			فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه
۲/۸۲	۶۲	۳/۳۱	۶۴	Y			فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه
۱۴/۸۲***	۳	۶۱/۲۳**	۱	X			فاصله ابتدای باله پشتی تا انتهای باله دمی
۶/۱۵	۶۲	۶/۹۶	۶۴	Y			فاصله ابتدای باله پشتی تا انتهای باله دمی
۲۰/۲۱***	۳	۲۹/۰۷**	۱	X			فاصله ابتدای باله پشتی تا انتهای باله دمی
۲/۳۴	۶۲	۲/۷۶	۶۴	Y			فاصله ابتدای باله پشتی تا انتهای باله دمی
۴/۳۳**	۳	۴/۶۶**	۱	X			پایه باله مخرجی
۰/۷۸۴	۶۲	۰/۱۸۹۰	۶۴	Y			پایه باله مخرجی
۳۳/۱۴***	۳	۴۷/۲۹**	۱	X			فاصله بین باله های شکمی و سینه ای
۴/۵۰	۶۲	۵/۱۷	۶۴	Y			فاصله بین باله های شکمی و سینه ای
۷۳/۱۶*	۲	۷۸/۲۳**	۱	X			فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله مخرجی
۱۴/۰۲	۶۳	۱۴/۸۷	۶۴	Y			فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله مخرجی
۳/۸۰**	۲	۴/۷۶°	۱	X			صول سر
۰/۵۸۸	۶۳	۰/۶۲۲۳	۶۴	Y			صول سر
۴/۸۷***	۱	۴/۱۸۷***	۱	X			طول فک پایینی
۰/۴۳۷	۶۴	۰/۴۳۷	۶۴	Y			طول فک پایینی
۵۴/۹۹***	۱	۵۴/۹۹***	۱	X			فاصله انتهای باله مخرجی تا انتهای باله
۸/۱	۶۴	۸/۱	۶۴	Y			دمی
-	-	-	-	X			طول فک بالایی
				Y			

*** خیلی معنی دار ($p \leq 0.01$), ** معنی دار ($p \leq 0.05$) و * معنی دار ($p \leq 0.10$)

Mianeghin Marbebat RAPDmax: میانگین مربعات مربوط به یک نشانگر (ستون پایی مورف)، RAPDcom: میانگین مربعات همه نشانگرها (ستون های پلی مورف)

های RAPD بیشتر کد کننده صفاتی نظیر ارتفاع باله پشتی، ارتفاع باله مخرجی، طول استاندارد، پایه باله پشتی، قطر چشم، ارتفاع ساقه دمی، طول باله مخرجی و عرض سر در جمعیت‌های سیاه-ماهی *C. C. gracilis* می‌باشند و این صفات به عنوان صفاتی که بیشترین ارتباط را با نشانگرهای پلی مورف دارند معروف می‌گردند که این ۹ صفت با ۶۹ نشانگر از RAPD (77 درصد نشانگرها) رابطه معنی‌داری داشتند. همچنین باند‌هایی با طول bp ۵۰۰ – ۱۰۰ به عنوان باند‌هایی که بیشترین نقش را در برقراری ارتباط با این صفات دارند، معروف می‌گردد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سیاه‌ماهی در رودخانه‌های مختلف از یکدیگر به دلیل جدایی جغرافیایی جدا شده‌اند (Samaee et al. 2006; Bianco and Banarescu 1982) که این مطالعات یا جنبه ریخت سنجی داشته و یا جنبه ژنتیکی، در نتیجه مطالعه‌ای که هر دو جنبه و اثر متقابل آن‌ها را تحت پوشش قرار دهد وجود ندارد. اطلاعات حاصل از این مطالعه علاوه بر فراهم نمودن اطلاعات پایه زیست‌شناسی و تمایز جمعیتی سیاه‌ماهی، می‌تواند زمینه ساز مطالعات بیشتر در زمینه مطالعات جمعیتی آبزیان مانند بررسی تنوع ریخت سنجی و ژنتیکی، بررسی تمایز میان جمعیت‌ها و بررسی ساختار جمعیتی باشد. در نهایت اگرچه RAPD یک نشانگر غالب می‌باشد ولی با این وجود نمی‌تواند هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص دهد در نتیجه انجام مطالعات بیشتر با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و ریز ماهواره می‌تواند داشش ما را از ساختار جمعیتی سیاه‌ماهی بپسورد بخشد.

منابع

- Akbarzadeh A, Karami M, Nezami SA, Igdari S, Bakhtiyari M, Khara H (2007) Analysis of Population Structure of Pikeperch (*Sander lucioperca*), in Iranian Waters of Caspian Sea and Anzali wetland using Truss System. Iranian journal Natural Resource 60– 127–139. [In Farsi].
- AnvariFar H, Khyabani AR, Farahmand H, Vatandoust S, AnvariFar H, Jahageerdar S (2011) Detection of Morphometric Differentiation between Isolated up- and downstream Populations of Siah Mahi (*Capoeta capoeta gracilis*) (Pisces: Cyprinidae) in the Tajan River (Iran). Hydrobiologia 673: 41–52.
- Bardakci F, Skibinski DOF (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity 73: 117–123.

معنی‌داری حداقل با یکی از صفات ریخت‌سنجدی جدول ۵ دارند (P≤۰/۰۵) که از آن‌ها می‌توان در تمایز جمعیت‌ها و مطالعات جمعیتی بهره برد. سطوح بالای تغییرات درون جمعیتی به وسیله ضریب تغییرات کلی بیان شد که می‌تواند تحت تاثیر سه فاکتور رشد آلومتریک، وجود بیش از یک جمعیت در منطقه و یا حضور گروه‌های فنتیپی مختلف در یک منطقه باشد (Karakousis et al. 1991) با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان بیان نمود که تفاوت‌های محیطی سبب تفاوت‌های ژنتیکی و در نهایت تفاوت‌های ریخت سنجی گردیده است. بین ضریب تغییرات و وراثت‌پذیری صفات ریخت‌شناسی رابطه عکس وجود دارد. هر چه میزان ضریب تغییرات بیشتر باشد وراثت‌پذیری کاهش یافته و سهم تغییرات محیطی در تغییر پذیری صفات ریخت‌شناسی بیشتر می‌شود (Mamuris et al. 1998). توضیح دادن علل به وجود آمدن تفاوت‌های ریختی میان جمعیت‌ها بسیار دشوار است. به طور کل ویژگی‌های ریختی تحت کنترل و در هم کنش دو عامل شرایط محیطی و ژنتیکی می‌باشند (Swain and Foote 1999; Poulet 2004; Pinheiro et al. 2005). ویژگی‌های محیطی در خلال دوران اولیه تکامل ماهی غالب بوده و افراد نسبت به شرایط محیطی حساسیت بیشتری دارند. معمولاً ماهیانی که در دوران اولیه زندگی دارای شرایط محیطی مشابهی هستند از لحاظ ریختی وضعیت مشابهی دارند (Pinheiro et al. 2005) از سوی دیگر هنگامی که ماهی در اوضاع محیطی جدیدی قرار گیرد، این امکان وجود دارد که تغییرات ریخت‌شناسی سریعاً در آن رخ دهد (Poulet 2004).

- Coad BW (1980) Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological conservation 10: 51–80.
- Elliott NG, Haskard K, Koslow JA (1995) Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of Southern Australia. Journal of Fish Biology 46: 202–220.
- Estoup A, Largiader CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Molecular Marine Biology and Biotechnology 5: 295–298.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, Schüler K (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative

- variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13: 93–102.
- Karakousis Y, Triantaphyllidis C, Economidis PS (1991) Morphological variability among seven population of brown trout, *Salmo trutta* L., in Greece. *J. of fish Bio.* 38: 807–817.
- King DPF (1985) Enzyme heterozygosity associated with anatomical character variance and growth in the herring (*Clupea harengus* L.). *Heredity* 54: 289–296.
- Kohestan eskandari S (2001) Population dynamic of *Capoeta capoeta gracilis* in Madar-so stream. *Iranian journal of sea scienc* 2: 11–20. [in Farsi].
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1–37.
- Mamuris Z, Apostolidis AP, Panagiotaki P, Theodorou AJ, Triantaphyllidis C (1998) Morphological variation between red mullet populations in Greece. *Journal of Fish Biology* 52: 107–117.
- McAllister DE, Craig JF, Davidson N, Delany S, Seddon M (2001) Biodiversity Impacts of Large Dams. Background Paper Nr. 1, Prepared for IUCN / UNEP / WCD, 47 pp.
- Mitton JB (1978) Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. *Nature* 273: 661–662.
- Moskaleichik FF (2005) The Relationship between Allozyme and Morphometric Variations of Hunchback Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) from Southern Sakhalin. *Doklady Biological Sciences* 402: 197–201.
- Mostafavi H and Abdoli A (2005) A Preliminary Survey on Diet of Capoeta capoeta gracilis in Talar and Yasalegh Rivers from the Southern Basin of Caspian Sea. *Environmental science* 7: 53–62. [in Farsi].
- Naesje TF, Vuorinen JA, Sandlund OT (2004) Genetic and morphometric differentiation among sympatric spawning stocks of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Femund, Norway. *J. Limnology* 63: 233–243.
- Neale, DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends Plant Science* 9: 325–330.
- Pinheiro A, Teixeira CM, Rego AL, Marques JF, Cabral HN (2005) Genetic and morphological variation of *Solea lascaris* (Risso, 1810) along the Portugese coast. *Fisheries Research*. 73: 67–78.
- Poulet N, Berrebi P, Crivelli AJ, Lek, S and Argillier C (2004) Genetic and morphometric variation in the pikeperch (*Sander lucioperca*) of a fragmented delta. *Arch. Hydrobiol* 159: 531–554.
- Pourali Darestan S, Bazyar Lakeh A, Hasanzadeh- Kiabi B (2006) A karyological study of *Barbus capita* and *mursa* and two population of *Capoeta capoeta* from northern Iran. *Iranian journal Natural Resource* 58: 831–842. [in Farsi].
- Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS and Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* 90: 683–689.
- Samaee SMR, Mojazi-Amiri B, Hosseini-Mazinani SM (2006) Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. *Folia Zool.* 55: 323–335.
- Samaee M, Patzner RA, Mansour N (2009) Morphological differentiation within the population of Siah Mahi, *Capoeta capoeta gracilis*, (Cyprinidae, Teleostei) in a river of the south Caspian Sea basin: a pilot study. *J. Appl. Ichthyol.* 25: 583–590.
- Sayad-Borani M, Ghaninezhad D (1998) Stock assessment of *Capoeta capoeta* in Makodam lake. *Iranian journal of fisheries* 13: 115–128. [in Farsi].
- Silva DM, Cruz AD, Bastos RP, Telles MPC, Diniz-Filho JAF (2008) Morphometric and genetic differentiation among populations of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leptopelidae) from central Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre 98: 493–500.
- St. Louis VI, Barlow AC (1987) Comparisons between morphometric and genetic differentiation among populations of the Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*). *Wilson bull.* 99: 628–641.
- Swain DP, Foote CJ (1999) Stocks and chameleons: The use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research* 43: 113–128.
- Tudela S (1999) Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research* 42: 229–243.
- Turan C (1999) A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: The truss system. *Tr. J. Of Zoology* 23: 259–263.
- Turan C (2008) Molecular systematics of the *Capoeta* (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16s rDNA sequence data. *Acta zoologica* 51: 1–14.
- Welsh J, McClenland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213–7218.
- Williams JGK, Kuvelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- Yao J, Wang L, Liu L, Zhao C, Zheng Y (2009) Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetica* 137: 67–75.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley J, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38: 203–208.