

مقایسه ساختار ژنتیکی سه جمعیت ماهی خیاطه *Alburnoides bipunctatus* استان گلستان با نشانگر ریزماهواره (Bloch 1782)

Analysis of the population genetics of three Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) populations in Golestan Province using microsatellite marker

لادن جهانگیری^{*}، علی شعبانی^۱، حمیدرضا رضایی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Jahangiri L^{*1}, Shabany A¹, Rezaei HR¹

1. MSc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ladan_Jahangiri@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

چکیده

ماهی خیاطه (*Alburnoides bipunctatus*) گونه‌ای رودخانه‌ای است که در حوزه جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتاً خوبی برخوردار می‌باشد اما در بسیاری از آبهای اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد. تا کنون هیچ گونه مطالعه‌ای در زمینه تنوع ژنتیکی این گونه صورت نگرفته است. در این تحقیق، برای بررسی ساختار جمعیتی ماهی خیاطه در رودخانه‌های تیل آباد، شیرآباد و کبودوال استان گلستان تعداد ۸۴ نمونه (۲۸ نمونه از رودخانه تیل آباد، ۲۸ نمونه از رودخانه شیرآباد، شیرآباد و کبودوال) جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی شد. متوسط ناخالصی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۹۳ و ۰/۸۱۷ به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۸ درصد) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. متوسط آماره $F_{ST} = 0/024$ به دست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین رودخانه‌های مورد بررسی است. در بررسی انحراف از تعادل هارדי-واینرگ در سطح جایگاه‌ها، دو جایگاه در جمعیت تیل آباد و دو جایگاه در جمعیت کبودوال در تعادل بوده و سایر جایگاه‌ها از تعادل هارדי-واینرگ انحراف معنی‌داری داشتند ($P \leq 0/05$). طبق دندروگرام UPGMA ترسیم شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی، جمعیت‌های رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد از هم جدا نشده اما احتمالاً جمعیت رودخانه کبودوال از جمعیت دو رودخانه دیگر جدا شده است.

واژه‌های کلیدی

تیل آباد

ریزماهواره

شیرآباد و کبودوال

Alburnoides bipunctatus
DNA

مقدمه

بوده، به طوری که در بسیاری از آبهای اروپا نزدیک به انقراض می‌باشد (Kirchhofer 1997)، اما در ایران و در حوزه‌های جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتاً خوبی برخوردار می‌باشد (Ahmadi et al. 2011). مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان دریای خزر نشان‌دهنده این واقعیت است که بسیاری از ماهیان روند گونه‌زایی را طی کرده و ریزفرایند ایجاد جمعیت‌ها همچنان ادامه دارد به طوری که گونه‌های خزری و دریای سیاه- خزری، زیرگونه‌ها و جمعیت‌هایی را در مناطق مختلف دریای خزر تشکیل داده‌اند (Azizi et al. 2011). (Rahmani 2006) در بررسی اثر سد بر تنوع و تمایز ریختی ماهی خیاطه در رودخانه تجن ساری بیان کردند، برای اطمینان از تمایز جمعیت‌های این ماهی و به دست آوردن نتایج قطعی‌تر نیاز به مطالعات مولکولی می‌باشد، همچنین Ahmadi et al. (2011) در بررسی برخی خصوصیات ساختار جمعیت ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران بیان کردند که برای بررسی کامل‌تر جدایی جمعیتی، بایداز روش‌های نوین ژنتیکی استفاده کرد. نشانگرهای ریزماهواره عبارتند از توالی‌های کوتاهی از DNA به طول کمتر از ۶ نوکلوتید که این توالی‌های کوتاه به صورت پشت سر هم و بدون انقطاع و یا انصفال در ژنوم اکثر موجودات تکرار می‌شوند. با توجه به مطالعات وسیع انجام شده مشخص شد که ریزماهواره‌ها در اکثر موجودات وجود دارند و در همه آن‌ها نوع ژنتیکی بسیار بالایی از خود نشان داده‌اند. یکی از کاربردهای ریزماهواره‌ها جداسازی جمعیت‌ها و ذخایر مختلف متعلق به یک گونه است (Hancock 2000). در این تحقیق سعی شد با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه در رودخانه‌های تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال استان گلستان پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

تعداد ۸۴ نمونه ماهی خیاطه، از رودخانه‌های تیل‌آباد (استان گلستان، ۳۶ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی)، شیرآباد (استان گلستان، ۳۷ درجه شمالی و ۵۵ درجه شرقی) و کبودوال (استان گلستان، ۳۶ درجه شمالی و ۵۴ درجه شرقی) (شکل ۱) در مهر

خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنی دارند (Kirpichnikov 1972). ماهی خیاطه با نام علمی *Alburnoides bipunctatus* (Bloch 1782) یکی از گونه‌های خانواده کپور ماهیان موجود در ایران می‌باشد. این ماهی از گونه‌هایی است که در سراسر اروپای مرکزی، سواحل اقیانوس اطلس Ladiges and (Vogt 1979). این ماهی دارای بدنی برآمده، دهان میانی و شکاف دهان افقی است. دندان حلقوی آن دو ردیفی و به فرمول ۲-۵-۲-۵ می‌باشد. صفت مشخص این گونه، خط جانبی سیاه رنگ آن است. به هنگام جفت‌گیری و تخم‌ریزی در روی خط جانبی نوارهای تیره‌رنگی که از پیش‌سربوپوش آبتشی تا قاعده باله دمی امتداد دارد، ظاهر می‌شود (Vosoughi and Mostajir 2001). حداقل اندازه آن ۱۵ سانتی‌متر (بیشترین فراوانی طولی آن از ۱۰۰-۱۱۰ میلی‌متر) است (Ghorbani et al. Abdoli 2000).

(2012) در بررسی پراکنش و فراوانی ماهی خیاطه در نهرهای تیل‌آباد، شیرآباد و کبودوال، مشاهده کردند که بیشترین فراوانی ماهی خیاطه در نهر کبودوال در طبقه طولی ۸۰-۹۰ میلی‌متر، در نهر شیرآباد در طبقه ۹۰-۱۰۰ میلی‌متر و در نهر تیل‌آباد در طبقه طولی ۵۰-۶۰ میلی‌متر قرار دارد. همچنین بیان کردند فراوان‌ترین طبقه سنی این ماهی در نهر تیل‌آباد مربوط به ماهیان صفر ساله و در نهر کبودوال و شیرآباد مربوط به ماهیان ۳ ساله می‌باشد.

Zivkovic and Jovanovic (2011) صفات مورفو‌متريک و مريستيک را در ماهیان خیاطه رودخانه نيساوا حوزه دانوب را مورد بررسی قرار داده و بیان کردند که صفات مورفو‌متريک تحت تاثير زيستگاه‌های مختلف، متنوع می‌باشد که در اين ميان بيشترین تفاوت‌ها در صفاتي چون فاصله پشت چشمی، ارتفاع باله مخرجی، حداقل ارتفاع بدنه و طول پیش باله مخرجی مشاهده شد. به توجه به ويزگي‌های مريستيک، تعداد شعاع‌های نرم باله مخرجی در مناطق مختلف نمونه‌برداری متفاوت بیان شد. دندان حلقوی ماهیان خیاطه نيز در زيستگاه‌های متنوع، متفاوت بود. شرایط زندگی ماهی خیاطه در اروپا به علل مختلف نامناسب

تجزیه آماری

ارزیابی تعداد الل در هر جایگاه ژنی، ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.3 (Peakall and Smouse 2006) انجام شد (Zar 1999). برای تعیین تفاوت بین دو منطقه در مقادیر ناخالصی مشاهده شده (Ho)، مورد انتظار (H_e) و تنوع الی از آزمون ویلکاکسون غیرپارامتریک در نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد (Sambrook et al. 1989).

برای تنظیم سطح معنی‌داری تست‌های تکرار شونده ضریب تصحیح بونفرونی استفاده شد (Rice 1989). به منظور تعیین آماره درون‌آمیزی (F_{is}) و سطح معنی‌داری آن از نرم‌افزار FSTAT 2.9.3 استفاده شد. با استفاده از معیار F_{st} و تحت تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نرم‌افزار GenAlex شیوه توزیع تنوع مشاهده شده و همچنین میزان تمایز بین مناطق محاسبه شد. مقادیر فاصله (D) و شباهت ژنتیکی (I) (Nei 1978) نیز محاسبه شد. تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی و همچنین میزان تمایز بین جمعیتی براساس مدل الی بین‌نهایت (F_{st}) و مدل جهش پله‌ای (R_{st}) با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی بسته نرم‌افزاری GenAlex انجام شد. دندروگرام از مقادیر عدم تشابه ژنتیکی طبق NTSYS (Software, Setauket, NY, USA Exeter) روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار

درست شد.

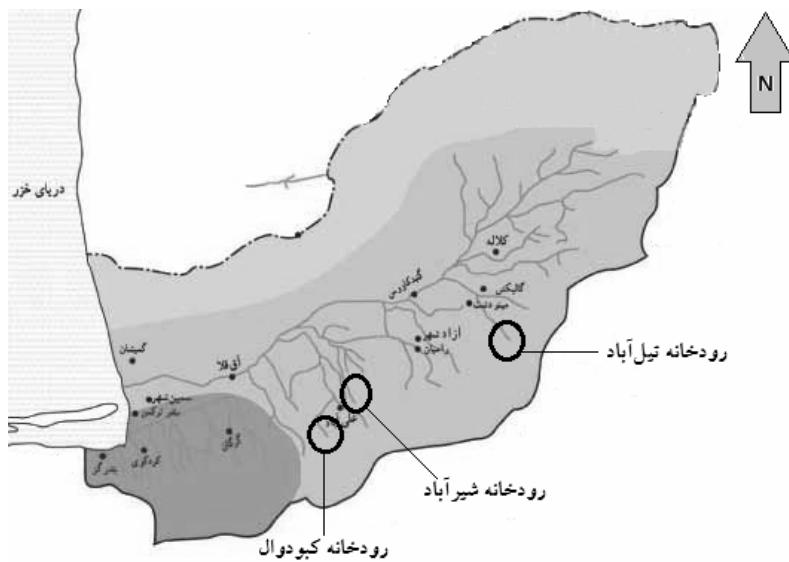
نتایج و بحث

در این تحقیق از ۶ جایگاه ژنی استفاده شد که همگی چندشکلی را نشان دادند. کمترین تعداد الل در جایگاه Rser10 (۸ ال) و بیشترین تعداد الل در جایگاه LleC-090 (۳۰ ال) مشاهده شد. پایین‌ترین میزان ال‌های موثر در جایگاه Rser10 (۴/۹۷) و بالاترین میزان آن در جایگاه LleC-090 (۲۳/۰۵) مشاهده شد (جدول ۲). تعداد متوسط ال‌های مشاهده شده و موثر در رودخانه تیل‌آباد به ترتیب ۱۶/۸۳۳ و ۱۱/۳۲۱، در رودخانه شیرآباد به ترتیب ۱۶/۱۶۷ و ۱۱/۱۸۶ و در رودخانه کبودوال به ترتیب ۹/۴۲۸ و ۱۳/۰۰۰ به دست آمد. متوسط ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار در رودخانه تیل‌آباد به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۸۹، در رودخانه شیرآباد به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۹۰ و در رودخانه کبودوال

سال ۱۳۹۰ صید شد (۲۸ نمونه از هر رودخانه). نمونه‌برداری‌ها به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. حدود دو گرم از باله پشتی هر ماهی جداسازی و تا زمان استخراج DNA در الكل اتیلیک ۹۵ درصد نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم انجام پذیرفت (Hillis et al. 1996). استخراج شده پس از افروزن ۱۰۰ میکرولیتر آب قطر استریل تا زمان انجام مطالعات در فریزر -۲۰- نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آکارز یک درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد (Sambrook et al. 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز

۶ جایگاه ژنی ریزماهواره LleC-090, LleA-071, Crooijmans et al. (Dubut et al. 2010) MFW17 و MFW2 (1997) از مطالعات انتشار یافته انتخاب شدند (جدول ۱). واکنش-های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و بهترین دمای اتصال برای هر یک از آن‌ها به دست آمد. تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۰/۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۱۵ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۴۰۰ میکرومولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تگ DNA پلیمراز، بافر ۱/۵ PCR و ۱X میلی مولار کلرید منیزیم و آب قطره تا رسیدن به حجم انجام گرفت. چرخه دمایی برای هر جایگاه ژنی عبارت بود از: یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه (واسرسته‌سازی اولیه)، ۳۵ چرخه ۹۴ درجه‌ای به مدت ۳۰ ثانیه (واسرسته‌سازی)، درجه حرارت اتصال اختصاصی هر آغازگر (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه (الحق) و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه (بسط) و یک چرخه ۷۲ درجه‌ای به مدت ۳ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد (غیر یونیزه) جداسازی شدند. ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ-آمیزی شدند (Bassam et al. 1991) و پس از تهیه تصویر آن‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (شکل‌های ۲-۷)، از نرم‌افزار Gel pro analyzer 6.0 برای محاسبه طول قطعات استفاده شد. در تصاویر، نمونه‌های ۱-۲۸ مربوط به رودخانه تیل‌آباد، نمونه‌های ۳۱-۵۸ مربوط به رودخانه شیرآباد و نمونه‌های ۶۱-۸۸ مربوط به رودخانه کبودوال هستند.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی رودخانه‌های تیل آباد، شیر آباد و کبودوال (استان گلستان، ایران)

جدول ۱- توالی و ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ریزماهواره‌ای ماهی خیاطه

جایگاه ژنی	کد دست‌بایی در بانک ژن	توالی	تعداد ال	اندازه الی (bp)	دماهی اتصال (درجه سانتی‌گراد)
LleA-071	FJ601719	F: 5' GTCTTAGATTGTGTAGCGGG 3' R: 5'ACTTCAGTTACTAACAGAGATTAGTGA 3'	۱۸	۲۱۲-۴۴۴	۵۰
LleC-090	FJ601722	F: 5' TCAGACACAACAAACCGACC 3' R: 5' GGCGCTGTCCAGAACTG 3'	۲۲	۱۵۲-۳۸۴	۵۵
Rser10	AJ312850	F: 5' TCGTAATCGTAAGCGGTG 3' R: 5' GCCACTAAAGCGCAGAACGCC 3'	۱۱	۱۷۶-۲۴۸	۶۰
Ca3	AF277575	F: 5' GGACAGTGAGGGACGCAGAC 3' R: 5' TCTAGCCCCCAAATTTACGG 3'	۱۷	۲۴۸-۳۶۴	۵۸
MFW2	EF144119	F: 5' CACACCGGGCTACTGCAGAG 3' R: 5' GTGCAGTGCAGGCAGTTGC 3'	۱۱	۱۸۰-۲۳۶	۶۱
MFW17	FJ491399	F: 5' CTCAACTACAGAGAAATTTCATC 3' R: 5' GAAATGGTACATGACCTCAAG 3'	۱۲	۱۷۶-۲۲۸	۵۰

(۰/۳۲) در جایگاه Ca3 (رودخانه کبودوال) مشاهده شد. همچنین میانگین ناخالصی مورد انتظار ۰/۸۹ به دست آمد که بالاترین میزان آن (۰/۹۵) در جایگاه LleC-090 (رودخانه تیل آباد) و پایین ترین میزان آن (۰/۷۹) در جایگاه Rser10 (رودخانه کبودوال) مشاهده شد. تفاوت معنیداری هم از نظر تنوع الی و ژنی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). در بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، در دو جایگاه در جمعیت

به ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۸۸ به دست آمد. همچنین در جمعیت تیل آباد در جایگاه Rser10 ۳ ال اختصاصی، در جمعیت شیرآباد در جایگاه LleA-071 یک ال اختصاصی و در جمعیت کبودوال در جایگاه Ca3 یک ال اختصاصی مشاهده شد. میانگین ناخالصی مشاهده شده ۰/۸۱ به دست آمد که بالاترین میزان آن (۱/۰۰) در جایگاه Rser10 (رودخانه تیل آباد) و در جایگاه LleA-071 (رودخانه کبودوال) و پایین ترین میزان آن

جدول ۲- تنوع ژنتیکی جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در جمعیت‌های ماهی خیاطه در استان گلستان

MFW17	MFW2	Ca3	Rser10	LleC-090	LleA-071	جایگاه ژنی	منطقه	پارامتر
۹/۰۰	۱۱/۰۰	۱۷/۰۰	۱۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱۹/۰۰	Na		
۶/۹۳	۶/۶۱	۱۲/۶۴	۸/۶۱	۲۳/۰۵	۱۰/۰۵	Ne		
۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۵۰	۱/۰۰	۰/۹۶	۰/۸۵	Ho	تیل آباد	
۰/۸۵	۰/۸۴	۰/۹۲	۰/۸۸	۰/۹۵	۰/۹۰	He		
۰/۱۲	۰/۰۰	۰/۴۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۴	F _{is}		
**	***	***	***	ns	ns	HWS		
۱۴/۰۰	۱۳/۰۰	۱۶/۰۰	۱۱/۰۰	۲۲/۰۰	۲۰/۰۰	Na		
۹/۳۳	۸/۶۱	۱۱/۶۱	۷/۳۹	۱۴/۹۳	۱۵/۲۲	Ne		
۰/۹۲	۰/۹۶	۰/۶۰	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۹۶	Ho	شیرآباد	
۰/۸۹	۰/۸۸	۰/۹۱	۰/۸۶	۰/۹۳	۰/۹۳	He		
۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۳	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۰۰	F _{is}		
ns	***	***	***	***	ns	HWS		
۱۴/۰۰	۹/۰۰	۱۹/۰۰	۸/۰۰	۱۳/۰۰	۱۵/۰۰	Na		
۱۰/۳۱	۷/۷۲	۱۵/۸۳	۴/۹۷	۷/۷۲	۹/۹۸	Ne		
۰/۸۵	۰/۹۶	۰/۳۲	۰/۶۴	۰/۹۲	۱/۰۰	Ho	کبودوال	
۰/۹۰	۰/۸۷	۰/۹۳	۰/۷۹	۰/۸۷	۰/۹۰	He		
۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۶۵	۰/۱۹	۰/۰۰	۰/۰۰	F _{is}		
ns	***	***	**	***	ns	HWS		

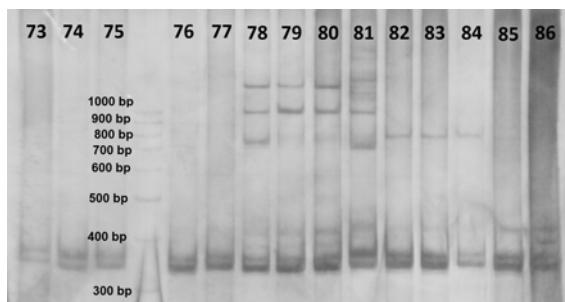
(Na) تعداد الی‌های مشاهده شده؛ (Ne) تعداد الی‌های موثر؛ (Ho) ناخالصی مشاهده شده؛ (He) ناخالصی مورد انتظار؛ (HWS) تست احتمال هاردی- واینبرگ؛ (F_{is}) شاخص درون‌آمیزی. S, *, ** و *** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح پنج، یک و یک دهم درصد

مقدار آن بین رودخانه‌های تیل آباد و کبودوال (۱۰/۵۵۸) بوده است. در جدول ۵ میزان F_{st} و جریان ژنی محاسبه شده در سطح جایگاه‌های ژنی آورده شده است، متوسط آماره F_{st} در این بررسی ۰/۰۲۴ و متوسط جریان ژنی ۱۱/۹۱ به دست آمد.

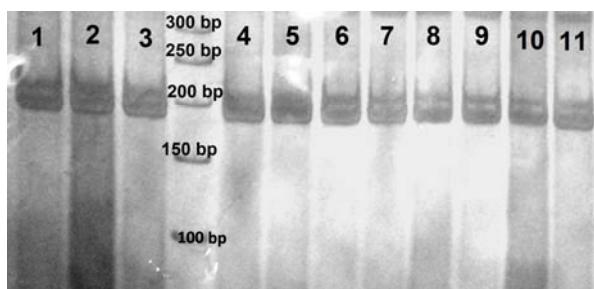
نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در جدول ۶ آورده شده است. مقدار F_{st} از طریق تجزیه واریانس مولکولی ۰/۰۱۸ به دست آمد. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی ۹۸ درصد) درون جمعیت‌ها و تنوع پایینی (دو درصد) بین جمعیت‌ها وجود دارد (شکل ۸).

جدول ۷ میزان R_{st} محاسبه شده برای مناطق نمونه‌برداری را نشان می‌دهد که بیشترین مقدار این آماره بین رودخانه‌های تیل آباد و کبودوال (۰/۲۷۹) و کمترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل آباد و

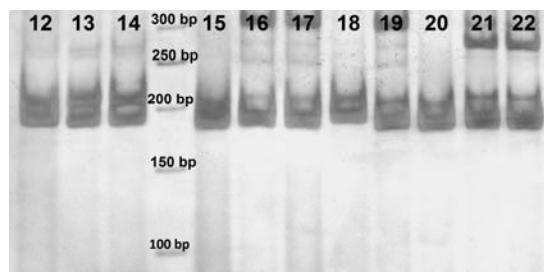
تیل آباد (LleC-090 و LleA-071) و دو جایگاه در جمعیت کبودوال (MFW17 و LleA-071) تعادل برقرار بوده و در سایر جایگاه‌ها انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- واینبرگ مشاهده شد (P ≤ ۰/۰۵)، در حالی که پس از اعمال ضربی تصحیح بونفرونی، ۶ مورد از ۱۸ آزمون مورد بررسی (۶ جایگاه ژنی × ۳ منطقه) در تعادل قرار گرفتند ($P < ۰/۰۰۸۳$). متوسط آماره درون-آمیزی (F_{is}) ۰/۰۸۲ را نشان داد. میزان آماره تمایز (F_{st}) بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه‌برداری محاسبه شد (جدول ۳) که بیشترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل آباد و کبودوال (۰/۰۲۱) و کمترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد (۰/۰۱۶) می‌باشد. جریان ژنی نیز بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه-برداری و مقایسه جمعیت‌ها محاسبه شد (جدول ۴) که بیشترین مقدار آن بین رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد (۱۸/۶۱۰)، و کمترین



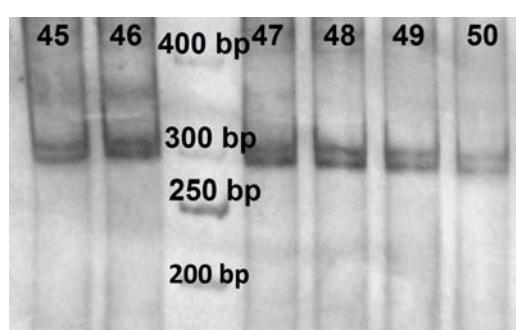
شکل ۲- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر LleA-071 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه کبودوال)



شکل ۳- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر LleC-090 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه تیلآباد)



شکل ۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر Rser10 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه تیلآباد)



شکل ۵- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر Ca3 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه شیرآباد)

جدول -۳- میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونهبرداری ماهی خیاطه استان گلستان

مناطق نمونهبرداری	تیل آباد	شیرآباد	کبودوال	کبودوال
تیل آباد	۰/۰۰۰			
شیرآباد	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰		
کبودوال	۰/۰۲۱	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰	

جدول -۴- میزان N_m (جریان ژنی) محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونهبرداری ماهی خیاطه در استان گلستان

مناطق نمونهبرداری	تیل آباد	شیرآباد	کبودوال	کبودوال
تیل آباد	۰/۰۰۰			
شیرآباد	۱۸/۶۱۰	۰/۰۰۰		
کبودوال	۱۰/۵۵۸	۱۴/۵۸۶	۰/۰۰۰	

جدول -۵- میزان تمایز (F_{st}) در سطح ۶ جایگاه ژنی مورد استفاده ماهی خیاطه در استان گلستان

جایگاه ژنی	LleA-071	LleC-090	Rser10	Ca3	MFW2	MFW17	میانگین
N_m	۱۴/۵۵۲	۸/۰۷۵	۵/۶۴۳	۱۹/۰۶۱	۱۰/۷۰۵	۱۲/۴۴۲	۱۱/۹۱
F_{st}	۰/۰۱۷	۰/۰۳۰	۰/۰۴۲	۰/۰۱۳	۰/۰۲۳	۰/۰۱۸	۰/۰۲۴

جدول -۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در F_{st} مربوط به نمونهبرداری ماهی خیاطه در استان گلستان

df	SS	MS	Est.var.	%	Stat	Value	Prob
۲	۱۰/۹۷	۵/۴۸	۰/۰۴	دو درصد	-	-	-
۱۶۵	۴۴۹/۹۴	۲/۷۲	۲/۷۲	د. درصد	F_{st}	۰/۰۱۸	۰/۰۱۰

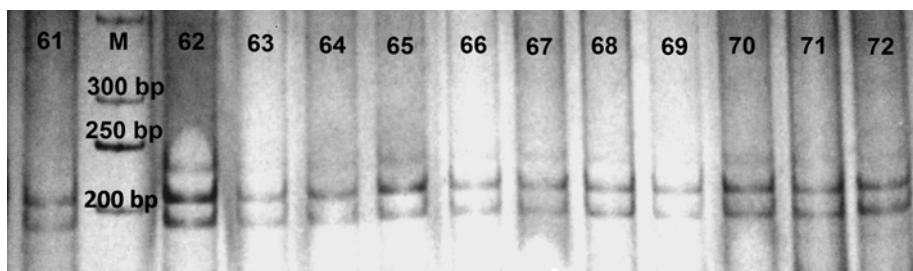
(Df درجه آزادی؛ SS مجموع مربوعات؛ MS انحرافات میانگین مریع؛ Prob معنی دار بودن انحراف پس از ۹۹ جایگزینی تصادفی)

اما احتمالاً جمعیت کبودوال از جمعیت دو رودخانه دیگر جدا شده است (شکل ۹).

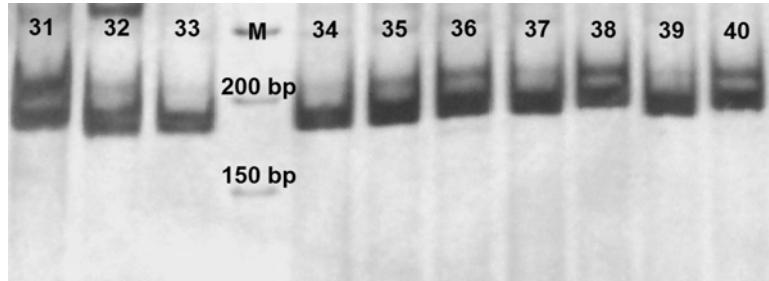
مطالعه ماهیان در اکوسیستم‌های آبی از نظر تکاملی، بوم‌شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت منابع آبی، بهره‌برداری از ذخایر و پرورش آن‌ها حائز اهمیت است (Mostafavi 2006). اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزیپروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه‌های بومی، مورد مطالعه قرار گرفته و اوین 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).

شیرآباد (۰/۰۵۱) محاسبه شده است، که با نتایج به دست آمده از آماره F_{st} مطابقت دارد.

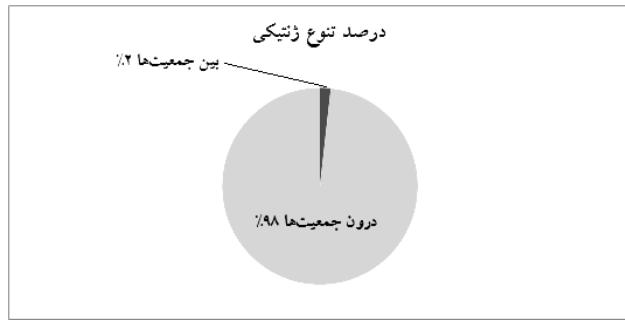
جهت محاسبه شباهت و فاصله ژنتیکی از معیار نئی استفاده شد. بر این اساس بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل آباد و کبودوال (۰/۴۰۲) و کمترین فاصله بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد (۰/۳۳۳) مشاهده شد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد (۰/۷۱۷) و کمترین شباهت ژنتیکی نیز بین نمونه‌های رودخانه‌های تیل آباد و کبودوال (۰/۶۶۹) مشاهده شد (جدول ۸). طبق دندروگرام UPGMA ترسیم شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی نیز جمعیت‌های رودخانه‌های تیل آباد و شیرآباد از هم جدا نشده



شکل ۶- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر MF2W روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه کبودوال)



شکل ۷- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی خیاطه با استفاده از آغازگر MF17 روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (نمونه‌ها از رودخانه شیرآباد)



شکل ۸- توزیع تنوع ژنتیکی تحت معیار F_{st}

مطالعات صورت گرفته توسط Dubut et al. (2010) بر روی جمعیت ماهیان خیاطه در رودخانه Durance واقع در جنوب شرقی فرانسه و مطالعات انجام شده توسط Crooijmans et al. (1997) بر روی ماهی کپور معمولی انتخاب شدند. با وجود غیر اختصاصی بودن، هر ۶ جایگاه زنی دارای چندشکلی بودند، بنابراین، استفاده از این جایگاه‌های زنی در مطالعات ژنتیکی آتی ماهی خیاطه توصیه می‌شود.

داده‌های مربوط به تنوع ژنتیکی (همچون ناخالصی و تعداد ال‌ها) از پارامترهای مهم تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در رویارویی با تغییرات محیطی هستند (Frankham 2008)، و ویژگی‌هایی همچون اندازه بدن و قابلیت رقابت، توانایی یک موجود برای

با توجه به اینکه ماهی خیاطه یکی از ماهیان بسیار مهم رودخانه‌های حوزه دریای خزر می‌باشد، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ماهیان این حوزه به دلیل جدایی جغرافیایی از یکدیگر جدا شده‌اند (Samaee et al. 2006). مطالعاتی در زمینه جدایی جمعیت‌های ماهی خیاطه بر اساس تنوع و تمایز ریختی این ماهی صورت گرفته اما تاکنون تنوع ژنتیکی این ماهی در رودخانه‌های کشور بررسی نشده‌است.

ریز‌ماهواره‌ها نشانگرهای ژنتیکی هستند که به صورت گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های پرورشی و وحشی ماهیان استفاده می‌شوند (Liu et al. 2009). گونه خیاطه فاقد جایگاه زنی اختصاصی است و جایگاه‌های زنی مورد استفاده در این بررسی از

هر جایگاه ریزماهواره‌ای به دست می‌آید. کاهش تعداد ال‌های مشاهده شده در سطح جمعیت می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیک باشد (Lind et al. 2009). تحقیقات نشان داده که غنای الی برای ارزیابی تنوع نمونه‌ها نسبت به ناخالصی مناسب‌تر است. همچنین بالا بودن غنای الی، نشان‌دهنده بالا بودن اندازه موثر جمعیت است (Diz and Presa 2009).

در صورت بزرگ بودن بیش از اندازه جمعیت، تصادفی بودن آمیزش‌ها و عدم وجود جهش، بهزیادی و مهاجرت (جابجایی ماهیان از یک جمعیت به جمعیت دیگر)، فراوانی الی و ژنتیکی می‌تواند از نسلی به نسل دیگر ثابت بماند که تحت عنوان تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌شود. در جمعیت‌های ماهیان، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ زیاد دیده می‌شود (Lucentini et al. 2006). در این بررسی هر سه جمعیت در اکثر جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند. ۱۴ نمونه از ۱۸ تست مورد بررسی به طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) انحراف از تعادل نشان دادند که پس از اعمال ضریب تصحیح یونفرونی، ۱۲ نمونه انحراف معنی‌داری از تعادل داشتند ($P < 0.0083$). روی هم رفته، انحراف از تعادل را نمی‌توان تنها با یک عامل توجیه نمود و مجموعه‌ای از عوامل که بیشتر ناشی از دستکاری‌های انسان در محیط زیست (مخصوصاً در رودخانه‌ها) هستند، می‌توانند دلایلی برای انحراف از تعادل در جمعیت‌های مورد بررسی باشند. انتخاب، عدم تکثیر تصادفی، مهاجرت و ال‌های پوچ فاکتورهای Beaumont موثر در انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ هستند (Beaumont and Hoare 2003). تجزیه واریانس مولکولی ابزاری مناسب برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های (Grassi et al. 2004). نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس F_{st} نشان داد که ۹۸ درصد تنوع در درون میانگین جمعیت‌ها و تنها دو درصد بین جمعیت‌ها وجود دارد. میانگین F_{st} (۰/۰۱۸) نیز تمایز بسیار پایینی را میان جمعیت‌ها نشان داد. بر اساس معیار (Wright 1978) میزان F_{st} بین صفر تا ۰/۰۵ بیانگر تمایز اندک است. با توجه به این که R_{st} از اطلاعات مربوط به اندازه الی استفاده کرده است و وابسته به جهش نیست، می‌تواند داده‌های بیولوژیک مناسب‌تری را نسبت به F_{st} فراهم آورد.

استفاده و بقا در زیستگاه‌های طبیعی را تعیین می‌کند (Hakansson and Jensen 2005).

ناخالصی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیار دارد؛ زیرا هر فرد ناخالص ناقل ال‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (Diz and Presa 2009). در این بررسی میانگین مقادیر به دست آمده برای تعداد ال‌های ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۱۵/۳۳، ۰/۸۱۷ و ۰/۸۹۳ به دست آمد، این مقادیر در تحقیق (Dubut et al. 2010) با استفاده از آغازگرهای مشابه ۱۵/۲۵، ۰/۸۰۷ و ۰/۸۶۷ بوده است که تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. میانگین ناخالصی مشاهده شده در سطح جمعیت‌های مورد بررسی ۰/۸۱۷ به دست آمد که نسبت به مقادیر مشاهده شده در ماهیان آب شیرین و رودکوچ (به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۶۸) در Kashiri (2010) (Dewoody and Avis 2000) بررسی تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) در حوزه جنوبی دریای خزر میانگین ناخالصی مشاهده شده را ۰/۷ و (Rezaei 2010) در بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره، میانگین ناخالصی مشاهده شده را ۰/۸۱ گزارش کردند.

تعداد متوسط ال در سطح جمعیت‌ها ۱۵/۳۳ محاسبه شد، که از مقادیر به دست آمده در ماهیان آب شیرین (۷/۵) و ماهیان رودکوچ (۱۱/۳) (Dewoody and Avis 2000) بسیار بالاتر است. بنابراین طبق این بررسی تعداد ال‌های و همچنین ناخالصی در حد مناسبی قرار دارند. اما این مقدار از متوسط تعداد ال گزارش شده برای ماهیان دریایی (۱۹/۹) (Dewoody and Avis 2000) پایین‌تر است که این امر را می‌توان به بزرگتر بودن محیط دریایی و به تبع آن بزرگتر بودن اندازه جمعیت موثر ماهیان دریایی و پتانسیل بالای جریان ژئی محیط‌های دریایی نسبت داد. در این بررسی میانگین تعداد ال در هر جایگاه ۱۵/۲۳ و میانگین تعداد ال موثر نیز ۱۰/۶۴ به دست آمد. ال‌های موثر بیانگر تعداد ال‌هایی است که ناخالصی یکسان ایجاد می‌کنند. تعداد ال‌های واقعی در هر جایگاه می‌تواند تحت تاثیر اندازه نمونه قرار گیرد به طوری که با تعداد نمونه‌های مختلف، تعداد ال‌های واقعی مختلف در

جدول ۷- میزان R_{st} محاسبه شده برای مناطق نمونهبرداری ماهی خیاطه در استان گلستان (اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان می دهند)

مناطق نمونهبرداری			
کبودوال	شیرآباد	تیل آباد	
۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	-	تیل آباد
۰/۰۱۰	-	۰/۰۵۱	شیرآباد
-	۰/۲۱۹	۰/۲۷۹	کبودوال

جدول ۸- ماتریس فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی مناطق نمونهبرداری ماهی خیاطه در استان گلستان (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشند)

مناطق نمونهبرداری			
کبودوال	شیرآباد	تیل آباد	
۰/۶۶۹	۰/۷۱۷	۰/۰۰۰	تیل آباد
۰/۷۱۰	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	شیرآباد
۰/۰۰۰	۰/۳۴۲	۰/۴۰۲	کبودوال



شکل ۹- دندروگرام UPGMA برای مناطق نمونهبرداری ماهی خیاطه در استان گلستان

راحتی بین دو جمعیت تیل آباد و شیرآباد برقرار می باشد. طبق داده های عنوان شده توسط Thorpe (1982) که مقدار شباهت ژنتیکی را برای سطوح فیلوژنی مختلف در شاخه مهره داران محاسبه کرد، برای جمعیت هایی که به گونه های مشابه تعلق دارند، شباهت ژنتیکی بین $0/۰۹-۰/۸۰$ و در گونه های متعلق به جنس شباهت ژنتیکی بین $0/۸۵-۰/۳۵$ قرار دارد. مقدادر شباهت به دست آمده در این بررسی در محدوده گونه های متعلق به جنس های مشابه قرار می گیرند. طبق نتایج به دست آمده از شباهت ژنتیکی (جدول ۸) کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت های تیل آباد و کبودوال ($0/۶۶۹$) وجود دارد.

با توجه به نتایج این تحقیق می توان گفت احتمالاً جمعیت کبودوال از دو جمعیت دیگر جدا شده است، اما جدایی آشکاری بین دو جمعیت تیل آباد و شیرآباد مشاهده نشده است. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی مناطق موردن بررسی در حد قابل قبولی قرار

(Balloux and Moulin 2002) کم بودن تنوع بین جمعیتی و آماره های تمایز، نشان دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت هاست (Pinera et al. 2007). نتایج به دست آمده، جریان ژنی بسیار بالایی را میان رودخانه های تیل آباد و شیرآباد ($1/۸۶۱۰$) نشان می دهد.

بر اساس مقادیر فاصله ژنتیکی (جدول ۸) و دندروگرام UPGMA بین جمعیت های تیل آباد و شیرآباد جدایی مشاهده نشده است اما می توان گفت احتمالاً جمعیت کبودوال در یک گروه مجزا قرار گرفته است که با بالا بودن تمایز و پایین بودن جریان ژنی بین رودخانه های تیل آباد و شیرآباد با رودخانه کبودوال (جدول های ۳ و ۴) مطابقت دارد. یکی از دلایل آشکار این جدایی زیر حوزه این دو رودخانه می باشد، زیرا رودخانه های تیل آباد و شیرآباد از زیر حوزه های سد و شمگیر بوده اما رودخانه کبودوال در حوزه آبخیز نهر زرین گل واقع شده است، در نتیجه جریان ژنی، به

ماسه از بستر و حاشیه رودخانه) صدمات جبران ناپذیری را به گونه‌های رودخانه‌ای وارد می‌سازد. از آنجا که ماهی خیاطه کمتر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه قرار گرفته نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه ژنتیک جمعیت این ماهی احساس می‌شود. همچنین نشانگر ریزماهواره از توانایی بالایی برای نمایش میزان تنوع ژنتیکی در این ماهی برخوردار بود.

داشت، اما ایجاد تدبیری در خصوص حفظ و تقویت تنوع مشاهده شده ضروری بوده تا تمایز ژنتیکی نمونه‌های مناطق مورد بررسی حفظ شود. در این خصوص، بهترین روش، احیای محل‌های طبیعی تخم‌ریزی این گونه یعنی رودخانه‌ها است، زیرا دخالت بی‌رویه انسان در رودخانه‌ها (ایجاد سد بر روی رودخانه) ها در راستای توسعه صنعت و کشاورزی، احداث کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی در حاشیه رودخانه، برداشت بی‌رویه شن و

منابع

- Abdoli A (2000) Fishes of Iran inland waters. Museum of Iran Nature and Wild life Press, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Ahmadi SE, Vosoughi A, Vatandoost S, Ghelichi A, Seidanlou Z (2011) Some specific population structure of Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) in the main Cluster of Talar River in Mazandaran province. Journal of Fisheries of Islamic Azad University Azadshahr Branch 5:65-80. (In Farsi).
- Azizi F, Khoshkholgh MR, Rahmani H, Sattari M, Anvarifar H (2011) A study of dam effect on diversity and differentiation of Spirlin *Alburnoides bipunctatus* in Tejan River of Sari. In: First National Congress of Aquatics Science. Iran, Boushehr, Islamic Azad University. (In Farsi).
- Balloux F, Moulin N (2002) The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff GM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry 84: 680-683.
- Beaumont A, Hoare K (2003) Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Wiley-Blackwell 50 p.
- Coad BW (1980) Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological conservation 10: 51-80.
- Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van der poel JJ, Groenen MAM (1997) Microsatellite markers in common carp *Cyprinus carpio* L. Animal genetics 28: 129-134.
- Dewoody JA, Avise JC (2000). Microsatellite variation in Marin, freshwater and anadromous fishes compare with other animal. Journal of Fish Biology 56: 461-473.
- Diz PA, Presa P (2009). The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287: 278-285.
- Dubut V, Sinama M, Martin JF, Meglecz E, Fernandez J, Chappaz R, Gilles A, Costedoat C (2010) Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids : A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. BMC Research Notes 135: 1-9.
- Frankham R (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. Molecular Ecology 17: 325-333.

- Ghorbani R, Hajimoradloo A, Yulghi S, Mollaei M, Naeimi A, Abbasi F (2012) Study of distribution, and frequency of *Alburnoides bipunctatus* in Tilabad, Kaboodwal and Shirabad streams, Golestan Province. Research final Report. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran. 89.283: 24-28. (In Farsi).
- 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. Plant Science 166: 1437-1441.
- Hakansson J, Jensen P (2005) Behavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. Biological Conservation 122: 431-439.
- Hancock JM (2000) Microsatellite and other simple sequence. Oxford university press, London.
- Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer EA (1996) Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular systematics (eds. Hillis DM, Mortiz C, Mable BK) 321-384. Sinauer Associates, Sunderland.
- Kashiri H (2010) The study of genetic diversity of *Rutilus rutilus caspius* populations in southern basin of Caspian sea using microsatellite. Thesis, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Iran, 62p (In Farsi).
- Kirchhofer A (1997) The assessment of fish vulnerability in Switzerland based on distribution data. Biological Conservation 80: 1-8.
- Kirpichnikov VS (1972) Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Russian Journal of Genetics 8: 65-72.
- Ladiges W, Vogt D (1979) Die of sub water fishes in Europas. Paul Parey, Hamburg and Berlin.
- Lind CU, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture 286: 12-19.
- Liu F, Xia JH, Bai ZH, Fu JJ, Li JL, Yue GH (2009) High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp *Ctenopharyngodon idella* revealed by microsatellite analysis. Aquaculture 297: 51-56.

- Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Gigliarelli L, Natali M, Panara F (2006) Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike *Esox lucius* L. *Fisheries Research*. 80: 251-262.
- Mostafavi H (2006) Biodiversity of Talar River fishes in Mazandaran Province. *Environmentology Journal* 40:127-135. (In Farsi).
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Rahmani H (2006) Population Dynamics and Genetic diversity of Shahkooli fish *Chalcalburnus chalcooides* (Gueldenstadt, 1772) in Haraz, Shirood and Gazafrood Rivers. PhD Thesis, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Iran. (In Farsi).
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Rezaei M (2010) The study of genetic diversity of *Rutilus frisii jutum* populations in southern basin of Caspian sea using microsatellite. Thesis, Agricultural Science and Natural Resources University of Gorgan, Iran, 83 p (In Farsi).
- Samaee SMR, Mojazi- Amiri B, Hosseini- Mazinani SM (2006) Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. *Folia Zoology* 55: 323-335.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. (eds. Ford N, Nolan C, Fregusen, M.) 743-745. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Thorpe JP (1982) The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 139-168.
- Vosoughi MH, Mostajir B (2001) Freshwater Fishes. Tehran University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Zivkovic D, Jovanovic B (2011) Spatial morphometric plasticity of spirlin *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) phenotype from the Nisava River, Serbia, Danube basin. *Biologica Nyssana* 2011: 1-9.