

تجزیه ارتباطی بین صفات ریخت سنجی و نشانگرهای RAPD در سیاه

ماهی *Capoeta capoeta gracilis* رودخانه تجن ساری

حسین انوری فر^۱، حمید فرحمند^{۲*}، محمدعلی نعمت اللهی^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 سنجی ای که نشان دهنده بیشترین ارتباط با صفات مولکولی در سیاه ماهی رودخانه تجن ساری می باشد 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 ۵۰-۱۰۰۰ متغیر بود. در این مطالعه برای اولین بار در زمینه ژنتیک آبری پروری از روش آنالیز تجزیه ارتباطی استفاده گردید که در آن با استفاده از روش رگرسیون 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 می دهد 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 می توان در بحث های مربوط به تنوع، تمایز و ساختار جمعیتی این ماهی بهره برد.

واژه های کلیدی

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

مقدمه

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

(2005). این ماهی در دریاچه‌ها تا عمق ۳۵ متری و در رودخانه‌ها در بسترهای قله سنگی، شنی و بر روی گیاهان آبی 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 گیاه-خواری است بطوری‌که از گیاهان پست، پریفیتوها و مواد پوسیده گیاهی (دتريت) 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، آبی پروری، صید ورزشی و مطالعات جغرافیای جانوری مهم می‌باشد (Samaee et al. 2006). به دلیل پراکنش و زیاده 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 (کوہستان اسکندری، ۱۳۸۲). از مطالعات ژنتیکی و ریخت سنجی صورت گرفته بر روی سیاه‌ماهی می‌توان Sayad-Borani and et al. (1998), Ghaninezhad (2001), Kohestan eskandari (2008), Pourali Darestani (2006), Samaee et al. (2006), Turan (2009), Samaee et al. (2011) و AnvariFar et al. اشاره نمود. با وجود تمام مطالعاتی که بر روی این ماهی و یا دیگر ماهیان رودخانه‌ای صورت گرفته، ولی هیچ‌کدام از این مطالعات به ارتباط بین صفات ریخت سنجی و ژنتیک نپرداخته است. با توجه به این‌که تا به حال در زمینه آبی 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 می‌باشند صورت گرفته است. در این مطالعه از نشانگر RAPD برای مطالعات ژنتیکی استفاده گردید. تکنیک تکثیر تصادفی قطعات چند شکلی DNA (RAPD) یکی از روش‌های مولکولی مورد استفاده در تشخیص گونه‌ها، زیر گونه‌ها، جمعیت‌ها و جنس‌ها می‌باشد

(Yu et al. 2004), Savolainen and Neale, Gebhardt et al. (2004) و Roy et al. (2006) از روش تجزیه ارتباطی برای بیان ارتباط بین روش مورفومتریک 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 نمودیم 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 تأیید 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 آبی پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی 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 برنامه ریزی‌های حفاظتی گونه‌ها حائز اهمیت است (Coad 1980). رودخانه تجن یکی از مهم‌ترین رودخانه‌های استان مازندران و حوزه دریای خزر می‌باشد که با سرچشمه گرفتن 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 طبقه‌بندی جزو سدهای بسیار بزرگ محسوب می‌گردد (McAllister et al. 2001). سیاه ماهی، ماهی غالب این رودخانه و حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد (Samaee et al. 2009). جنس سیاه ماهی (*Capoeta spp.*) از مرکز تا غرب آسیا پراکندگی دارد که این پراکنش شامل کشورهای ترکیه، آذربایجان، افغانستان، ارمنستان، گرجستان، عراق، ایران، فلسطین اشغالی 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 ۲×۲ میلی متر از بافت باله را در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری استریل انداخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول Chelex ۱۰ درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد مقدار ۱۵ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K (100 U/ml) به نمونه افزوده و جهت فعال نمودن کامل آنزیم پروتیناز K، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به مدت یک ساعت در بن ماری شیکردار در دمای ۵۶ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند و پس از آن، میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، بر روی حرارت جوشانیده شدند. هر بار قبل از استفاده نیز میکروتیوپ‌ها را پس از یک ورتکس ساده (LMS)، به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه با دور rpm ۶۰۰۰ سانترفیوژ شدند. برای تعیین کمیت و خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر با نور UV (با استفاده از طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و مشاهده نوارهای DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد (۰/۳۲ گرم آگارز جامد در ۴۰ سی سی بافر TAE (IX) و مقایسه آن با فاز لامبدا استفاده گردید (Estoup et al. 1996). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)-DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای RAPD جهت تعیین چند شکلی مورد ارزیابی قرار گرفت. این آغازگرها 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 ۱۰ آغازگر، تعداد ۶ آغازگر که دارای تکرارپذیری بالاتر، بهترین شرایط تکثیر و بیشترین میزان پلی مورفیسم را داشتند انتخاب گشتند (جدول ۲).

(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 دهی 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 & McClelland 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 پایین‌دست سد شهید رجایی انتخاب گردید که هر دو ایستگاه در مسیر اصلی رودخانه تجن قرار دارند. ایستگاه بالادست سد دارای موقعیت جغرافیایی ۲۴/۹۱'' ۱۱' ۳۶° شمالی و ۳۲/۱۳'' ۱۹' ۵۳° شرقی و ایستگاه پایین‌دست سد (بعد از سد) ۱۵/۳۶'' ۱۶' ۳۶° شمالی و ۵۱/۴۴'' ۱۲' ۵۳° شرقی می‌باشد (شکل ۱). نمونه برداری از ماهیان با استفاده از دستگاه الکتروشوکر با قدرت یک W و ولتاژ ۲۰۰-۳۰۰ V صورت پذیرفت. جهت مطالعات ریخت سنجی، ماهیان صید شده در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند و برای مطالعات بعدی به آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه تهران انتقال یافتند. جهت مطالعات مولکولی باله‌های سینه‌ای و شکمی سمت چپ بدن ماهی پس از صید جدا شده و در الکل ۹۶ درصد اتانول فیکس شده و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت الکل آن‌ها تعویض گردیدند (AnvariFar et al. 2011). در مجموع تعداد ۶۶ نمونه ماهی زیست‌سنجی کامل گردیدند که از این تعداد ۳۵ نمونه ماهی مربوط به ایستگاه بالادست (ایستگاه اول) و ۳۱ نمونه ماهی مربوط به ایستگاه دوم بودند. به منظور زیست‌سنجی ماهیان از کولیس دیجیتالی با دقت یک هزارم میلی‌متر استفاده گردید.

¹ Dominant

² Paralogous

³ Chelex protocol

M_t : 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 تک‌متغیره لون⁵ و آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید. میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات چندمتغیره⁶ کلیه صفات ریخت‌سنجی در هر منطقه محاسبه شدند. برای تجزیه داده‌های ژنتیکی ابتدا باندها امتیاز دهی گردیدند. در صورت تکثیر و 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 ریخت-سنجی 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 حداکثر برای ۲۶ صفت ریخت‌شناسی 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 ریخت‌شناسی به غیر از عرض سر

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR (-) 500 mM KCL and 200 mM Tris، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱۰ میلی‌مول از هر آغازگر، ۱۵۰ 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 (الحاق^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، Dye (Loading buffer) با غلظت ۶X به میزان ۱ μ l 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 ریخت‌شناسی و نتایج ژنتیکی از ۲۶ صفت ریخت‌شناسی استفاده شد. از آنجا که ویژگی‌های ریخت‌شناسی 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 اندازه‌ها 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 البوت استاندارد شدند (Elliott et al. 1995). استاندارد کردن داده‌های مورفومتریک تغییرات ناشی از رشد آلومتریک را کاهش خواهد داد (Karakousis et al. 1999).

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

¹ Denaturation

² Annealing

³ Extention

⁴ Gel documentation

⁵ Leven test for Equality of Variances

⁶ The multivariate generalization of the coefficient

جدول ۱- میانگین، انحراف معیار، حداقل و حداکثر صفات ریخت سنجی (بر

حسب میلی متر) سیاه ماهی *C. c. gracilis* در رودخانه تجن

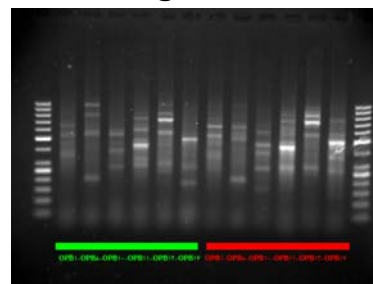
منطقه مورد مطالعه	بالا دست سد (ایستگاه اول)	پایین دست سد (ایستگاه دوم)
صفات مورد بررسی	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین
طول استاندارد	۹۷/۲۶۵±۱۵/۹۰۵	۱۰۵/۴۹۲±۲۹/۹۴۵
ارتفاع بدن	۲۳/۹۶۶±۱/۶۱۲	۲۶/۸۹۱±۱/۵۱۴
طول ساقه دم	۱۳/۷۴۴±۳/۳۲۷	۲۰/۲۴۰±۱/۲۵۵
ارتفاع ساقه دم	۱۱/۲۵۶±۰/۷۹۶	۱۱/۶۸۰±۰/۶۷۴
طول سر	۲۳/۶۱۱±۰/۸۶۸	۲۳/۹۰۴±۰/۷۶۶
عرض سر	۱۶/۴۴۵±۲/۹۷۶	۱۶/۳۳۴±۰/۹۹۸
ارتفاع سر	۱۷/۴۸۴±۰/۸۷۵	۱۷/۹۲۱±۰/۷۶۷
طول پوزه	۸/۷۷۸±۰/۷۰۳	۸/۷۱۱±۰/۷۶۶
قطر چشم	۴/۴۲۵±۰/۳۱۷	۴/۶۵۱±۰/۳۴۲
فاصله پشت چشم تا انتهای سرپوش آبش	۱۱/۵۸۳±۰/۸۲۴	۱۱/۹۷۷±۰/۴۸۲
فاصله بین دو حدقه چشم	۹/۶۶۳±۰/۵۶۱	۹/۹۳۷±۰/۵۴۴
طول فک بالایی	۷/۴۴۲±۰/۶۰۹	۷/۳۹۶±۰/۵۹۱
طول فک پایینی	۷/۱۷۰±۰/۷۲۸	۶/۶۶۰±۰/۵۹۲
فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه	۵۰/۰۱۴±۱/۷۸۴	۵۱/۶۴۲±۱/۸۱۷
فاصله انتهای باله پشتی تا انتهای باله دم	۵۹/۲۴۰±۱/۷۸۲	۶۱/۱۲۲±۳/۳۶۹
فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله منخرجی	۷۵/۷۲۷±۳/۱۶۸	۷۷/۳۲۵±۴/۶۴۲
فاصله انتهای باله منخرجی تا انتهای باله دم	۳۹/۸۷۷±۳/۳۸۵	۴۰/۴۷۴±۲/۴۳۶
طول باله پشتی	۲۰/۴۰۵±۱/۸۸۸	۲۱/۹۰۶±۱/۲۶۰
ارتفاع باله پشتی	۱۲/۸۵۲±۲/۳۰۳	۱۷/۶۶۴±۲/۴۱۴
پایه باله پشتی	۱۴/۲۰۰±۰/۹۶۲	۱۵/۷۸۰±۱/۱۵۱
طول باله منخرجی	۱۸/۰۲۴±۱/۸۶۸	۱۸/۰۱۱±۱/۳۶۷
ارتفاع باله منخرجی	۹/۶۲۰±۲/۱۱۷	۱۲/۲۹۷±۱/۷۷۹
پایه باله منخرجی	۸/۴۲۶±۱/۰۵۴	۸/۳۵۱±۰/۸۸۹
طول باله شکمی	۱۵/۹۴۹±۱/۰۸۶	۱۷/۳۳۵±۰/۹۱۳
طول باله سینه‌ای	۱۹/۳۱۹±۱/۱۸۲	۲۰/۶۵۷±۱/۱۰۴
فاصله بین بال‌های شکمی و سینه‌ای	۱۳/۲۵۷±۲/۰۸۴	۱۲/۳۰۵±۲/۶۸۲
ضریب تغییرات (C.V. p)	۱۳/۲۷۰۸۴	۱۴/۸۰۶۴۴

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

PCR

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدها	درصد GC	تعداد نشانگرهای پلی مورف (تعداد ستون‌های پلی مورف)
OPB1	5'-GTTTCGCTCC-3'	۶۰	۱۶
OPB8	5'-GTCCACACGG-3'	۷۰	۱۵
OPB10	5'-CTGCTGGGAC-3'	۷۰	۱۴
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	۶۰	۱۵
OPB12	5'-CCTTGACGCA-3'	۶۰	۱۴
OPB17	5'-AGGGAACGAG-3'	۶۰	۱۵
جمع	-	-	۸۹

دارای واریانس یکنواخت می باشند ($P \leq 0.05$). 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 می‌باشد را نشان می‌دهد. به منظور برقراری ارتباط بین نتایج ریخت سنجی و نتایج ژنتیکی از تجزیه تجزیه ارتباطی استفاده گردید. جدول ۳ و ۴ تجزیه داده‌های ریخت شناسی و مولکولی را با استفاده از روش رگرسیون گیری گام به گام نشان می‌دهد. در این جدول به عنوان مثال در مورد صفت ارتفاع باله پشتی ۲۹ نشانگر از ۸۹ نشانگر، کد کننده صفت مورد نظر بوده که نشانگر RAPD آن‌ها را تکثیر کرده است که این تعداد نشانگر (۲۹ نشانگر) حدود ۳۱ درصد تغییرات صفت مورد نظر را توجیه می‌کند. در جدول ۳ بیشترین تعداد نشانگر برای صفت ارتفاع باله پشتی (۲۹ نشانگر) و کمترین مربوط به ارتفاع بدن (۷ نشانگر) می‌باشد و همچنین بیشترین R^2 کل مربوط به طول استاندارد و کمترین مربوط به قطر چشم می‌باشد. این تجزیه نشان می‌دهد که ۷۷ نشانگر از ۸۹ نشانگر (۸۶/۵۱ درصد نوارهای پلی مورف)، رابطه معنی داری با ۱۸ صفت ریخت‌سنجی داشتند که از این بین ۹ نشانگر صفات بیشتری را کد می‌نمایند که بدین شرح می‌باشد.



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 (ژل ۱/۵ درصد آگار)

جدول ۳- تجزیه داده های صفات ریخت سنجی و داده های مولکولی با استفاده از روش رگرسیون گیری گام به گام

صفت	تعداد نشانگر (T)*	R ² (%)max*	R ² (%)T*
ارتفاع باله پستی	۲۹	۳۱/۱	۹۳/۸
ارتفاع باله مخرجی	۲۱	۱۵/۹	۷۲/۱
طول استاندارد	۲۰	۲۹/۶	۹۴/۳
پایه باله پستی	۱۴	۱۸/۵	۷۱/۹
قطر چشم	۱۱	۱۳/۵	۵۴/۱
ارتفاع ساقه دمی	۱۱	۱۳/۰	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	۲۳/۲	۳۷/۹
طول باله سینه ای	۴	۱۷/۷	۴۰/۳
فاصله پشت چشم تا انتهای سرپوش	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 پستی تا نوک پوزه	۳	۱۴/۲	۲۶/۹
فاصله انتهای باله پستی تا انتهای باله دمی	۳	۱۰/۷	۲۱/۱
طول باله پستی	۳	۱۲/۸	۲۶
پایه باله مخرجی	۳	۶/۱	۱۷/۳
فاصله بین باله های شکمی و سینه 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	.	.	.

* T: تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات ریخت سنجی، T adjusted R²: مجموع کل R² تعدیل شده نشانگرهای آگاهی بخش برای کل صفات ریخت سنجی، R² adjusted max: بیشترین R² تعدیل شده مربوط به یک نشانگر برای صفات ریخت شناسی

نشانگر ۳۷ با طول ۳۵۰ bp مربوط به آغازگر B10 دارای بیشترین R² (۳۱/۱ و ۲۸/۵) برای صفات ارتفاع باله پستی و ارتفاع بدن، نشانگر ۱۷ با طول ۱۰۰ bp مربوط به آغازگر B8 دارای بیشترین R² برای صفت ارتفاع باله مخرجی، نشانگر ۴۶ با طول ۱۰۰ bp مربوط به آغازگر B11 دارای بیشترین R² (۲۹/۶ و ۱۳) برای صفات طول استاندارد و ارتفاع ساقه دمی، نشانگر ۸ با طول ۸ bp مربوط به آغازگر B1 دارای بیشترین R² (۱۸/۵) برای صفت پایه باله پستی، نشانگر ۳۷ با طول ۴۰۰ bp مربوط به آغازگر B10 دارای بیشترین R² با توجه به این نتایج می توان گفت آغازگرهای B10 و B11 بیشتر از سایر آغازگرها در نواحی کد کننده صفات

ریخت سنجی قرار دارند و به همین دلیل تغییرات بیشتری را از صفات ریخت سنجی مورد بررسی نشان می دهند و نقش بیشتری در برقراری ارتباط بین نتایج دارند. همچنین می توان بیان نمود توالی آغازگرهای B10 و B11 در فرایندهای تکاملی سیاه ماهی بیشتر جا به جا شده اند و کپی های بیشتری از خود را در داخل ژنوم ایجاد کرده اند زیرا چند شکلی و میزان باند های بیشتری تولید کردند (که حاصل جا به جایی بیشتر در ژنوم می باشد). در این بررسی به علت عدم وجود اطلاعات کافی از توالی اولیه DNA سیاه ماهی، از نشانگر RAPD استفاده گردید. محققان بسیاری عنوان نمودند تکنیک RAPD بیش از سایر تکنیک ها می تواند جمعیت های ماهی را به زیر گونه، نژاد و حتی جمعیت های مشابه ماهی متمایز کند (Mamuris 1998). Bardakci and Skibinski (1994) بیان نمودند تکنیک RAPD بسیار حساس تر از تجزیه های دیگر مرتبط با mtDNA در مطالعات درون جمعیتی ماهیان می باشد. به طور کل ویژگی های ریخت شناسی ماهیان در مقایسه با سایر مهره داران بیشتر دچار تغییرات درون و بین گونه ای 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 می تواند به طور بالقوه تفکیک ریختی ماهیان را تعیین کند (Turan et al. 2008). در گذشته تصور می شد که تغییرات ریختی صرفاً ژنتیکی است. اما امروزه مشخص شده که منشأ این تغییرات هم محیطی و هم ژنتیکی است (Akbarzadeh et al. 2007). پژوهش های اخیر مشخص کرده است که اختلافات ریخت شناسی بین گروه های مختلف ماهیان الزاماً آن ها را از لحاظ ژنتیکی جدا نمی کند و در عوض در پاره ای از موارد تفاوت های ریخت شناسی صرفاً ناشی از محیط بوده و اختلافات ژنتیکی هیچ نقشی در آن ندارد (Swain and Foote 1999) بدین ترتیب نقش محیط به عنوان عامل اصلی تغییرات ریختی به اثبات رسیده است (Tudela 1999). در این مطالعه بر ویژگی های ریخت سنجی و ژنتیکی سیاه ماهی تمرکز شده است و با استخراج نشانگرهای مربوط به ۲۶ صفت ریخت سنجی فوق، این نتیجه حاصل می گردد که ۷۷ نشانگر از ۸۹ نشانگر RAPD (۸۶/۵۱ درصد نشانگرها) رابطه

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

میانگین مربعات					
صفت	منبع واریانس	df	RAPDmax	df	RAPDcom
ارتفاع باله پشتی	X (رگرسیون)	۱	۲۳۶/۹۱***	۲۵	۲۸/۳۱***
	Y (خطا)	۶۴	۷/۸۰	۴۰	۰/۷۰۳
ارتفاع باله مخرجی	X	۱	۶۲/۶۵۱***	۱۳	۲۱/۸۳***
	Y	۶۴	۴/۷۳۰	۵۲	۱/۵۶
طول استاندارد	X	۱	۲۷۲۸/۰۴***	۱۲	۶۹۰/۱۲***
	Y	۳۳	۱۷۷/۹۶	۲۲	۱۴/۵۲
پایه باله پشتی	X	۱	۲۲/۲۰***	۱۲	۷/۲۱***
	Y	۶۴	۱/۴۰	۵۲	۰/۴۸۶
قطر چشم	X	۱	۱/۱۵***	۹	۰/۵۲۴***
	Y	۶۴	۰/۱۰۴	۵۶	۰
ارتفاع ساقه دمی	X	۱	۵/۴۸**	۹	۲/۶۹***
	Y	۶۴	۰/۵۱۱	۵۶	۰/۲۴۹
طول باله مخرجی	X	۱	۱۸/۰۲*	۹	۱۱/۳۷***
	Y	۶۴	۲/۴۵	۵۶	۱/۲۹
عرض سر	X	۱	۲۶/۲۱**	۱۰	۱۸/۴۵***
	Y	۶۴	۴/۷۶	۵۵	۲/۶۶
ارتفاع بدن	X	۱	۸۸/۲۳***	۷	۲۷/۳۱***
	Y	۶۴	۳/۲۷	۵۸	۱/۸۳
طول ساقه دمی	X	۱	۲۹۵/۷***	۶	۱۳۸/۲***
	Y	۶۴	۱۷	۵۹	۹/۳۹
طول پوزه	X	۱	۳/۸۸*	۵	۲/۹۷***
	Y	۶۴	۰/۴۷۹	۶۰	۰/۳۲۸
طول باله شکمی	X	۱	۲۲/۵۶***	۴	۱۰/۰۸***
	Y	۶۴	۱/۱۴	۶۱	۰/۹۲۵
طول باله سینه ای	X	۱	۲۱/۴۹***	۴	۱۲/۴۷***
	Y	۶۴	۱/۴۳	۶۱	۱/۰۴
فاصله پشت چشم تا انتهای سرپوش	X	۱	۴/۵۸**	۴	۳/۳۱***
	Y	۶۴	۰/۴۳۸	۶۱	۰/۳۱۸
ارتفاع سر	X	۱	۵/۶۸**	۳	۴/۷۲***
	Y	۶۴	۰/۶۴۴	۶۲	۰/۵۲۸
فاصله بین دو حدقه چشم	X	۱	۲/۲۵*	۳	۱/۹۴***
	Y	۶۴	۰/۲۹۱	۶۲	۰/۲۴۲
فاصله ابتدای باله پشتی تا نوک پوزه	X	۱	۳۸/۹۹***	۳	۲۵/۳۲***
	Y	۶۴	۳/۳۱	۶۲	۲/۸۲
فاصله انتهای باله پشتی تا انتهای باله دمی	X	۱	۶۱/۲۳***	۳	۱۴/۸۲***
	Y	۶۴	۶/۹۶	۶۲	۶/۱۵
طول باله پشتی	X	۱	۲۹/۰۷**	۳	۲۰/۲۱***
	Y	۶۴	۲/۷۶	۶۲	۲/۳۴
پایه باله مخرجی	X	۱	۴/۶۶**	۳	۴/۳۳**
	Y	۶۴	۰/۸۹۰	۶۲	۰/۷۸۴
فاصله بین باله های شکمی و سینه ای	X	۱	۴۷/۲۹**	۳	۳۳/۱۴***
	Y	۶۴	۵/۱۷	۶۲	۴/۵۰
فاصله نوک پوزه تا ابتدای باله مخرجی	X	۱	۷۸/۲۳***	۲	۷۳/۱۶*
	Y	۶۴	۱۴/۸۷	۶۳	۱۴/۰۲
صول سر	X	۱	۴/۷۶*	۲	۳/۸۰**
	Y	۶۴	۰/۶۲۳	۶۳	۰/۵۸۸
طول فک پایینی	X	۱	۴/۸۷***	۱	۴/۸۷***
	Y	۶۴	۰/۴۳۷	۶۴	۰/۴۳۷
فاصله انتهای باله مخرجی تا انتهای باله دمی	X	۱	۵۴/۹۹***	۱	۵۴/۹۹***
	Y	۶۴	۸/۱	۶۴	۸/۱
طول فک بالایی	X	-	-	-	-
	Y	-	-	-	-

***خیلی معنی دار ($p \leq 0.01$)، **معنی دار ($p \leq 0.05$) و *معنی دار ($p \geq 0.05$)

RAPDmax: میانگین مربعات مربوط به یک نشانگر (ستون پلی مورف)؛ RAPDcom: میانگین مربعات همه نشانگر ها (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 دم، 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 معرفی می-گردند که این ۹ صفت با ۶۹ نشانگر از ۸۹ نشانگر RAPD (۷۷ درصد نشانگرها) رابطه معنی‌داری داشتند. همچنین باند هایی با طول ۵۰۰ - ۱۰۰ bp به عنوان باندهایی که بیشترین نقش را در برقراری ارتباط با این صفات دارند، معرفی می‌گردد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سیاه‌ماهی در رودخانه‌های مختلف از یکدیگر به دلیل جدایی جغرافیایی جدا شده‌اند (Samaee et al. 1982; Bianco and Banarescu 2006, 2009). 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 دانش ما را از ساختار جمعیتی سیاه‌ماهی بهبود 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.
Bardacki 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 ریخت‌سنجی جدول ۵ دارند ($P \leq 0.05$) 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 فنوتیپی 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 ریخت شناسی 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. به‌طورکلی ویژگی‌های ریختی تحت کنترل و در هم کنش دو عامل شرایط محیطی و ژنتیک 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 ریخت شناسی سریعاً در آن رخ دهد (Poulet 2004). نتایج تجزیه ارتباطی مشخص نمود که نشانگر

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 roughly (*Hoplostethus atanticus*) off the continental slope of Southern Australia. Journal of Fish Biology 46: 202-220.
Estoup A, Largiadier 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, Schuler 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.

Mittton 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 gorbusha*) 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 Portuguese 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 Darestani 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. *Iranal 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, Leiuperidae) 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 compoex inferred from mitochondrial 16s rDNA sequence data. *Acta zoological* 51: 1–14.

Welsh J, McClenlland 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, Yamasak 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.