



Original Research Paper

Genetic diversity of Round Goby (*Neogobius melanostomus*) of the coast of Golestan province using microsatellite molecular markers

Shiva Sheikh, Ali Shabani *, Roghiyeh Safari, Hadiseh Kashiri

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Key Words

Genetic diversity
Neogobius melanostomus
Molecular marker
Microsatellite
Golestan province

Abstract

Introduction: Genetic diversity is one of the most important and essential characteristics of any population for its survival. The study of genetic diversity in different aquatic populations in order to protect, sustain and manage their reserves is of particular importance.

Materials & Methods: In order to study the genetic structure of *Neogobius melanostomus*, which is a native species of brackish water in Iran, 90 samples were collected from Gomishan wetland, Gorgan River and Gorgan Bay in Golestan province and evaluated using Seven microsatellite loci. All applied loci showed polymorphism.

Results: The results showed that round goby has proper allelic diversity (mean number of alleles: 8.38) and heterozygosity (mean observed heterozygosity: 0.0762) in the studied areas. Of 21 loci-population tests, only 2 were in the Hardy-Weinberg equilibrium. Fst value as an indicator of genetic differentiation was 0.189. In this regard, the relatively high gene flow (283.7: Nm) could be considered as an important factor in the low genetic differentiation between the samples of the studied area. The observed gene flow is probably related to factors such as contamination, floods, and the species life history.

Conclusion: molecular analysis of variance also showed that most of the observed diversity is within populations. The highest similarity was observed between the samples of Gorgan River and Gorgan Bay.

* Corresponding Author's email: ali_shabany@yahoo.com

Received: 23 March 2023; Reviewed: 28 April 2023; Revised: 1 July 2023; Accepted: 3 August 2023

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.4.14

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع ژنتیکی گاوماهی دم گرد (*Neogobius melanostomus*) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

شیوا شیخ، علی شعبانی^{*}، رقیه صفری، حدیثه کشیری

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

تنوع ژنتیکی
گاوماهی دم گرد
نشانگر مولکولی
ریزماهواره
استان گلستان

چکیده

مقدمه: تنوع ژنتیکی یکی از مهم ترین و ضروری ترین ویژگی های هر جمعیت برای بقای آن است. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت های مختلف آبزیان به منظور حفاظت، پایداری و مدیریت ذخایر آن ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

مواد و روش ها: به منظور تعیین ساختار ژنتیکی گاوماهی دم گرد (*Neogobius melanostomus*) که از گونه های بومی آب شور ایران می باشد، تعداد ۹۰ قطعه ماهی از مناطق تالاب گمی شان، گرگان رود و خلیج گرگان واقع در استان گلستان جمع آوری و با استفاده از هفت جایگاه ریزماهواره ای مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام جایگاه های مورد استفاده چندشکلی نشان دادند.

نتایج: نتایج نشان داد که گاوماهی دم گرد از غنای اللی (میانگین تعداد ال: ۸/۳۸) و هتروزیگوسیتی مناسبی (میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده: ۰/۰۷۶) در مناطق مورد بررسی برخوردار است. از ۲۱ تست جایگاه ژنی-جمعیت، تنها ۲ تست در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند. میزان F_{st} به عنوان شاخص تمایز ژنتیکی ۰/۱۸۹ به دست آمد. در این خصوص جریان ژنی نسبتاً بالای مشاهده شده ($Nm: ۷/۲۸۳$) را می توان به عنوان عامل مهمی در تمایز ژنتیکی پایین به دست آمده بین نمونه های مناطق مورد بررسی در نظر گرفت. جریان ژنی مشاهده شده می تواند مرتبط با عواملی هم چون: آلودگی ها، سیلاب ها و تاریخچه زندگی گاوماهی دم گرد می باشد.

بحث و نتیجه گیری: آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که بخش عمده تنوع مشاهده شده مربوط به درون جمعیت ها بوده و بالاترین میزان شباهت بین نمونه های مناطق گرگان رود با خلیج گرگان رود مشاهده شد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۳ فروردین ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۸ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۱۰ تیر ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۲ مرداد ۱۴۰۲
(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.4.14

مقدمه

مطالعه تغییرات در جوامع، مشخص کننده وسعت تنوع ژنتیکی می باشد (۱). تنوع ژنتیکی یکی از مهم ترین و ضروری ترین ویژگی های هر جمعیت برای بقای آن است. مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت های مختلف آبزیان به منظور حفاظت، پایداری و مدیریت ذخایر آن ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۲). فعالیت های انسانی که سبب مهاجرت ماهیان می گردند نظیر: اصلاح زیستگاه ها، پیوند زدن ذخایر غیربومی به داخل ذخایر بومی، معرفی نژادهای پرورشی و صید بی رویه، باعث تغییراتی در تنوع ژنتیکی یک جمعیت می گردند. عدم تنوع ژنتیکی می تواند در اثر به گزینی طولانی مدت و از بین رفتن هتروزیگوسیتی به دلیل آمیزش خویشاوندی و یا جداسازی جمعیت ها باعث کاهش بقای یک جمعیت گردد. از خطرات اصلی در زیر جمعیت های ماهیان، آمیزش خویشاوندی و پیشامد ژنتیکی می باشد که منجر به تثبیت ژن ها و از بین رفتن قابلیت زیست و باروری و مقاومت به بیماری می گردد و در نهایت نیز از بین جمعیت های بومی را موجب می گردد؛ لذا بهتر آن است که گروه های مجزایی از ماهیان به عنوان یک ذخیره ژنتیکی در نظر گرفته شوند و به طور جداگانه کنترل گردند (۱). در زمینه منابع دریایی، تنوع ژنتیکی برای مدیریت و حفاظت آن ها امری حیاتی است و پیش نیازی برای حفظ سازگاری جمعیت با تغییر شرایط محیطی در نظر گرفته می شود (۳). تنوع ژنتیکی در بین گونه ها (بین جمعیت ها و در میان افراد جمعیت) به عنوان بخشی از تنوع زیستی، نتیجه تفاوت در سطوح مختلف (نوکلئوتید، ژن، کروموزوم و ژنوم) می باشد (۴)؛ در واقع تنوع ژنتیکی جزئی کلیدی در تنوع زیستی بوده و اطلاعات مهمی برای زیست شناسی تکاملی و حفاظت را نشان می دهد. داده های توالی DNA منابع اولیه اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی بوده که در پایگاه های بین المللی ذخیره شده و مدیریت می شوند (۵). کاهش تنوع ژنتیکی ممکن است منجر به کاهش بقا جمعیت و افزایش احتمال انقراض، به ویژه برای جمعیت با شرایط محیطی پرفشار شود (۶، ۷، ۸). گاو ماهی دم گرد (*Neogobius melanostomus*) یکی از گونه های مهم اکولوژیکی است که در آب های شیرین، لب شور و شور زیست نموده (۹) و بومی بخش مرکزی اوراسیا، از جمله دریاهای سیاه و خزر می باشد. این ماهی، جمعیت های غیربومی بزرگ در دریای بالتیک، چندین رودخانه بزرگ اوراسیا و دریاچه های بزرگ آمریکای شمالی را ایجاد کرده است (۱۰). این ماهی بومی دریای خزر و رودهای آن نظیر: قره سو، گرگان رود، سفید رود از دهانه تا سد سنگر، تالاب گمیشان، تنکابن، پارک ملی گلستان می باشد. پراکنش این ماهی در سایر نقاط جهان مانند: اقیانوس اطلس، دریای سیاه، دریای مرمره، رودخانه های بالکان، رودخانه باگ،

رودخانه ها و دریاچه های مرکزی ترکیه، رود دانوب، دنستر، دنیپر، دون، رود کوبان، رود ساراتا، دریای آزو، رود اورال، رود ولگا می باشد؛ هم چنین به اکوسیستم هایی مانند رود ویستولا، رود آلب، دریای آرال، دریای بالتیک و ... معرفی شده است. این ماهی از لحاظ اقتصادی به دلیل اندازه نسبتاً بزرگ در بعضی کشورها به ویژه حاشیه دریای آزوف، ارزش صید تجاری بوده و غذایی مناسب برای برخی گونه های بارزش مثل تاس ماهیان است. این ماهی در کشور آذربایجان ۸۸ درصد صید گاو ماهیان را تشکیل می داده است، در سال های اخیر در شمال دریای خزر ۳۵ تا ۵۰ تن صید شده که این میزان، کاهش شدیدی را نسبت به سال های قبل نشان می دهد (۱۱). واژه ریزماهوره در سال ۱۹۸۵ توسط Jeffy مطرح گردید و مفهوم آن، توالی کوتاه تکرار شونده در ژنوم موجودات می باشد. علت اصلی کاربرد این نشانگرها قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه تحلیل های جمعیتی و هم چنین مطالعات اکولوژیکی می باشد؛ نشانگرهای ریزماهوره دارای مزایای متعددی بوده، چراکه دارای توارث هم بارز بوده و از توارث ساده مندلی تبعیت می کنند؛ به علاوه در ژنوم موجودات به فراوانی یافت می شوند و پراکندگی آن ها نیز در سطح ژنوم موجودات عالی یکنواخت می باشند؛ هم چنین چندشکلی بالایی داشته. علاوه بر این توانایی آن ها در تشخیص میان افراد، در صورت استفاده از ترکیبی از جایگاه ها، این تکنیک را در مطالعه جریان ژنی و تعیین هویت بسیار توانمند ساخته است. جهت انجام آزمایش نشانگرهای ریزماهوره به مقدار بسیار کمی DNA نیاز داشته و به وسیله واکنش زنجیری پلیمرز قابل تکثیر می باشند؛ به علاوه امتیازدهی آن ها آسان و دقیق است و در نهایت قابلیت استفاده از نشانگرهای گونه های بسیار نزدیک دیگر وجود دارد (۱۲). در واقع ریزماهوره ها توالی هایی از یک قطعه اصلی (۶-۱ جفت باز) می باشند که چندین بار در کنار هم تکرار شده اند. اگر این تکرارها به اندازه کافی بلند و پشت سر هم باشند، به علت پلی مورفیسم بالا نشانگرهای ژنتیکی خوبی خواهند بود. ریزماهوره ها دارای مزایای زیادی می باشند. تعداد زیاد آلل ها در هر جایگاه ریزماهوره باعث می شود که این نشانگرها نسبت به هر نشانگری ارزش PIC (Polymorphic information content) بیش تری داشته باشند و در بررسی های اخیر ژنتیکی، یک به عنوان یک نشانگر رایج محسوب می شوند. مزیت نشانگرهای مولکولی را می توان براساس ظرفیت اطلاعات پلی مورفیک آن ها (PIC) سنجید. PIC به ارزش یک نشانگر جهت شناسایی پلی مورفیسم اشاره می کند و به تعداد آلل های شناسایی شده و فراوانی آن ها بستگی دارد (۱۳). تنوع در توالی DNA می تواند در مکان های خاص با روش هایی که تحت تاثیر جهش نیستند ایجاد شود. این توالی ها ممکن است خیلی کوچک (از ۱ تا ۱۰ bp) یا مقداری بزرگ تر باشند، اما ویژگی کلیدی این توالی های

۳۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد بر روی بن ماری قرار گرفتند و در مرحله نهایی به هر نمونه ۱۰۰ ماکرولیت آب اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده شدند. واکنش زنجیره پلیمرز با استفاده از پرایمر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آغازگر ۱٪ و ژل پلی اکریل آمید ۸٪ مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی در ۲۰- درجه سانتی گراد تا واکنش PCR ذخیره گردید. ۷ جفت آغازگر ریزماهورای Ame 24, Ame 23, Nme 10, Nme 8, Nme 3, Nme 1 و NG 92 (جدول ۱)، برای تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی گاوماهی دم گرد انتخاب شدند. واکنش PCR با استفاده از یک سیستم چرخه حرارتی با حجم واکنش ۱۲/۵ ماکرولیت انجام شد. شرایط واکنش زنجیره پلیمرز برای آغازگرهای Nme در حجم ۲۰ ماکرولیت در دستگاه ترموسایکلر (مدل MJ Mini™) در چرخه های دمایی، ۹۴ درجه برای ۱ دقیقه (وا سرشته شدن اولیه)، ۹۴ درجه برای ۱۵ ثانیه (وا سرشته شدن)، ۴۸-۵۵ درجه برای ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه با تعداد ۳۰ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۲ دقیقه و برای آغازگرهای Ame و NG در چرخه های دمایی، ۹۴ درجه برای ۲ دقیقه (وا سرشته شدن اولیه)، ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه (وا سرشته شدن)، ۶۰-۵۸ درجه برای ۱ دقیقه (الحاق)، ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه برای گونه گاوماهی دم گرد انجام گرفت (۱۸). واکنش PCR با استفاده از مستر میکس با غلظت مصرفی ۱۰ ماکرولیت، ۱ ماکرولیت فوروارد، ۱ ماکرولیت ریورس، ۶ ماکرولیت آب مقطر تزریقی و میزان غلظت ۲ ماکرولیت DNA نمونه انجام شد. قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره پلیمرز روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ (۱:۲۹) اکریل آمید. بیس اکریل آمید، بافر TBE 10X، Acril، APS، TEMED و آب مقطر تزریقی (غیردنا توره در الکتروفورز عمودی بارگیری و سپس ژل آماده شده با استفاده از نیترا ت نقره (۱۹) رنگ آمیزی گردید. ژل در ولتاژ ۲۲۰ و به مدت ۴ ساعت بارگیری شد. تصویر ژل مورد نظر با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل (مدل HOEFER- UVIF20) تهیه و اندازه قطعات با استفاده از نرم افزار GelAnalyzer محاسبه گردید. شاخص های تنوع شامل: تعداد آلل واقعی، تعداد آلل موثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، شاخص شانون و تعادل هاردی-واینبرگ در برنامه ژن الکس (ورژن ۶/۳) اندازه گیری شد.

تکراری این است که تعداد تکرارها بین افراد می تواند خیلی متفاوت باشد (۱۴). این نظریه وجود دارد که افزایش یا کاهش در تعداد تکرارها در طی کپی شدن، به وسیله نوترکیبی یا لغزش رونویسی رخ می دهد و این فرآیندها نه تنها مستقل از جهش های نقطه ای هستند بلکه با سرعت بیش تری نیز رخ می دهند. تنوع در تعداد تکرارها در این لکوس ستلایت (واحد های تکرار شونده ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ bp) مینی ستلایت (واحد های تکرار شونده ۵ تا ۱۰۰ bp) یا میکروستلایت (واحد های تکرار شونده ۲ تا ۴ bp) می تواند در جمعیت ها بسیار گسترده بوده و وسیله بسیار مفیدی برای تحقیق در تغییرات ژنتیکی جمعیت در گذشته های نزدیک فراهم کند (۱۵). خصوصاً در حال حاضر مارکرهای میکروستلایت به دلیل این که: هم بارز هستند (هر دو آل قابل تشخیص هستند)؛ بنابراین می توانند تحت مدل هاردی واینبرگ مورد آنالیز قرار بگیرند، از طرفی به عنوان DNA غیرقابل ترجمه می توانند به عنوان نمونه هایی که تحت فشار به گزینی نیستند مورد توجه قرار گیرند، به علت تعداد بالای آل و لکوس در هر جایگاه و حداقل به دلیل این که توالی یاب اتوماتیک DNA می تواند در لکوس میکروستلایت برای تعیین ژنوتیپ مورد استفاده قرار گیرد به طور فزاینده ای تعداد نمونه هایی که می تواند مورد بررسی قرار بگیرد را افزایش می دهد (۱۶).

مواد و روش ها

۹۰ قطعه گاوماهی دم گرد صید شده طی زمستان ۱۴۰۰ تا بهار ۱۴۰۱ از سواحل جنوب شرقی دریای خزر در استان گلستان (گرگان رود ۳۰ قطعه، (خلیج گرگان ۳۰ قطعه) و (تالاب گمیشان ۳۰ قطعه) به وسیله قلاب جمع آوری و سپس نمونه ها جهت انجام مراحل آزمایش در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شده و به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبیان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند. برای انجام تحقیق از باله پشتی ماهیان صید شده به وسعت تقریبی ۱×۱ سانتی متر از هر نمونه جدا و به طور جداگانه در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی اتانول ۹۶ درصد قرار گرفت. تمام DNA ژنومی از بافت های باله با استفاده از روش فنل کلروفرم (۱۷) طبق پروتکل سازنده استخراج شد. طی این روش باله ماهی خرد شده و به آن ۵۰۰ ماکرولیت فنول اضافه و سپس ۵۰۰ ماکرولیت الکل خالص اضافه کرده و ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله به نمونه ها ۱۰۰ ماکرولیت الکل ۷۰ درصد اضافه و دو دقیقه سانتریفیوژ کرده و در مرحله آخر ابتدا

جدول ۱: توالی و مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای گاوماهی دم گرد (*N. melanostomus*)

Locus (Reference)	GenBank accession no.	Primer sequence (5'-3')	Allele ranges	Annealing (°C)
Nme 01 (۲۰)	DQ999976	F: CGA GCG CTA AAA TAG AAG AAA A R: TCC AGT GGC TTG AGT GAT GT	212-340	48
Nme 03 (۲۰)	DQ999978	F: GCG GGA GTC AAG AAT TGA AC R: TTG TTA GAA TGT ATT ATG CCA TAG CC	124-176	48
Nme 08 (۲۰)	DQ999983	F: ATG GAG TTT CTG GGC AGT TG R: CTC CGT CGA TTG TGT TCT GA	271-285	55
Nme 10 (۲۰)	DQ999985	F: GCG ATT ATG AGG TTC GGA GA R: ATC AGC AAC CCC TGA ACA GA	267-287	48
Ame 23 (۲۱)	EU732740	F: AAA GCA TCA GCA GCA GTT GT R: TAT GTG AGT GTG CGG ATG GT	159-318	58
Ame 24 (۲۱)	EU732741	F: CTC GAA AAC TTA GCA GTG CAG R: TCA ATG CGC CTC TAC TCT ACT C	191-287	58
NG 92 (۲۲)	EF029939	F: AAG CAA CTC ACG CCA AAG TC R: AGT GCT GCC ATG TCA ATC TG	185-197	60

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم افزار ۶.۳ GenAlex (۲۳) به منظور

ارزیابی تعداد ال موثر، تعداد ال در هر جایگاه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، جریان ژنی، نحوه توزیع تنوع مشاهده شده، شاخص Fst بر اساس مدل الی بی نهایت (IAM) با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی استفاده شد. بررسی جمعیت ها از نظر انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ با مقایسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و عدم تعادل پیوستگی با نرم افزار ۳.۱ Genepop (۲۴) صورت گرفت؛ هم چنین از نرم افزار 2.9.3 FSTAT (۲۵) جهت بررسی علت انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ، شاخص FIS به عنوان ضریب درون آمیزی (کاهش یا افزایش هتروزیگوسیتی) و سطح معنی داری آن استفاده شد. از نرم افزار ۱.۳۱ PopGene (۲۶) نیز جهت تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی براساس مقادیر فاصله ژنتیکی استفاده گردید.

نتایج

در این تحقیق، هر هفت جایگاه مورد مطالعه چندشکلی نشان دادند. تعداد ال های واقعی و موثر و هم چنین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۲ آورده شده است. متوسط تعداد ال های واقعی و موثر به ترتیب ۸/۳۸۱ و ۵/۶۷۴ بود که در این میان بالاترین میزان ال های واقعی (Na:۱۸) و موثر (Ne:۱۳/۳۳۳) در جایگاه Nme1 در نمونه های تالاب گمیشان مشاهده شد؛ هم چنین پایین ترین میزان ال های واقعی در جایگاه گرگان رود (Na:۴) و ال های موثر در منطقه تالاب گمیشان (Ne:۲/۵۲۵) در سطح جایگاه Nme3 به دست آمد. میانگین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) نیز به ترتیب ۰/۷۶۲ و ۰/۷۸۶ به دست آمد. میانگین ال های خاص در نمونه های مربوط به تالاب گمیشان،

گرگان رود و خلیج گرگان نیز به ترتیب ۱۵/۵، ۱۱/۶۶ و ۱۰/۵ به دست آمد. اطلاعات مربوط به ال های خاص بر حسب جمعیت های مورد بررسی در جدول ۳ آورده شده است. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ نیز در سطح جایگاه-جمعیت مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). در اغلب جایگاه ها انحراف از تعادل بالایی در سطح سه منطقه مورد بررسی مشاهده شد بین ۲۱ تست ممکن (۳ منطقه ۷× جایگاه) تنها ۲ تست شامل جایگاه های Nme10 (تالاب گمیشان) و Ame24 (تالاب گمیشان) در تعادل قرار داشتند. در بررسی شاخص درون آمیزی متوسط FIS، ۰/۰۲۶ به دست آمد. در بیش تر جایگاه های مورد بررسی نیز افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شد (جدول ۲). عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) نیز بین هیچ یک از جایگاه های مورد استفاده مشاهده نشد. در بررسی جریان ژنی بین مناطق مورد تحقیق، متوسط شاخص Nm، ۷/۲۸۳ به دست آمد که بالاترین و پایین ترین جریان به ترتیب بین مناطق گرگان رود با تالاب گمیشان (۸/۲۳۷) و خلیج گرگان با گرگان رود (۵/۸۳۱) مشاهده شد (جدول ۴). تمایز ژنتیکی بین نمونه های مناطق مورد نظر نیز با بررسی شاخص Fst ارزیابی گردید. متوسط شاخص Fst، ۰/۰۶۳ بود که بالاترین مقادیر بین نمونه های متعلق به گرگان رود و تالاب گمیشان به دست آمد (جدول ۵). نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی درون جمعیت ها وجود دارد (۰/۸۲). در بررسی شاخص های شباهت و فاصله ژنتیکی، بالاترین و پایین ترین میزان فاصله به ترتیب بین نمونه های گرگان رود با تالاب گمیشان (۰/۷۳۵) و خلیج گرگان با گرگان رود (۰/۵۲۷) مشاهده گردید.

جدول ۲: پارامترهای تنوع ژنتیکی برای هفت جایگاه ریزماهورهای در گونه *N. melanostomus*

رودخانه/جایگاه	Nme1	Nme3	Nme8	Nme10	Ame23	Ame24	NG92
تالاب گمیشان	۱۸/۰۰۰	۵/۰۰۰	۵/۰۰۰	۸/۰۰۰	۶/۰۰۰	۱۱/۰۰۰	۸/۰۰۰
	Ne	۱۳/۳۳۳	۲/۵۲۵	۴/۲۶۵	۳/۳۶۴	۳/۷۴۲	۶/۰۰۰
	Ho	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
	He	۰/۹۲۵	۰/۶۰۴	۰/۷۶۶	۰/۷۰۳	۰/۷۳۳	۰/۸۳۳
	pHw	***	***	***	ns	ns	***
	FIS	-۰/۰۸۱	-۰/۶۵۶	-۰/۳۰۶	-۰/۴۲۳	-۰/۳۶۵	-۰/۲۰۰
گرگان رود	۱۲/۰۰۰	۷/۰۰۰	۴/۰۰۰	۹/۰۰۰	۵/۰۰۰	۱۳/۰۰۰	۱۰/۰۰۰
	Ne	۶/۱۶۴	۵/۵۷۳	۳/۳۸۳	۵/۰۷۰	۲/۶۰۵	۵/۴۲۲
	Ho	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
	He	۰/۸۳۸	۰/۸۲۱	۰/۷۰۴	۰/۸۰۳	۰/۶۱۶	۰/۸۱۶
	pHw	***	***	***	***	***	***
	FIS	-۰/۱۹۴	-۰/۲۱۹	۱/۰۰۰	-۰/۲۴۶	-۰/۶۲۳/	-۰/۲۲۶
خلیج گرگان	۱۰/۰۰۰	۷/۰۰۰	۵/۰۰۰	۱۱/۰۰۰	۶/۰۰۰	۷/۰۰۰	۹/۰۰۰
	Ne	۸/۴۹۱	۵/۲۳۳	۲/۹۰۳	۹/۹۴۵	۴/۶۳۹	۶/۷۱۶
	Ho	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰
	He	۰/۸۸۲	۰/۸۰۹	۰/۶۵۶	۰/۸۹۹	۰/۷۸۴	۰/۸۵۱
	pHw	***	***	***	***	***	***
	FIS	-۰/۱۳۴	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	-۰/۱۱۲	۱/۰۰۰	-۰/۱۷۵
میانگین	۱۳/۳۳۳	۶/۳۳۳	۴/۶۶۷	۹/۳۳۳	۵/۶۶۷	۱۰/۳۳۳	۹/۰۰۰
	Ne	۹/۳۲۹	۴/۴۴۳	۳/۵۱۷	۶/۱۲۷	۳/۶۶۲	۶/۰۴۶
	Ho	۱/۰۰۰	۰/۶۶۷	۰/۳۳۳	۱/۰۰۰	۰/۶۶۷	۱/۰۰۰
	He	۰/۸۸۲	۰/۷۴۴	۰/۷۰۹	۰/۸۰۲	۰/۷۱۱	۰/۸۳۳
	FIS	-۰/۱۳۶	۰/۰۴۲	۰/۵۶۵	-۰/۲۶۰	۰/۰۰۴	۰/۰۱۵

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

جدول ۳: میزان ال‌های خاص در رودخانه‌های مورد بررسی

منطقه	جایگاه	ال	فراوانی
تالاب گمیشان	Nme1	۱۳	۰/۰۶۷
تالاب گمیشان	Nme1	۱۴	۰/۰۱۷
تالاب گمیشان	Nme1	۱۵	۰/۰۱۷
تالاب گمیشان	Nme1	۱۶	۰/۰۵۰
تالاب گمیشان	Nme1	۱۷	۰/۰۱۷
تالاب گمیشان	Nme1	۱۸	۰/۰۱۷
گرگان رود	Ame24	۱۲	۰/۰۱۷
گرگان رود	Ame24	۱۳	۰/۰۱۷
گرگان رود	NG92	۱۰	۰/۰۸۳
خلیج گرگان	Nme10	۱۰	۰/۱۰۰
خلیج گرگان	Nme10	۱۱	۰/۰۱۷

جدول ۴: جریان ژنی (Nm) بین مناطق مورد بررسی

مناطق نمونه‌برداری	تالاب گمیشان	گرگان رود	خلیج گرگان
تالاب گمیشان	۰/۰۰۰		
گرگان رود	۸/۲۳۷	۰/۰۰۰	
خلیج گرگان	۷/۷۸۱	۵/۸۳۱	۰/۰۰۰

جدول ۵: تمایز ژنتیکی بین مناطق مورد بررسی

مناطق نمونه‌برداری	تالاب گمیشان	گرگان رود	خلیج گرگان
تالاب گمیشان	۰/۰۰۰		
گرگان رود	۰/۰۷۳	۰/۰۰۰	
خلیج گرگان	۰/۰۶۶	۰/۰۵۰	۰/۰۰۰

بحث

تنوع ژنتیکی به عنوان شاخص مهمی از وضعیت اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی مطرح بوده (۲۷) که آگاهی از آن جهت مدیریت و حفظ ذخایر ماهیان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در این راستا، پیراسنجه‌های مرتبط با تنوع ژنتیکی هم چون غنای الی و هتروزایگوسیتی از نظر مواجهه جمعیت‌ها با تغییرات محیطی بسیار مهم بوده (۲۸) و بر ویژگی‌های مهمی هم چون توانایی رقابت، بقا و اندازه بدن تاثیرگذار می‌باشد (۲۹) به‌طوری‌که کاهش تعداد الل‌های مشاهده شده در سطح جمعیت‌ها می‌تواند بیانگر کاهش سطح تنوع ژنتیکی (۳۰) و بالا بودن آن بیانگر بزرگ بودن اندازه موثر جمعیت باشد. هتروزایگوسیتی نیز شاخص بسیار مهمی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بوده و در مطالعات ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش بسیاری دارد زیرا، هر هتروزایگوت ناقل الل‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (۳). Dewoody و Avise، در ارزیابی تنوع ریزماهورهای ۷۸ گونه مختلف آب شیرین، رود کوچ و دریایی نشان دادند که روند کاهشی از نظر غنای الی و هتروزایگوسیتی به‌ترتیب از ماهیان دریایی به رود کوچ و سپس آب شیرین وجود دارد (۳۱). در تحقیق حاضر، میانگین الی و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب ۸/۳۸۱ و ۰/۷۶۲ به‌دست آمد که کمی بالاتر از مقادیر گزارش شده برای ماهیان آب شیرین (میانگین الی و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به ترتیب: ۵/۷ و ۴۶/۰) توسط Dewoody و Avise (۳۱) می‌باشد؛ بنابراین با توجه به میزان الل و هتروزایگوسیتی به‌دست آمده در تحقیق حاضر و مقایسه آن با مقادیر گزارش شده برای ماهیان آب شیرین می‌توان بیان داشت که گاوماهی دم‌گرد از غنای الی و هتروزایگوسیتی مناسبی در مناطق مورد بررسی برخوردار است. همواره انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت‌های طبیعی ماهیان زیاد دیده می‌شود (۳۲). در تحقیق حاضر، تنها ۲ تست از ۲۱ تست ممکنه (۷ جایگاه $\times$ ۳ جمعیت) در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ می‌تواند ناشی از عوامل متعددی هم چون: اندازه کوچک نمونه، اشتباه در خواندن و تفسیر الل‌ها مانند وجود الل‌های نول (۳۳)، مهاجرت، رانش ژنتیکی و به‌گزینی (۳۴) باشد. در پژوهش حاضر کسری هتروزایگوسیتی معنی‌داری در سطح جایگاه Nme8 مشاهده شد. دلایل زیستی کسری هتروزایگوسیتی به خوبی شناخته نشده و عوامل بسیاری هم چون: درون آمیزی و الل‌های نول در بروز چنین کسری دخیل می‌باشند (۳). به هر حال، یک عامل به تنهایی نمی‌تواند علت انحراف از تعادل را نمایان سازد و عوامل مختلفی می‌توانند در بروز این انحراف موثر باشند. در این خصوص، متوسط شاخص FIS، بالاتر از صفر (۰/۰۲۶) به‌دست آمد

که می‌تواند حاکی از آمیزش خویشاوندی و اختلاط جمعیت‌ها باشد (۲۶). این امر به‌عنوان مسئله‌ای مهم در جمعیت‌های ماهیان مطرح بوده که افزایش آن در دراز مدت می‌تواند منجر به کاهش هتروزایگوسیتی، کاهش مقاومت و بقا و در معرض خطر قرار گرفتن جمعیت‌های بومی شود (۱). تمامی عوامل ذکر شده در کنار جریان ژنی مشاهده شده (میانگین: ۷/۲۸) می‌تواند علت انحراف از تعادل مشاهده شده را توجیه نماید. هم‌چنین در این بررسی در بیش‌تر جایگاه‌های مورد استفاده افزایش هتروزایگوسیتی مشاهده شد که این افزایش تنها در مورد جایگاه Nme10 معنی‌دار بود. انحراف ژنتیکی تصادفی و خطای PCR را می‌توان از عوامل احتمالی این افزایش مطرح نمود (۳۵). با توجه به این که شرایط PCR برای جایگاه‌های مورد استفاده بهینه بود، انحراف ژنتیکی تصادفی را می‌توان به‌عنوان عامل اصلی افزایش هتروزایگوسیتی در نظر گرفت. طبق تقسیم‌بندی Wright، مقادیر F_{st} ۰-۰/۵، ۰/۰۵-۰/۱۵ و ۰/۱۵-۰/۲۵ به‌ترتیب نشان‌دهنده سطح پایین، متوسط و بالای تمایز ژنتیکی می‌باشد (۳۶). در مطالعه قبلی صورت گرفته روی گاوماهی خزری (*Neogobius caspius* Eichwald, 1831) در سواحل انزلی و بندرترکمن میزان شاخص F_{st} ۰/۱۴۷ به‌دست آمد که نشان از تفاوت جمعیت‌های مورد بررسی بود (۳۷). هم‌چنین در پژوهشی دیگر توسط Porgholam و همکاران، شاخص F_{st} ۰/۰۳۴ بین نمونه‌های گاوماهی سرگنده (*Neogobius gorlap*) سواحل مازندران و گلستان گزارش شد (۳۸). در تحقیق حاضر نیز متوسط شاخص F_{st} ۰/۰۶۳ به‌دست آمد. اگرچه میزان F_{st} مشاهده شده در محدوده تمایز پایین قرار دارد اما، می‌تواند بیانگر تمایز ژنتیکی مهمی باشد (۳۹). پایین بودن میزان تمایز بین جمعیت‌ها نشان‌دهنده وجود جریان ژنی قابل توجه می‌باشد (۴۰). در این تحقیق میانگین شاخص جریان ژنی (Nm)، ۷/۲۸۳ به دست آمد که در این میان بالاترین میزان جریان بین نمونه‌های گرگان‌رود و تالاب گمیشان مشاهده شد. احتمال می‌رود جریان ژنی مشاهده شده مرتبط با تاریخچه زندگی این گونه در راستای گسترش الل‌های سودمند بین جمعیت‌ها و افزایش سازگاری به تغییرات محیطی نیز باشد. ممکن است شباهت ژنتیکی مشاهده شده بین جمعیت‌ها ناشی از یک اثر بنیانگذار معمول باشد که این الگوی تاریخی تا به امروز هم ادامه داشته است زیرا، جریان ژنی بالا می‌تواند از تحلیل آن از طریق رانش، جلوگیری نماید. از طرفی ممکن است زمان کافی از هنگام کلونیزه شدن تا رسیدن به تعادل مهاجرت-رانش ژنتیکی سپری نشده باشد چرا که به‌دنبال یک رویداد فاندینگ تا رسیدن به تعادل ده‌ها تا صدها نسل نیاز است (۴۱، ۴۲). به هر حال، میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها بر اساس F_{st} ممکن است بالاتر از حد برآورد گردد چرا که احتمال دارد شباهت مشاهده شده ناشی از

9. **Porbiri, A., Abbasi, K., Sarpanah, A. and Porgholami, A., 2008.** Population of sand goby (*Neogobius fluviatilis pallas*) in southwest coasts of the Caspian Sea using morphological characteristics. Iranian Scientific Fisheries Journal. 18(2): 81-90. (In Persian)
10. **Kornis, M., 2012.** Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications." Journal of fish biology 80(2): 235-285.
11. <http://www.fishbase.ir/species/inland/Neogobius-melanostomus.html> accessed 23 May 2022)
12. **O'reilly, P. and Wright, J.M., 1995.** The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. Journal of fish biology 47: 29-55.
13. **Liu, Z.J. and Cordes, J., 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238(1-4): 1-37.
14. **Beaumont, A. and Hoare, K., 2003.** Genetic considerations in the hatchery. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture; Beaumont, A.R. and Hoare, K., Eds. 73-90.
15. **Avisé, J., 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. -ny; london: Chapman and hall. 511 p.
16. **Carvalho, G. and Hauser, L., 1995.** Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J., (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries, London, Chapman and Hall.
17. **Hillis, D., 1996.** Nucleic acids IV: sequencing and cloning. Molecular systematics. 321-381.
18. **Rezaei, M., 2011.** Microsatellites reveal weak genetic differentiation between *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) populations south of the Caspian Sea. Animal Biology. 61(4): 469-483.
19. **Benbouza, H., 2006.** Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnologie, agronomie, société et environnement. 10(2).
20. **Dufour, B.A., 2007.** Ten polymorphic microsatellite markers in the invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) and cross-species amplification. Molecular Ecology Notes. 7(6): 1205-1207.
21. **Feldheim, K.A., 2009.** Microsatellite loci for Ponto-Caspian gobies: markers for assessing exotic invasions. Molecular Ecology Resources. 9(2): 639-644.
22. **Vyskočilová, M., 2007.** Isolation and characterization of microsatellites in *Neogobius kessleri* (Perciformes, Gobiidae) and cross-species amplification within the family Gobiidae. Molecular Ecology Notes. 7(4): 701-704.
23. **Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006.** Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6(1): 288-295.
24. **Raymond, M., 1995.** Genepop (version 3.1 d): An updated version of Genepop (v. 1.2) described in: Raymond, M. and Rousset, F. Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity. 86: 248-249.
25. **Goudet, J., 2001.** Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
26. **Yeh, F.C., 1999.** Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Popgene Ver. 1. 31.

اجداد آن‌ها باشد؛ مثلاً هنگامی که میزان F_{st} پایین است احتمالاً جریان ژنی بالایی برآورد خواهد شد، درحالی که در واقع ممکن است تعداد کمی از افراد جمعیت‌ها مبادله شوند (۴۳). به هر حال، با توجه به این که توانایی لاروها، بچه ماهیان و ماهیان بالغ در نرخ مهاجرت این ماهیان به خوبی شناخته نشده، نیاز به تحقیقات بیش تری در آینده به‌ویژه در زمینه بیولوژی، الگوها و نرخ پراکنش آن‌ها می‌باشد. در این خصوص روش‌های فیلوجغرافیایی می‌تواند به‌عنوان ابزاری سودمند جهت برآورد بهتر جریان ژنی مورد استفاده قرار گیرد (۴۴). نتایج مربوط به آزمون واریانس مولکولی نیز بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در داخل گروه‌ها و تنوع پایین بین آن‌ها می‌باشد. طبق پارامترهای پیشنهادی توسط Thorpe، مقادیر شباهت ژنتیکی جمعیت‌های متعلق به گونه مشابه و گونه‌های متعلق به جنس مشابه به ترتیب در محدوده ۰/۸-۰/۹ و ۰/۳۵-۰/۸۵ قرار داشته و مقدار شباهت گونه‌هایی با جنس متفاوت پایین‌تر از ۰/۳۵ می‌باشد (۴۶). میانگین شاخص شباهت ژنتیکی در تحقیق حاضر ۰/۵۲۳ به دست آمد که در محدوده گونه‌های هم‌جنس قرار دارد. بالاترین میزان شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه‌های خلیج گرگان و گرگان رود و پایین‌ترین میزان جریان ژنی نیز بین این دو منطقه مشاهده شد. هم‌چنین پایین‌ترین فاصله ژنتیکی و در عین حال بالاترین شباهت بین نمونه‌های رودخانه‌های خلیج گرگان و گرگان رود مشاهده شد.

منابع

1. **Ferguson, M., 1995.** The role of molecular genetic markers in the management of cultured fish. Carvalho and, G.R. and Pitcher, T.J., (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries, London: Chapman and Hall.
2. **Radkhah, A. and Sadeghinezhad, E., 2019.** Application of single-nucleotide polymorphism (SNP) as a molecular marker in the study of genetic diversity of aquatic populations. Journal of Ornamental Aquatics. 6(2): 11-19. (In Persian)
3. **Diz, A.P. and Presa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). Aquaculture. 287(3-4): 278-285.
4. **Dudu, A., 2015.** Evaluation of genetic diversity in fish using molecular markers. Molecular approaches to genetic diversity. 165-193.
5. **Brunak, S., 2002.** Nucleotide sequence database policies. Science. 298(5597): 1333-1334.
6. **Markert, J.A., 2010.** Population genetic diversity and fitness in multiple environments. BMC evolutionary biology. 10(1): 1-13.
7. **Vandewoestijne, S., 2008.** Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. BMC Biology. 6(1): 1-11.
8. **Reed, D.H. and Frankham, R., 2003.** Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation biology. 17(1): 230-237.

44. Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*. 47(1): 264-279.
45. Baer, C.F., 1998. Species-wide population structure in a southeastern US freshwater fish, *Heterandria formosa*: gene flow and biogeography. *Evolution*. 52(1): 183-193.
46. Thorpe, J.P., 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 13: 139-168.
27. Zhou, J., 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers." *Russian Journal of Genetics*. 40(10): 1144-1148.
28. Frankham, R., 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular ecology*. 17(1): 325-333.
29. Håkansson, J. and Jensen, P., 2005. Behavioural and morphological variation between captive populations of red junglefowl (*Gallus gallus*) possible implications for conservation. *Biological conservation*. 122(3): 431-439.
30. Lind, C.E., 2009. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture*. 286(1-2): 12-19.
31. DeWoody, J. and Avise, J., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*. 56(3): 461-473.
32. Lucentini, L., 2009. Temporal changes and effective population size of an Italian isolated and supportive breeding managed northern pike (*Esox lucius*) population. *Fisheries Research*. 96(2-3): 139-147.
33. Borrell, Y.J., 2008. Spatial and temporal variation of genetic diversity and estimation of effective population sizes in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) populations from Asturias (Northern Spain) using microsatellites. *Conservation Genetics*. 9(4): 807-819.
34. Bhassu, S., 2004. The genetic structure of *Oreochromis* spp. (Tilapia) populations in Malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. *Biochemical Genetics*. 42(7): 217-229.
35. Li, J., 2009. Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*. 287(3-4): 286-291.
36. Wright, S., 1978. Variability within and among natural populations. *Evolution and the Genetics of Populations*.
37. Rezvani, S., Gothb Razmjoo, E., Laloei, F., Taghavi, M. and Nooruzi, M., 2011. Genetic comparison of *Neogobius caspius* (Eichwald, 1831) in the west and east of south Caspian Sea using microsatellite markers. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 20(1): 65-74. (In Persian)
38. Pourgholam, H., Zamini, A.A., Laloui, F., Khara, H., Taghavi, M.J., 2011. Study of the genetic structure of the population of the bighead carp (*Neogobius gorlap*) Mazandaran and Caspian Sea on the coasts of Golestan provinces using microsatellite markers. *Journal of Aquaculture Development*. 5(2): 33-44. (In Persian)
39. Hartl, D.L., 1997. Principles of population genetics, Sinauer associates Sunderland.
40. Piñera, J., 2007. Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations off Spanish Coasts: a preliminary study. *Marine Biology*. 151(6): 2153-2158.
41. Waples, R.S., 1988. Estimation of allele frequencies at isoloci. *Genetics*. 118(2): 371-384.
42. Kinnison, M., 2002. Reconstructing recent divergence: evaluating nonequilibrium population structure in New Zealand chinook salmon. *Molecular ecology*. 11(4): 739-754.
43. Ramstad, K., 2004. Founding events influence genetic population structure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Lake Clark, Alaska. *Molecular ecology*. 13(2): 277-290.