การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปลาพลวงหินในประชากรธรรมชาติบริเวณแม่น้ำน่าน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

Evaluation of genetic variation of Neolissochilus stracheyi wild populations in the Nan River watershed using microsatellite DNA markers

เชาวลีย์ ใจสุข[1*] อมรชัย ล้อทองคำ[1] สุภาวดี ศรีแย้ม[2] และ วันศุกร์ เสนานาญ[3]

[1]อาจารย์ สาขาวิชาประมง [2]อาจารย์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดน่าน 55000
[3]อาจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาพลวงหินในธรรมชาติ 2 แหล่งในบริเวณแม่น้ำน่าน คือ อ.บ่อเกลือ (BK) และอ.แม่จริม (MJ) โดยวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนามาจากปลาเวียน (*Tor tambroides*) (Nguten et al., 2009) ผลการศึกษาพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 3 จาก 5 ตำแหน่งที่วิเคราะห์ มีความหลากสภาพ (polymorphic) ในปลาพลวงหิน โดยประชากรBK และ MJ มีระดับความหลากหลายภายในกลุ่มไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยอัลลิลต่อตำแหน่งและค่า allelic richness ใน BK และ MJ เท่ากับ 2.33 และ 2.67 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตเท่ากับ 0.50 และ 0.56 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายเท่ากับ 0.41 และ0.53 ตามลำดับ นอกจากนี้ ทั้ง 2 ประชากรยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ($P<0.05$) ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการแบ่งแยกทางภูมิประเทศของทั้งสองแหล่งน้ำ

Abstract

This study evaluated the genetic diversity of two natural populations of *Neolissochilus stracheyi* in Nan River watershed, Amphoe Bokluea (BK) and Amphoe Mae Jarim (MJ). We analyzed microsatellite markers originally developed for *Tor tambroides* (Nguten et al., 2009). Three out of five microsatellite loci analyzed were polymorphic . Genetic variation within BK and MJ populations were not different. The number of allele per locus and allelic richness averaged over three loci was 2.33 and 2.67 for BK and MJ respectively. Observed heterozygosity value was 0.50 and 0.56 and the average expected heterozygosity was 0.41 and 0.53 for BK and MJ respectively. In addition, the two populations were genetically distinct ($P<0.05$) and geographic isolation of two locations may explain this genetic pattern.

คำสำคัญ : ปลาพลวงหิน ไมโครแซทเทลไลท์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม
Keywords : *Neolissochilus stracheyi*, Microsatellite, genetic diversity

[*]*ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อีเล็กทรอนิกส์ chaowalee2009@hotmail.com โทร. 0 5471 1574*

1. บทนำ

ปลาพลวงหิน หรือ Soro brook carp (*Neolissochilus stracheyi* (Day, 1871) ปัจจุบันได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงบนพื้นที่สูงของจังหวัดน่าน เนื่องจากมีความเหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศ โดยการเพาะพันธุ์ในปัจจุบันยังขาดองค์ความรู้ด้านพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถวางแผนการเพาะพันธุ์ได้อย่างยั่งยืนได้ ดังนั้นข้อมูลพันธุกรรมของแหล่งพันธุ์ในธรรมชาติ จึงมีความสำคัญในการประกอบการพิจารณาเพื่อการสร้างประชากรตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งพันธุกรรมอย่างสูงสุดโดยไม่ทำลายแหล่งพันธุกรรมที่มีค่าต่อการอนุรักษ์ (Hedrick, 2000)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาพลวงหินในธรรมชาติในแม่น้ำน่าน จากเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) ซึ่งเป็นบริเวณบนสายดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำช่วงสั้นๆ (simple sequence repeats, SSRs) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายของอัลลิลสูง เหมาะสมต่อการใช้เฝ้าระวัง และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรจากโรงเพาะฟักและประชากรในธรรมชาติ เพื่อป้องกันการเสื่อมของพันธุกรรมที่อาจเกิดจากการจัดการพ่อ แม่พันธุ์ที่ไม่ถูกต้องหรือการผสมเลือดชิด การทราบถึงข้อมูลระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการพ่อ แม่พันธุ์ การสร้างประชากรโรงเพาะฟัก เพื่อการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลาพลวงหินต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1. รวบรวมตัวอย่างภาคสนาม

เก็บตัวอย่างจากปลาพลวงหินในธรรมชาติ 2 แหล่ง คือ อ.บ่อเกลือ (BK) และ อ.แม่จริม (MJ) แหล่งละ 48 ตัวอย่าง โดยรวบรวมเนื้อเยื่อครีบหางขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร และเก็บรักษาเนื้อเยื่อในแอลกอฮอล์ 95%

2.2. การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วิเคราะห์ตัวอย่างปลาพลวงหินเพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเริ่มจากสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างครีบโดยวิธี Salt extraction ดัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสผ่านอะกาโรสเจล 1% นำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบโพลีเมอเลส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Tt2.D01, Tt1.C10, Tt1.E11, Tt1.A06 และ Tt1.B01 ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาเวียน (*Tor tambroides*) (Nguten et al., 2009) และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสผ่าน 6% Denaturing Polyacrylamide Gel ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United Kingdom) และย้อมดีเอ็นเอที่แยกขนาดแล้วด้วยเทคนิค Silver Staining (Promega, USA) และวัดขนาดของอัลลิล (Base Pair, bp) บนแผ่นเจลที่แต่ละตำแหน่งโดยเทียบกับตำแหน่งที่แน่ชัดของลำดับเบสของ pGEM-3Zf (+) Vector (Promega, USA) บันทึกจีโนไทป์ของตัวอย่างปลาพลวงหิน

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.3.1 ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยคำนวณความถี่ของอัลลิล จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ โดยโปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) คำนวณค่า Allelic Richness โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001) ทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก โดยการประเมินค่า exact *p*-value ด้วยวิธี markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989) ทดสอบความต่างของค่า A, Ar Ho และHe ภายในกลุ่มของ BK และ MJ โดยใช้ t-test ในโปรแกรม SPSS version 14

2.3.2 ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยวิเคราะห์ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of Molecular variance, AMOVA) โดยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier et al., 2006)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 Cross-species amplification ของไมโครแซทแทลไลท์ในปลาพลวงหิน

การศึกษานี้พบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีความหลากสภาพในปลาพลวงหิน จำนวน 3 จาก 5 ตำแหน่งที่ทดสอบ โดยพบความหลากสรูปที่ตำแหน่ง Tt2.D01, Tt1.E11 และ Tt1.C10 (ตารางที่ 1)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในปลาพลวงหินที่สามตำแหน่ง มีระดับที่ค่อนข้างต่ำกว่าปลาเวียน Tor tambroides (ชนิดที่ใช้พัฒนาเครื่องหมาย) และปลาสกุล Tor อีกหลายชนิด (Nguten et al., 2009) โดยในปลาพลวงหิน พบจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งเท่ากับ 2 ถึง 4 อัลลิล ในขณะที่ปลาสกุล Tor พบจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 2 ถึง 18 ทั้งนี้การวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่พัฒนาจากปลาชนิดหนึ่ง ในปลาต่างชนิด หรือต่างสกุล มีแนวโน้มที่จะพบสภาพหลากหลายของยีนที่น้อยลง หรืออาจไม่พบสภาพหลากหลายของยีนเลย อย่างไรก็ตามระดับความหลากสภาพของการใช้เครื่องหมายข้ามชนิด ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางวิวัฒนาการของปลาทั้งสองชนิด (Primmer et al., 1996)

ตารางที่ 1 จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่พบจากเครื่องหมาย 5 ตำแหน่ง ที่พบในปลาพลวงหินเทียบกับปลาชนิดอื่นๆ ที่รายงานใน Nguten et al. (2009)

ชนิดปลา	N. stracheyi (การศึกษานี้)		T. tambroides (ชนิดที่ใช้พัฒนาเครื่องหมาย)		T. douronensis		T. khudree		T. putitora		T. tor	
ตำแหน่ง	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
Tt2.D01	85	3	50	9	36	13	19	7	4	3	5	6
Tt1.E11	96	4	48	7	35	18	0	-	0	-	0	-
Tt1.C10	96	2	50	2	36	9	18	7	4	5	5	6
Tt1.A06	48	1	50	3	36	3	19	1	0	-	3	2
Tt1.B01	48	1	50	1	36	14	19	4	2	1	5	8

N คือ จำนวนตัวอย่าง, A คือ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง

3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ประชากรปลาพลวงหินในธรรมชาติทั้ง 2 ประชากร มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดย BK และ MJ มีจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งและ Allelic Richness เท่ากับ 2.33 และ 2.67 (เฉลี่ยที่ 3 ตำแหน่งที่มีความหลากสภาพ) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (H_o) เท่ากับ 0.50 และ 0.56 และ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการคาดหมาย (H_e) เท่ากับ 0.41 และ 0.53 ทั้งนี้สัดส่วนของจีโนไทป์ที่ทุกตำแหน่งที่พบในทั้งสองกลุ่ม ไม่เบี่ยงเบนจากค่าที่คาดหวังภายใต้สมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ระดับความหลากหลายที่พบในกลุ่มปลาพลวงหินทั้ง 2 แหล่ง มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่พบในปลา นวลจันทร์เทศ 7 ประชากรจากธรรมชาติ ที่มีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งเท่ากับ 2.29 – 3.29 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.39-0.40 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายมีค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งอยู่ระหว่าง 0.39-0.41 (ที่ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง) (Chauhan et al., 2007) ในขณะที่ปลา Elopichthys bambusa จำนวน 5 ประชากรในแม่น้ำ Yangtze ประเทศจีน มีจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 4.80 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตอยู่ระหว่าง 0.15-1.00 (ที่ไมโครแซลเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง) (Abbas et al., 2010) อย่างไรก็ตาม ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในปลาพลวงหินจากการศึกษานี้ มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับค่าที่พบในปลาชนิดอื่นในบริเวณแม่น้ำน่าน เช่น ปลาหมูงวง (Yasuhikotakia nigrolineata) บริเวณแม่น้ำว้า จ.น่าน ที่พบค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งเท่ากับ 28 อัลลิล และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตมีค่าอยู่ระหว่าง 0.11-0.97 (ที่ไมโครแซลเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง) (วงศ์ปฐม และอภิรดี, 2553) ทั้งระดับเฮทเทอโรไซโกซิตีที่มีค่าค่อนข้างสูงในบางตำแหน่ง ในปลา E. bambusa (Abbas et al., 2010) และ Y. nigrolineata (วงศ์ปฐม และอภิรดี, 2553) จนเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก น่าจะเป็นผลมาจากการที่ปลาถูกทำให้แยกออกจากกัน มีผลในการลดโอกาสการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากร และปลาในบริเวณที่ถูกแยกยังมีจำนวนลดลง ทั้งนี้การศึกษานี้คาดว่าน่าจะเป็นเพราะธรรมชาติการกระจายพันธุ์ของปลาพลวงหินที่มีแหล่งที่อยู่ที่ค่อนข้างจำเพาะ (อมรชัย, 2551) ทำให้ขนาดประชากรอาจไม่ใหญ่นัก ประกอบกับอาจไม่มีการแลกเปลี่ยนยีนกับแหล่งอื่น และจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากการจับที่เกินกว่ากำลังการผลิตของธรรมชาติทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นยังอาจเป็นผลมาจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษานี้ที่มีความหลากหลายต่ำ

3.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ปลาพลวงหินทั้ง 2 แหล่งที่อยู่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า Global F_{ST} = 0.571, P<0.05; AMOVA) โดย ความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร 57.81 % และความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร 42.19 % ทั้งนี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ 2 กลุ่มประชากรคาดว่าเป็นผลมาจากการแบ่งแยกกันของลำน้ำอย่างชัดเจน โดยลำน้ำใน อ. บ่อเกลือ และ อ. แม่จริม มีระยะทางห่างกันกว่า ระหว่าง 200 กิโลเมตร ประกอบกับประชากรของแต่ละแหล่งน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็วและที่เป็นอิสระจากกัน ส่งผลต่อการมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ซึ่งความแตกต่างลักษณะนี้เป็นปรากฏการณ์ที่พบทั่วไปในสัตว์น้ำจืดชนิดอื่น เช่น ปลาโมงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ธวัชชัย และคณะ, 2555) และประชากรปลาเทโพในประเทศไทย (นภาพร และคณะ, 2551) และปลา Campostoma anomalum บริเวณ Mill Creek catchment Ohio, USA. (Waits et al., 2008) ปลา cottus bairdi จากบริเวณ Nantahala River (North Carolina, USA) (Lamphere and Blum, 2012)

4. สรุป

1. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาสำหรับปลาเวียน จำนวน 3 จาก 5 ตำแหน่งที่ทดสอบมีความหลากสภาพในปลาพลวงหิน

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปลาพลวงหินทั้ง 2 ประชากร คือ อ.บ่อเกลือ และอ.แม่จริม มีความหลากหลายที่ไม่ต่างกัน

3. ปลาพลวงหินทั้ง 2 ประชากร มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ตามสภาพภูมิศาสตร์อย่างชัดเจน

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณดำเนินการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยการแห่งชาติ ได้รับการสนับสนุนด้านเครื่องมือจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มทร.ล้านนา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

6. เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย เงาสำรวย, ศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์, ธงชัย จำปาศรี และบัณฑิต ยวงสร้อย. 2555. **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาโมงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ**. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ : 129-134.

นภาพร ศรีพุฒินิพนธ์, ทิพย์สุดา ต่างประโคน, วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และสุพรรณ ขันน้ำเที่ยง. 2551. **โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปลาเทโพในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซททัลไลท์ดีเอ็นเอ**. วารสารการประมง. 61(3). 222 - 230.

วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และอภิรดี หันพงศ์กิตติกูล. 2553. **การประเมินสถานภาพของประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ**. วารสารการประมง. 63(3). 201 - 209.

อมรชัย ล้อทองคำ. 2551. **ความหลากชนิดของปลาในลุ่มน้ำน่าน (ระบบแม่น้ำเจ้าพระยา) ในเขตจังหวัดน่าน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abbas. K., Zhou. X., Li. Yang., Gao. Z. and Wang . W. 2010. **Microsatellite diversity and Population genetic structure of yellowcheek, *Elopichthys bambusa* (Cyprinidae) in the Yangtze River**. Biochemical Systematics and Ecology. 38: 806 - 812.

Aljanabi S.M. and Martinez, I. 1997. **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR - based techniques**. Nucleic Acids Research. 25: 4692-4693.

Chauhan, T, Lal, K.K., Mohindra, Vindhya., Singh, R.K., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Sharma, P.C., and Lakra, W.S. 2007. **Evaluating genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton–Buchanan, 1882): Evidence from allozyme and microsatellite markers**. Aquaculture. 269: 135 - 149.

Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2006. **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG) Institute of Zoology University of Berne.

Goudet, J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice (version2.9.3)**. (Computer software). Switzerland. University of Lausanne.

Guo, S., and Thomson, E. 1992. **Performing the exact test of Hardy-Weinberg Proportion for multiple all**. Biometrics. 48: 361 - 372.

Hedrick, P.W. 2000. **Genetics of populations**. Jones and Barttett Publishers. Inc., USA

Lamphere, A. B and Blum, J. M. 2012. **Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish.** Ecology of Freshwater Fish. 21: 75 - 86.

Nguyent, T., Baranski, M., Rouke, M. and Partlan, H. 2007. **Characterization of microsatellite DNA markers for a mahseer species, *Tor tambroides* (Cyprinidae) and cross-amplification in four congeners**. Molecular Ecology Notes. 7: 109 - 112.

Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. **GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research**. Molecular Ecology Notes. 6: 288 - 295.

Primmer, C.R., Møller, A .P. and Ellegren, H. 1996. **A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds**. Mol. Ecol.. 5: 365 - 378.

Rice, W. R. 1989. **Analyzing tables of statistical test.** Evolution. 43(1): 223 - 225.

Rousset, F. 2008. **GENEPOP: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux.** Molecular Ecology Resources. 8: 103 - 106.

Waits, R. E., Bagley, J. M., Blum, J. M., Mccormick, H.F. and Lazorchak, M. J. 2008. **Source–sink dynamics Sustain central stonerollers (*Campostoma anomalum*) in a Heavily urbanized catchment**. Freshwater Biology. 53: 2061 - 2075.