

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان:

بررسی مولکولی ساختار جمعیتی گونه
ماهی سفید و ماهی کلمه از خزر جنوبی
و سوکلا و راشگو معمولی از خلیج فارس و دریای عمان

مجری:

سهراب رضوانی گیل کلانی

شماره ثبت:

۸۹/۱۴۶۸

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

-
- عنوان پروژه/ طرح: بررسی مولکولی ساختار جمعیتی گونه ماهی سفید و ماهی کلمه از خزر جنوبی و سوکلا و راشگو معمولی از خلیج فارس و دریای عمان
- شماره مصوب: ۸۶۰۱۹-۰۳-۰۰۰۰-۲۰۰۰۰-۲۰۱۹
- نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سهراب رضوانی گیل کلایی
- نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد):
- نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: سهراب رضوانی گیل کلایی
- نام و نام خانوادگی همکاران: محمد جواد تقوی - محمد مومنی - شجاعی - حسین عبدالحی
- نام و نام خانوادگی مشاور(ان):
- محل اجرا: استانهای شمالی و جنوبی
- تاریخ شروع: ۱۳۸۵
- مدت اجرا: ۴ سال
- ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
- شمارگان (تیراژ): ۲۰ نسخه
- تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۰
- حق چاپ برای مؤلف محفوظ است - نقل مطالب تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

طرح / پروژه: بررسی مولکولی ساختار جمعیتی گونه ماهی سفید و ماهی کلمه از خزر

جنوبی و سوکلا و راشگو معمولی از خلیج فارس و دریای عمان

کد مصوب : ۸۶۰۱۹-۰۳-۰۰۰۰-۲۰۰۰۰-۲۰۱۹

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۱۴۶۸ تاریخ: ۸۹/۱۱/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سهراب رضوانی گیل کلائی دارای مدرک دکتری

در رشته ژنتیک می باشد.

طرح/پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری

آبزیان در تاریخ ۱۳۸۹/۸/۱۸ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹/۵ و رتبه عالی

تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مشاور حوزه ریاست مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
بخش اول: کلیات		۲
۱-۱- تنوع زیستی		۲
۱-۲- معرفی مناطق نمونه برداری از نقطه نظر تنوع زیستی		۳
۱-۳- تنوع ژنتیکی		۵
۱-۳-۱- منابع تنوع ژنتیکی		۶
۱-۴- تعاریف و اصطلاحات		۷
۱-۴-۱- فراوانی اللی		۷
۱-۴-۲- تنوع ژنی یا هنروزیگوسیتی		۸
۱-۴-۳- شاخص شانون		۹
۱-۴-۴- تعادل هاردی-واینبرگ		۱۰
۱-۴-۵- درجه تمایز ژنتیکی		۱۰
۱-۴-۶- فاصله ژنتیکی		۱۱
۱-۴-۷- جریان ژنی		۱۱
۱-۴-۸- فیلوژنی		۱۲
۱-۴-۹- روش پیوند همجواری		۱۲
۱-۴-۱۰- روش جفت گروهی غیروزی از طریق میانگین حسابی		۱۳
۱-۵- روشهای حفظ تنوع ژنتیکی		۱۴
۱-۶- نشانگرهای ژنتیکی و کاربرد آنها		۱۵
۱-۷- انواع نشانگرها		۱۶
۱-۷-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی		۱۶
۱-۷-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی		۱۶
۱-۷-۳- نشانگرهای مولکولی		۱۶
۱-۸- اندازه نمونه مورد نیاز		۳۲
۱-۹- استخراج DNA		۳۵
۱-۱۰- آغازگرهای مورد استفاده		۳۸

بخش دوم: ماهی سفید	۴۰
چکیده	۴۱
۲-۱- مقدمه	۴۳
۲-۲- کلیات	۴۵
۲-۲-۱- بیولوژی ماهی سفید	۴۵
۲-۲-۲- تغذیه ماهی سفید	۴۷
۲-۲-۳- تولیدمثل طبیعی ماهی سفید	۴۷
۲-۲-۴- تکثیر مصنوعی ماهی سفید و برنامه بازسازی ذخایر آن در ایران	۴۸
۲-۲-۵- پراکنش جغرافیایی ماهی سفید	۵۰
۲-۲-۶- مهاجرت ماهی سفید	۵۰
۲-۲-۷- صید و ارزش شیلاتی ماهی سفید	۵۳
۲-۲-۸- مروری بر مطالعات انجام شده	۵۴
۲-۳- مواد روشها	۶۲
۲-۳-۱- نمونه برداری	۶۲
۲-۳-۲- مواد مصرفی و تجهیزات موردنیاز	۶۳
۲-۳-۳- استخراج DNA کل	۶۴
۲-۳-۴- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده	۶۶
۲-۳-۵- آماده سازی آغازگر	۶۸
۲-۳-۶- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره ای پلمیراز (PCR)	۶۹
۲-۳-۷- الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد	۷۱
۲-۳-۸- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترا ت نقره	۷۲
۲-۳-۹- ثبت تصاویر	۷۳
۲-۳-۱۰- سنجش وزنی محصول PCR و امتیازدهی باندها	۷۴
۲-۳-۱۱- آنالیز آماری	۷۴
۲-۴- نتایج	۷۵
۲-۴-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده	۷۵
۲-۴-۲- ارزیابی محصول PCR	۷۶

صفحه	عنوان	«فهرست مندرجات»
۸۱	۲-۴-۳-اللهای پلی مورف	۸۱
۸۴	۲-۴-۴-آلهای واقعی (Na) و موثر (Ne)	۸۴
۸۴	۲-۴-۵-تنوع ژنتیکی	۸۴
۸۵	۲-۴-۶-شاخص اطلاعات شانون (H')	۸۵
۸۶	۲-۴-۷-تبادل هاردی - واینبرگ	۸۶
۸۸	۲-۴-۸- R_{st} , F_{st} و جریان ژنی	۸۸
۹۱	۲-۴-۹-نمودارهای سنجش جفت جمعیت ها	۹۱
۹۶	۲-۴-۱۰-شبهات و فواصل ژنتیکی	۹۶
۹۸	۲-۵-بحث	۹۸
۹۸	۲-۵-۱-وضعیت آلی و آلهای اختصاصی	۹۸
۱۰۳	۲-۵-۲-هتروزایگوسیتی	۱۰۳
۱۰۹	۲-۵-۳-تبادل هاردی - واینبرگ	۱۰۹
۱۱۴	۲-۵-۴- R_{st} , F_{st} و جریان ژنی	۱۱۴
۱۱۹	۲-۵-۵-شبهات و فاصله ژنتیکی	۱۱۹
۱۲۱	۲-۶-نتیجه گیری نهایی	۱۲۱
۱۲۳	۲-۷-پیشنهادها	۱۲۳
۱۲۴	چکیده انگلیسی	۱۲۴
۱۲۵	بخش سوم: ماهی کلمه	۱۲۵
۱۲۶	چکیده	۱۲۶
۱۲۷	۳-۱-مقدمه	۱۲۷
۱۲۸	۳-۲-کلیات	۱۲۸
۱۲۸	۳-۲-۱-بیولوژی ماهی کلمه	۱۲۸
۱۳۰	۳-۲-۲-پراکنش جغرافیایی ماهی کلمه	۱۳۰
۱۳۱	۳-۲-۳-صید	۱۳۱
۱۳۲	۳-۲-۴-مهاجرت ماهی کلمه	۱۳۲
۱۳۲	۳-۲-۵-مروری بر مطالعات انجام شده	۱۳۲
۱۳۹	۳-۳-مواد روشها	۱۳۹
۱۳۹	۳-۳-۱-مطالعه مولکولی	۱۳۹

صفحه	عنوان
۱۳۹	۲-۳-۳- استخراج DNA کل و الکتروفورز.....
۱۳۹	۳-۳-۳- آماده سازی آغاز گر
۱۴۱	۴-۳-۳- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره ای پلمیراز (PCR).....
۱۴۱	۵-۳-۳- بهینه کردن PCR و پروفیل های حرارتی آن
۱۴۲	۶-۳-۳- الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد.....
۱۴۲	۴-۳- نتایج بررسی های مولکولی
۱۴۳	۱-۴-۳- نتایج بررسی کمی و کیفیت DNA استخراج شده
۱۴۵	۲-۴-۳- ارزیابی محصول PCR
۱۴۷	۳-۴-۳- اللهای پلی مورف
۱۴۸	۴-۴-۳- آلهای واقعی (Na) و موثر (Ne)
۱۴۸	۵-۴-۳- تنوع ژنتیکی
۱۴۹	۶-۴-۳- شاخص اطلاعات شانون (H')
۱۵۰	۷-۴-۳- تعادل هاردی - واینبرگ
۱۵۲	۸-۴-۳- R_{st} , F_{st} و جریان ژنی
۱۵۳	۹-۴-۳- نمودارهای سنجش جفت جمعیت ها
۱۵۴	۱۰-۴-۳- شباهت و فواصل ژنتیکی
۱۵۴	۵-۳- بحث و تفسیر
۱۵۵	۱-۵-۳- هتروزایگوسیتی
۱۵۵	۲-۵-۳- تعادل هاردی - واینبرگ
۱۵۷	۳-۵-۳- R_{st} , F_{st} و جریان ژنی
۱۶۰	۶-۳- نتیجه گیری نهایی
۱۶۱	۷-۳- پیشنهادات
۱۶۲	چکیده انگلیسی
۱۶۳	بخش چهارم.....
۱۶۴	چکیده
۱۶۶	۱-۴- مقدمه
۱۷۰	۲-۴- کلیات
۱۷۰	۱-۲-۴- اهمیت و ویژگی ماهی سوکلا

۱۸۱	۴-۳- مواد و روشها.....
۱۸۱	۴-۳-۱- نمونه برداری.....
۱۸۲	۴-۳-۲- مواد مصرفی و تجهیزات، استخراج DNA و الکتروفورز.....
۱۸۲	۴-۳-۳- آماده سازی آغازگر.....
۱۸۴	۴-۳-۴- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....
۱۸۴	۴-۳-۵- بهینه کردن PCR و پروفیل‌های حرارتی آن.....
۱۸۵	۴-۳-۶- الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد.....
۱۸۵	۴-۴- نتایج بررسی مولکولی.....
۱۸۵	۴-۴-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده.....
۱۸۷	۴-۴-۲- ارزیابی محصول PCR.....
۱۹۶	۴-۴-۳- آلل‌های پلی‌مورف (چند شکلی).....
۲۰۲	۴-۴-۴- آلل‌های اختصاصی.....
۲۰۲	۴-۴-۵- آلل‌های واقعی (Na) و موثر (Ne).....
۲۰۵	۴-۴-۶- تنوع ژنتیکی.....
۲۰۷	۴-۴-۷- شاخص اطلاعات شانون (H').....
۲۰۸	۴-۴-۸- تعادل هاردی- واینبرگ.....
۲۱۱	۴-۴-۹- فاکتور F_{st} ، R_{st} و جریان ژنی.....
۲۱۴	۴-۴-۱۰- شباهت و فواصل ژنتیکی.....
۲۱۵	۴-۴-۱۱- اختلاف در تنوع ژنتیکی بین نواحی (گروه‌ها)، مناطق هر ناحیه و افراد هر منطقه.....
۲۱۷	۴-۴-۱۲- نمودارهای سنجش جفت جمعیت‌ها.....
۲۲۵	۴-۵- بحث و تفسیر.....
۲۲۵	۴-۵-۱- وضعیت آلی و آلل‌های اختصاصی.....
۲۲۸	۴-۵-۲- هتروزیگوسیتی.....
۲۳۱	۴-۵-۳- تعادل هاردی- واینبرگ.....
۲۳۴	۴-۵-۴- میزان F_{st} و R_{st} ، جریان ژنی، شباهت و فواصل ژنتیکی.....
۲۴۰	۴-۶- نتیجه‌گیری نهایی.....
۲۴۲	۴-۷- پیشنهادات.....
۲۴۳	چکیده انگلیسی.....

بخش - پنجم: ماهی راشگو.....	۲۴۴
چکیده.....	۲۴۵
۱-۵- مقدمه.....	۲۴۶
۲-۵- کلیات.....	۲۴۹
۱-۲-۵- بیولوژی ماهی راشگو.....	۲۴۹
۲-۲-۵- مروری بر مطالعات انجام شده.....	۲۵۸
۳-۵- مواد روشها.....	۲۶۱
۱-۳-۵- نمونه برداری.....	۲۶۱
۲-۳-۵- استخراج DNA کل، PCR و الکتروفورز.....	۲۶۱
۳-۳-۵- آماده سازی آغاز گر.....	۲۶۲
۴-۵- نتایج.....	۲۶۵
۱-۴-۵- تنوع ژنتیکی.....	۲۶۵
۲-۴-۵- تمایز ژنتیکی و جریان ژنی.....	۲۶۵
۳-۴-۵- محاسبه میزان شباهت و فاصله بین مناطق نمونه برداری.....	۲۶۹
۴-۴-۵- دندروگرام گروه های مختلف سائیزی.....	۲۶۹
۵-۵- بحث.....	۲۷۱
نتیجه گیری نهایی.....	۲۷۴
چکیده انگلیسی.....	۲۷۶
بیوست.....	۲۷۷
منابع.....	۲۸۵
چکیده انگلیسی.....	۲۹۵

چکیده

ساختار جمعیت‌های دو گونه ماهی دریای خزر (سفید، کلمه) و دو گونه در خلیج فارس و دریای عمان (سوکلا، راشگو) با استفاده از روش ریزماهواره ای و ریپید مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ۲۱۰ نمونه ماهی سفید (انزلی، تنکابن، خشک‌رود، گرگانرود و کورا)، ۹۰ نمونه کلمه (ولگا، انزلی و خلیج گرگان)، ۱۸۴ نمونه سوکلا (بوشهر، بندر دیر، بندر لنگه و بندر عباس و بزم) و ۲۳۵ نمونه راشگو (خوزستان، بوشهر، هرمزگان و چابهار) نمونه برداری شد. DNA ژنومی نمونه‌ها از بافت نرم باله ماهی به روش فنل - کلروفرم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای ریزماهواره و ریپید صورت گرفت. محصولات تکثیر شده آن با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با نترات نقره رنگ آمیزی شد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد در بررسی ماهی سفید میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۹ محاسبه شد. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ انحراف از تعادل را در اکثر جایگاهها ($P \leq 0/05$)، ($P \leq 0/001$) نشان دادند. بر اساس تست F_{st} و R_{st} نمونه‌های تمام مناطق نمونه برداری اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P \leq 0/01$). در بررسی ماهی کلمه هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۵ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۷ بود. نتایج بدست آمده از F_{st} ، اختلاف معنی داری بین نمونه‌های بندرانزلی و خلیج گرگان نشان نداد ولی اختلاف نمونه‌های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P \leq 0/05$). در بررسی ماهی سوکلا میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۶۵۵ و ۰/۸۷۴ محاسبه شد. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ انحراف از تعادل را در اکثر جایگاهها ($P \leq 0/05$)، ($P \leq 0/001$) نشان دادند. میزان R_{st} بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه برداری غیر معنی دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی دار بود ($P < 0.01$). در بررسی ماهی راشگو با استفاده از روش ریپید بیشترین میزان هتروزیگوسیتی در استانهای بوشهر و بندرعباس ($0,22 \pm 0,13$) و کمترین در چابهار ($0,171 \pm 0,175$) دیده شد. میزان متوسط تمایز در بین ژنوتیپها $0,084 \pm 0,01$ و متوسط جریان ژنی $0,39 \pm 0,01$ می‌باشد.

لغات کلیدی: ژنتیک جمعیت، کلمه، سفید، خزر، راشگو، سوکلا، خلیج فارس و دریای عمان

بخش اول : کلیات

۱-۱- تنوع زیستی

به تفاوت‌های موجود بین ارگانیسم‌های زنده حاضر در تمام منابع شامل اکوسیستم‌های بینابینی خشکی و دریاها و سایر اکوسیستم‌های آبی و ترکیب اکولوژیکی که آنها جزئی از آن هستند تنوع زیستی گفته می‌شود و شامل تنوع داخل گونه ای، تنوع بین گونه ای، و اکوسیستم‌ها می‌باشد (Charlotte, 1996).

کنوانسیون ۱۹۹۲ ریو در مورد تنوع زیستی که در ۲۲ ژوئن ۱۹۹۲ به امضای ۱۵۳ دولت رسید اعلام می‌دارد که حفظ تنوع زیستی مسئله تمامی بشریت است و دولت‌ها مسئول حفظ تنوع زیستی کشور خود و استفاده پایدار از منابع زیستی خویش می‌باشند عضویت بیش از ۱۸۰ کشور دنیا در این کنوانسیون حکایت از اعتقاد مشترک جهانی به لزوم حفاظت از تنوع زیستی دارد (زمانی، ۱۳۸۰).

بوم‌سازگان‌های دریایی، جنگلی، بیابانی، مرتعی، توندرا، ساوانی،... هنگامی از ثبات کافی برخوردارند که دارای تنوع زیستی کافی و کامل باشند. تمامی این بوم‌سازگان در زندگی اقتصادی، اجتماعی، فرهنگی و روحی انسان نقش بسیار مهمی دارند. بر اثر ازدیاد جمعیت، پیشرفت صنعت و بهره برداری بی رویه از زمین، با وجود کوشش‌های انجام شده در ۲۰ سال اخیر، این تنوع زیستی در بسیاری از مناطق شدیداً به خطر افتاده است از اینرو حفاظت و احیای مجد آن در شمار یکی از وظایف مهم پیش روی بشر محسوب می‌شود (درویش، ۱۳۸۳).

هر چه گوناگونی و پایداری چهره‌های متنوع حیات بیشتر و تضمین یافته‌تر باشد، می‌توان به دورنمای بقای زیست بوم‌های زمینی امیدوارتر بوده و با اطمینان بیشتر و اراده‌ای راسخ‌تر، برای آینده‌ای دور دست‌تر برنامه ریزی کرد بنابراین گزاف نخواهد بود اگر ادعا شود درجه پایداری تمدن انسانی، متناسب با اهمیتی خواهد بود که در فرهنگ جهانی، نسبت به حراست از تنوع زیستی وجود خواهد داشت (درویش، ۱۳۸۳).

در بیان دلایل اهمیت استثنایی تنوع زیستی، کافی است عواقب دهشتناک زوال آن را با پیامدهای زینبار ناشی از هر بحران متصور دیگر در محیط زیست مقایسه کنیم؛ کدام بحران زیست محیطی دیگری را در جهان می‌توان سراغ گرفت که اثراتی پایدارتر از نابودی تنوع زیستی بر جای گذارد؟ بسیاری از بحران‌های دیگر را شاید بتوان با یک اجماع فرضی جهانی مهار نمود اما زوال تنوع زیستی و محو هرگونه گیاهی یا جانوری و یا چشم

اندازهای ناهمتای طبیعی مانند سوختن کتابی خطی است که دیگر بازسازی اش امکان پذیر نبوده و نابودی آن همیشگی و ماندگار خواهد بود (درویش، ۱۳۸۳).

تنوع زیستی مناطق دریایی و ساحلی شامل تنوع وسیعی از گونه‌های دریایی و ساحلی و تنوع ژنتیکی آنهاست این تنوع شامل وفور گونه‌های موجود در اقیانوس‌های جهان، زیستگاه‌ها و اکوسیستم‌های بیشمار ساحلی و دریایی و غنای فرایندهای اکولوژیکی که از تمام گونه‌های موجود حمایت می‌کنند می‌شود. متأسفانه فعالیت‌های انسان در اکثر نقاط در حال از بین بردن منابع دریایی و ساحلی و نابود کردن زیستگاه‌ها و اکوسیستم‌ها بوده و این فشارها گاهی اوقات در حد غیر قابل جبران و برگشت ناپذیر هستند. بیشترین تنوع زیستی با ارزش جهانی در مناطق دریایی از جمله مانگروها دیده می‌شود که دارای زیستگاه‌های بسیار متنوعی می‌باشند (Charlotte, 1996).

اکوسیستم‌های ساحلی و تنوع آنها منابع بسیار مهم و وسیعی را فراهم می‌آورند از جمله نوزادگاه ماهیان دریایی که چیزی نزدیک به ۸۴ میلیون تن از غذای انسانی و نیز مکمل‌های غذایی حیوانات پرورشی بوده‌اند و ۱۶٪ از کل میزان پروتئین استفاده شده توسط هر فرد در سطح جهان را تشکیل می‌دهد. اکوسیستم‌های ساحلی همچنین خدمات بسیار حیاتی و مهمی را برای انسان فراهم می‌سازند این عملکردهای اکولوژیکی شامل ذخیره و چرخه مواد غذایی، تنظیم تعادل آب، جلوگیری از صدمات وارد شده به خشکی‌ها در اثر طوفان‌های دریایی و امواج همچنین تصفیه مواد آلاینده می‌باشد (Charlotte, 1996).

۲-۱- معرفی مناطق نمونه برداری از نقطه نظر تنوع زیستی

منطقه خلیج فارس را کشور ایران، عراق، کویت، عربستان سعودی و امیر نشین‌های بحرین، قطر، امارات متحده عربی و عمان احاطه نموده است، از این هشت منطقه سرزمین‌های هفت کشور کرانه‌ای بوده و تنها امیرنشین بحرین است که به شکل مجمع‌الجزایر در آبهای خلیج فارس قرار دارد. مختصات جغرافیایی خلیج فارس بین حدود ۴۸ درجه تا ۵۶ درجه شرقی و ۲۳ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۰ درجه و ۳۰ دقیقه شمالی واقع شده است (سالاری علی آبادی، ۱۳۷۵).

منطقه دریای خزر را کشورهای ایران، قزاقستان، آذربایجان، ترکمنستان احاطه نموده اند، مختصات جغرافیایی دریای خزر بین حدود ۴۸ درجه تا ۵۱ درجه شرقی و ۳۸ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۳۰ دقیقه شمالی واقع شده است.

مهمترین عوامل بالا بودن تنوع زیستی در خلیج فارس نسبت به دریای خزر بسته بودن دریای خزر است، با وجود آنکه خزر از طریق ولگا به آبهای آزاد راه دارد اما امکان مهاجرت آبزیان از سایر دریاها وجود ندارد در حالیکه باز بودن خلیج فارس از طریق تنگه هرمز سبب می‌گردد که از این طریق براحتی گونه‌ها وارد خلیج شوند؛ با بررسی صید لنج‌های صیادی خلیج فارس متوجه می‌شویم که بسیاری از گونه‌های صید شده مهاجر و غیر بومی‌اند. عمق بسیار بالای خزر سبب لایه‌بندی حرارتی گردیده یعنی آنکه آبها شامل سه طبقه اپی‌لیمنیون، متالیمنیون و هیپولیمنیون می‌باشد، که خود از عوامل محدود کننده جامعه آبزیان بدلیل محدودیت در اکسیژن، مواد مغذی و حرارت می‌باشد. در دریای خزر به علت عمق زیاد آب و فشار ناشی از ستون آب، امکان استفاده از بستر دریا جهت جامعه آبزیان کفزی یا بنتوزها وجود ندارد و جامعه بنتیک منحصر به نواحی کم عمق کرانه‌ای و ساحلی است ولی در خلیج فارس در تمامی قسمت‌ها بدلیل عمق کم کفزیان وجود دارند. دریای خزر بعلت قرار گرفتن در عرض جغرافیایی بالاتر نسبت به خلیج فارس و کاهش دما، تنوع بسیار پایین دارد زیرا تنوع گونه‌ای در مناطق نزدیک استوا زیادتر از مناطق دورتر بوده و هرچه از استوا به سمت قطب پیش برویم تنوع کاهش ولی تراکم افزایش می‌یابد. آب خلیج فارس (۳۵ گرم در لیتر) شورتر از خزر (۱۱ گرم در لیتر) است و آبهای شور زیستگاه مناسبتری برای کثرت تنوع زیستی در مقابل دریاچه‌های شیرین می‌باشد. علی‌الرغم آنکه دریای مازندران دو برابر خلیج فارس است و چنانچه با میانگین متوسط خلیج فارس یعنی ۳۰ متر فرض شود، بیش از دو برابر سطح ایران را می‌پوشاند، ولی تنوع زیستی در دریای مازندران بسیار پایین است.

خلیج فارس به دلیل شرایط اقلیمی ویژه حاکم بر آن بسیار شکننده و آسیب‌پذیر است و ورود کمترین آلاینده به داخل دریا اثرات مخربی بر روی سلامت آبزیان و موجودات آن دارد؛ چرا که حداکثر درجه حرارت آب دریا در تابستان گاهی اوقات به ۳۶ تا ۳۷ درجه می‌رسد که البته میانگین آن در سطح دریا بین ۲۶ تا ۲۷ درجه است و در اثر شدت گرما میزان تبخیر نیز بسیار بالا و به ۱۴۰۰ میلیون لیتر در سال می‌رسد. خلیج فارس با تمام مشکلات محیطی و اقلیمی که بر آن حاکم است از تنوع زیستی بالایی برخوردار است، به طوری که نسبت به دریای خزر

وضعیت بسیار مطلوب تر و متنوع تری دارد به گونه ای که بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ گونه ماهی در این دریا زندگی می کنند که از تعداد زیادی از این ماهیان بهره برداری اقتصادی می شود. همچنین علاوه بر ماهی ها، ۳۰۰ تا ۴۵۰ نوع دیگر آبزیان نیز در این دریا زیست دارند که این عامل خلیج فارس را از نظر تنوع زیستی جزء مناطق کم نظیر و پرتنوع معرفی کرده است (نبوی، ۱۳۸۵).

خلیج فارس به عنوان یکی از زیستگاه های مرجان های دریایی است اما طی چند سال اخیر به دلیل صید بی رویه توسط غواصان و افراد سودجو و فروش آنها، مورد تهدید جدی واقع شده است. احداث اسکله های نفتی و باراندازها و به دنبال آن افزایش غلظت آب، موجب نابودی و خفه شدن مرجان ها در خلیج فارس می شود، به طوری که این موجودات دیگر قادر نیستند که غذای خود را از آب تامین کنند. همچنین، تمام مرجان های اطراف جزیره قشم بر اثر توسعه شهری و ورود فاضلاب های شهری و صنعتی دچار مرگ تدریجی شده اند و امروزه کمتر می توان آنها را مشاهده نمود (نبوی، ۱۳۸۵).

بر اساس مصوبه اجلاس شورای عالی وزرای محیط زیست سازمان راپمی (سازمان منطقه ای خلیج فارس) سازمان حفاظت محیط زیست ایران، مرکز منطقه ای تنوع زیستی خلیج فارس و دریای عمان را برای ۸ کشور ایجاد می کند. این مرکز تنوع زیستی برای ۸ کشور حاشیه خلیج فارس و دریای عمان در بندرعباس ایجاد خواهد شد. همان طور که مرکز میمک بحرین برای آلودگی های نفتی تمام منطقه دریاست این مرکز تنوع زیستی نیز با مرکزیت ایران برای کل کشورهای حاشیه است (نبوی، ۱۳۸۵).

۳-۱- تنوع ژنتیکی

تنوع ژنتیکی، هم تنوع درون نژادی و هم تنوع بین نژادی را شامل می شود. اصلاح نژادگران از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی منطبق بر احتیاجات خود، بهره گیری می نمایند. فقدان تنوع قدرت انتخاب موجود برای رفع نیازهای غیرقابل پیش بینی آتی را محدود می سازد. تنوع درون نژادی پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است ولی تنوع ژنتیکی بین نژادی را نمی توان براحتی بازسازی نمود. هر نژاد یا سویه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است. فشار انتخاب در طی این زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل ها و بیماری های بومی، تغذیه و معیارهای وضع شده از

سوی انسان تغییر کرده است. بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژن‌ها است که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند (Templeton, 2004).

در کشورهای پیشرفته، تاکنون از نظر از دست رفتن تنوع ژنتیکی بیشترین توجه به نژادهای نادر معطوف بوده است. ولی در مدیریت جهانی منابع ژنتیکی حیوانی، نژادهای در معرض خطر و سایر نژادها تفاوتی اساسی ندارند و تفاوت میان نژادهای کم کاربرد یا بدون کاربرد و نژادهای دارای کاربرد رایج یا دارای کاربرد احتمالی در آینده‌ای نزدیک، اندک می‌باشد. با حفظ نمونه‌هایی از تمامی نژادهای یک گونه که دارای بیشترین تفاوت ژنتیکی می‌باشند، می‌توان حداکثر تنوع ژنتیکی را حفظ نمود. این نمونه‌ها نژادهایی را شامل می‌گردند که دارای آلل‌ها یا ترکیبات آللی منحصر به فرد می‌باشند. شرح کامل تفاوت ژنتیکی بین هر دو نژاد امکان پذیر نیست ولی معیارهای فاصله ژنتیکی بهترین شرح در دسترس برای بیان تفاوت ژنتیکی آنها می‌باشند. معیارهای فاصله ژنتیکی متعددی پیشنهاد شده‌اند ولی همه آنها به داده‌های مربوط به فراوانی آللی نیازمندند (Templeton, 2004).

اگر دو جمعیت در برخی جایگاه‌ها توزیع فراوانی آللی یکسانی داشته باشند، فاصله ژنتیکی بین آنها در آن جایگاه‌ها صفر خواهد بود. وقتی دو جمعیت برای آلل‌های متفاوتی تثبیت شده باشند، فاصله ژنتیکی برای یک جایگاه ژنی حداکثر مقدار ممکن می‌باشد. هنگامی که داده‌های مربوط به فراوانی آللی برای جایگاه‌های متعددی وجود داشته باشد، برآورد فاصله بصورت متوسط این جایگاه‌ها بدست می‌آید. معیارهای فاصله ژنتیکی در سطح گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک تکاملی برای شرح ساختار ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه یا برای تعیین روابط تکاملی در بین گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Templeton, 2004).

۱-۳-۱- منابع تنوع ژنتیکی

در هر جمعیت سه منبع تنوع یعنی جهش، نوترکیبی و جریان ژنی وجود دارند. در این میان، نوترکیبی به خودی خود تنوعی ایجاد نمی‌کند مگر آنکه آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف، متفاوت باشند، در غیر این صورت چیزی برای نوترکیب شدن وجود نخواهد داشت. به همین دلیل، اگر تمام افراد گونه برای یک آلل، هموزیگوت باشند جریان ژنی نیز تنوعی ایجاد نخواهد کرد، لذا در چنین جوامعی جهش منبع اصلی تنوع خواهد بود. عواملی همانند تغییرات محیطی، برداشت و ذخیره و پرورش ماهیان، می‌توانند باعث کاهش تنوع ژنتیکی ماهیان شوند.

ساخت سدها، انحراف مسیر آب، آلودگی و اسیدی شدن آبها و معرفی گونه‌های غیر بومی نمونه‌هایی از تغییرات محیطی می‌باشند. پرورش ماهیان می‌تواند مشکلاتی مثل رواج بیماری، هیبرید شدن، دستکاری‌های آماری و اختلاط ژنومی بین موجودات را به همراه دارد. برداشت ماهیان نیز چه به صورت برداشت بیش از حد، انتخاب گونه‌های خاص، برداشت دسته جمعی و دستکاری‌های آماری، می‌توانند در کاهش تنوع ژنتیکی دخیل باشند (نویدی، ۱۳۸۵).

در صورتی که جوامع موجودات کوچک باشند، آنگاه به دلیل خطای نمونه‌برداری، خزانه ژنی موجود، نمی‌تواند نماینده دقیق نسل بعد باشد. به عبارتی به تغییرات تصادفی فراوانی ژن‌ها در جوامع کوچک، رانش ژنتیکی اطلاق می‌شود. رانش ژنتیکی^۱ می‌تواند منجر به افزایش هموزیگوسیت‌ها و در نتیجه کم شدن فراوانی هتروزیگوت‌ها، کاهش قابلیت باروری و تنوع گردد (نویدی، ۱۳۸۵).

۴-۱- تعاریف و اصطلاحات

۴-۱-۱- فراوانی آللی

آلل‌های واقعی در حقیقت تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی است و آلل‌های موثر بیانگر تعداد آلل‌هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌کنند. در شرایطی که همه آلل‌ها دارای فراوانی یکسان بوده و با آلل‌های نادر ($P \leq 0.01$) تحت تاثیر قرار نگیرند تعداد آلل‌های موثر در یک جمعیت برابر تعداد آلل‌های واقعی خواهد بود (نوروزی، ۱۳۸۵).

فراوانی آللی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۱

$$\text{فراوانی آللی} = (2N_{xx} + N_{yx}) / 2N$$

در این فرمول N تعداد نمونه‌ها، N_{xx} تعداد افراد هموزیگوس و N_{yx} تعداد افراد هتروزیگوس می‌باشد.

تعداد آلل‌های موثر (n_e) را با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

¹ Genetic drift

فرمول ۱-۲

$$n_e = 1 / \sum P_i^2$$

که در آن P_i فراوانی هر یک از آلل‌هاست. این معیار را بیشتر به دلیل حساسیت کم آن به اندازه نمونه مورد استفاده قرار می‌دهند.

۲-۴-۱- تنوع هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی

مطالعه تغییرات در جوامع مشخص کننده وسعت تنوع ژنی می‌باشند. راه‌های مختلفی برای بررسی وجود دارد که ساده‌ترین آن اندازه‌گیری فراوانی آلل‌ها یا ژنوتیپ‌ها می‌باشد. فراوانی هتروزیگوت‌ها از این جهت اهمیت دارد که هر هتروزیگوت ناقل آلل‌های متفاوتی است و این نشان دهنده وجود تنوع می‌باشد. به همین دلیل معمول‌ترین معیار تنوع ژنی در یک جمعیت میزان هتروزیگوسیتی می‌باشد. این معیار اغلب برای یک مکان ژنی و یا میانگین تعدادی مکان ژنی گزارش می‌شود (نوروزی، ۱۳۸۵).

هتروزیگوسیتی مشاهده شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۳

$$H_o = N_{yx} / N$$

در این فرمول H_o هتروزیگوسیتی مشاهده شده، N تعداد نمونه‌ها و N_{yx} تعداد آلل‌های هتروزیگوس می‌باشد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۲-۴

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

که در آن H_e هتروزیگوسیتی مورد انتظار و P_i فراوانی هر یک از آلل‌هاست.

۳-۴-۱- شاخص شانون^۱

از آنجا که حد نهایی هتروزیگوسیتی برای هر تعدادی از آلل‌ها یکسان (برابر ۱) می‌باشد، معیار هتروزیگوسیتی حساسیت زیادی به افزایش تنوع ندارند. این محدودیت تفکیک بین جمعیت‌ها را با استفاده از جایگاه‌های بسیار متغیر همچون ریزماهورها (با هتروزیگوسیتی ۰/۸ یا بیشتر) دشوار می‌سازد. با وجود اینکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد (بنابازی، ۱۳۸۱).
شاخص اطلاعات شانون با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Yeh et al., 1999).

فرمول ۱-۵

$$I = -\sum P_i \ln P_i$$

که در آن P_i فراوانی i امین آلل در یک جایگاه ژنی معین می‌باشد. بر خلاف هتروزیگوسیتی که برای هر تعداد آلل حد نهایی یک را دارد، مقدار I برابر $\ln(n)$ می‌باشد.

۴-۴-۱- تعادل هاردی- واینبرگ

فرضیه چگونگی توزیع ژن‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف در یک جمعیت در سال ۱۹۰۸ مستقلاً به وسیله دو دانشمند انگلیسی و آلمانی با نام‌های هاردی (Hardy) و واینبرگ (Weinberg) ارائه گردیده است و تنها در جوامعی صادق است که دارای شرایط زیر باشند.

الف) جفت‌گیری در این جوامع تصادفی باشد.

ب) جهش در ژن‌های مورد مطالعه نادر بوده و میزان جهش در دو آلل تقریباً برابر باشد.

ج) تعداد افراد جمعیت نسبتاً زیاد باشد به طوری که شانس عامل مهمی در تغییر فراوانی ژن‌ها نباشد.

د) تولید مثل و قابلیت زندگی ژنوتیپ‌های مختلف تحت مطالعه مساوی باشد به عبارت دیگر ژنوتیپ‌های مختلف دارای ارزش‌های متفاوتی از نظر انتخاب طبیعی نباشند.

بر اساس قانون هاردی- واینبرگ در جمعیتی که شرایط فوق صادق باشد نسبت گامت‌های تولید شده متناسب با فراوانی ژن‌ها در جمعیت خواهد بود. اولین مرحله تجزیه و تحلیل در هر جمعیت، آزمون تعادل هاردی واینبرگ

¹ Shannon Index

است، وقتی یک جمعیت نسبت‌های هاردی‌واینبرگ را دارد، ضریب عدم تعادل D_A برابر صفر است، که این همان آزمون برای تعادل هاردی‌واینبرگ یا آزمون فرض می‌باشد ($H: D_A = 0$). تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای χ^2 و آزمون نسبت درست‌نمایی G^2 مورد بررسی قرار می‌گیرد (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱). تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای χ^2 و فرمول زیر محاسبه گردید (Yeh *et al.*, 1999).

فرمول ۱-۶

$$\chi^2 = \sum (\mathbf{O} - \mathbf{E})^2 / \mathbf{E}$$

که در آن \mathbf{O} ژنوتیپ مشاهده شده و \mathbf{E} ژنوتیپ مورد انتظار در افراد و در یک جایگاه ژنی معین می‌باشد.

۵-۴-۱- درجه تمایز ژنتیکی F_{ST} و R_{ST}

F_{ST} با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۷

$$F_{ST} = (\mathbf{H}_T - \mathbf{H}_e) / \mathbf{H}_T$$

که در آن \mathbf{H}_T هتروزیگوسیتی کل و \mathbf{H}_e هتروزیگوسیتی مورد انتظار می‌باشد.

F_{ST} بر حسب AMOVA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۸

$$F_{ST} = (\mathbf{V}_{AP} + \mathbf{V}_{AR}) / (\mathbf{V}_{WP} + \mathbf{V}_{AP} + \mathbf{V}_{AR})$$

که در آن \mathbf{V}_{AP} اختلاف بین جمعیت‌ها، \mathbf{V}_{AR} اختلاف بین مناطق و \mathbf{V}_{WP} اختلاف داخل جمعیت‌ها می‌باشد.

R_{ST} با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۹

$$R_{ST} = \mathbf{V}_{AP} / (\mathbf{V}_{WP} + \mathbf{V}_{AP})$$

که در آن \mathbf{V}_{AP} اختلاف بین جمعیت‌ها، \mathbf{V}_{AR} اختلاف بین مناطق و \mathbf{V}_{WP} اختلاف داخل جمعیت‌ها می‌باشد.

۶-۴-۱- فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی طرحی است که برای بیان تفاوت میان جمعیت‌ها مطرح می‌شود. اگر هیچ تفاوتی وجود نداشته باشد فاصله ژنتیکی صفر خواهد بود و اگر جمعیت‌ها در هیچ یک از مکان‌های ژنی آلل مشترک نداشته باشند فاصله ژنتیکی حداکثر یعنی مساوی یک خواهد بود (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱).

فاصله ژنتیکی (Nei (1972) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۱۰

$$Nei = J_{xy} / \sqrt{(J_x J_y)}$$

که در آن Nei فاصله ژنتیکی و J_x ، J_y ، J_{xy} فراوانی هر آلل در جمعیت x و y می‌باشد.

۷-۴-۱- جریان ژنی^۱

میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل گفته می‌شود. هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و تمایز ژنتیکی کمتر است. بطور معمول جریان ژنی زیاد میان جمعیت‌ها موجب محدود کردن مهلت برای ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی شده و از ظهور گونه‌های جدید ممانعت می‌کند. از آنجایی که پدید آمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت‌های جدا یا نسبتاً جدا از یکدیگر می‌باشد، بنابراین بطور قطع می‌توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه زایی ارتباط برقرار نمود (نوروزی، ۱۳۸۵).
جریان ژنی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

فرمول ۱-۱۱

$$N_m = [(1/F_{ST}) - 1] / 4$$

که در آن N_m جریان ژنی یا تعداد مهاجرت کنندگان در هر نسل و F_{ST} درجه تمایز ژنتیکی جمعیت را نشان می‌دهد در N ، N_m اندازه جمعیت و m نسبت مهاجرت کنندگان را در هر نسل نشان می‌دهد.

^۱ Gene flow

۸-۴-۱- فیلوژنی^۱

تاکسونومی یا علم طبقه بندی انواع موجودات زنده را به گروه‌های بسیار زیادی تقسیم می‌نماید به نحوی که اعضاء هر یک از این گروه‌ها ویژگی‌های یکسان یا مشابهی دارند و بدین ترتیب امکان طبقه بندی گونه‌ها فراهم می‌شود. در مطالعات تکاملی، طبقه بندی شامل تشکیل فیلوژنی نیز می‌گردد، درختان فیلوژنتیک مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آنها برای درک روابط تکاملی استفاده نمود. به عبارت دیگر هر چه موجودات مورد بررسی مشابهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیکتری دارند. در بیشتر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود. از آنجایی که چنین داده‌هایی (در مقایسه با داده‌هایی مانند داده‌های ریخت‌شناختی) کمتر تحت تأثیر نتایج انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنتیکی واقعی را بازتاب دهند. درختان فیلوژنتیک شامل گره‌ها و شاخه‌های متصل به این گره‌ها می‌باشند. گره‌های خارجی یا پایانی گروه‌ها را نشان می‌دهند و گره‌های داخلی گروه‌های خویشاوند را به هم پیوند می‌دهند. الگوی شاخه بندی یک درخت فیلوژنتیک موضع‌شناسی (توپولوژی) آن درخت نامیده می‌شود. معمولاً برای نشان دادن میزان انشقاق گروه‌ها، طول شاخه‌هایی که آنها را به هم متصل می‌کنند مقیاس بندی می‌شود (بنابازی، ۱۳۸۱).

بر اساس یک نوع تقسیم بندی، دو نوع درخت فیلوژنتیک وجود دارد. درختان بی ریشه^۲ تنها فواصل بین واحدها را بدون تعیین اینکه کدامیک جد دیگری است، ارائه می‌دهند در حالیکه درختان ریشه دار^۳ تصویری از ترتیب موقتی گونه‌ها بر روی یک درخت ارائه می‌دهند. برای تشکیل درخت فیلوژنتیک روش‌های متعددی وجود دارد که در اینجا دو روش مبتنی بر ماتریس فاصله که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند، شرح داده می‌شوند.

۹-۴-۱- روش پیوند همجواری^۴ (NJ)

این روش در سال ۱۹۸۷ توسط Saitou و Nei ارائه گردید و اساس این روش حداقل نمودن طول کل درخت می‌باشد. همجواریها جفت‌هایی هستند که وقتی به هم اتصال می‌یابند، درختی با کوتاهترین طول تشکیل

^۱ Phylogeny^۲ Unrooted^۳ Rooted^۴ Neighbor-joining Method (NJ)

می‌گردد. از آنجایی که این روش بر خلاف روش UPGMA میزان تکامل متفاوت در تبارهای مختلف را منظور می‌نماید، برگزیده‌ترین روش برای اکثر داده‌های مولکولی می‌باشد. به منظور رسیدن به درختی با کوتاه‌ترین طول، تشخیص همجواریها مرحله به مرحله پیش می‌رود. بر روی درخت حاصله، فاصله بین هر جفت واحد تاکسونومیکی مجموع طول شاخه‌هایی است که آن دو را به هم متصل می‌سازد و بدون ریشه‌اند (بنابازی، ۱۳۸۱).

۱۰-۴-۱- روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی^۱ (UPGMA)

در این روش برای تمام تبارها یک نرخ تکاملی ثابت در طول زمان فرض می‌شود و بدین ترتیب طول شاخه‌ها نصف فاصله ژنتیکی بین دو گروه می‌باشند. فهم این روش ساده است و در این روش دو واحدی که فاصله میان آنها در ماتریس فاصله کمترین است یک خوشه را تشکیل می‌دهند. آنگاه فاصله سایر واحدها از این خوشه بصورت میانگین فاصله بین آنها و هر یک از اعضاء این خوشه بدست می‌آید و سپس واحدی که کمترین فاصله را از خوشه حاصله دارد همراه با خوشه قبلی خوشه بندی می‌گردد و این روند تا خوشه بندی تمام واحدها ادامه می‌یابد. در این روش نیز برای بدست آوردن فاصله دو گروه بر روی درخت حاصله می‌توان طول شاخه‌هایی که آنها را به هم متصل ساخته‌اند با هم جمع نمود (بنابازی، ۱۳۸۱).

هنگامی که تعداد گروه‌ها زیاد باشد، تعداد بسیار زیادی موضع شناسی درختی وجود دارد و بنابر این تعیین تأیید آماری قسمت‌های مختلف درخت لازم است. معمولترین روش تعیین سطح اطمینان آماری برای یک گره خاص در درخت فیلوژنتیک، محاسبه مقادیر خود راه انداز^۲ می‌باشد. در این روش برای رسیدن به سطوح آماری معنی دار، مجدداً از روی داده‌های اصلی بطور تصادفی نمونه برداری می‌شود. برای ایجاد یک نمونه خودراه انداز از روی یک نمونه اصلی n عضوی ابتدا n عدد تصادفی بین صفر تا یک ایجاد و سپس هر کدام در n ضرب می‌گردد و حاصلضرب به نزدیکترین عدد صحیح گرد می‌شود. این اعداد صحیح جدید شماره نمونه‌هایی از نمونه‌های اصلی است که در نمونه خود راه انداز حضور خواهند داشت. با هر نمونه خود راه انداز نیز یک درخت فیلوژنتیک رسم می‌گردد و موضع شناسی آن بررسی می‌شود این فرآیند چندین بار (معمولاً ۱۰۰۰ بار)

¹ Unweighted Pair- Group Method using an Arithmetic Average (UPGMA)

² Bootstrapping

تکرار می‌شود. در درخت نهایی، گروه‌هایی که بیشترین درصد دفعات حضور در نمونه‌های خودراه انداز را دارند، حضور داشته و درصد مربوطه بر روی گره مورد نظر نشان داده می‌شود (بنابازی، ۱۳۸۱).

۱-۵- روش‌های حفظ تنوع ژنتیکی^۱

تنوع ژنتیکی بوسیله انقراض جمعیت‌ها و فقدان تنوع در درون جمعیت‌های محدود از بین می‌رود و نسبت مورد انتظار تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی یا H_t) که در داخل یک جمعیت پس از t نسل باقی می‌ماند را می‌توان از فرمول ۱-۱ بدست آورد.

فرمول ۱-۱۲

$$H_t = H_0 [1 - 1 / (2N_e / N)]^t$$

که در آن H_0 هتروزیگوسیتی اولیه، N اندازه جمعیت، N_e اندازه جمعیت موثر و t تعداد نسل می‌باشد. در نتیجه حفظ هتروزیگوسیتی از طریق زیر حداکثر می‌گردد.

۱- حداکثر نمودن هتروزیگوسیتی اولیه: حداکثر نمودن هتروزیگوسیتی اولیه از طریق تشکیل جمعیت‌ها با تعداد بالا بدست آید بایستی تا حد امکان جمعیت‌هایی که سطوح بالائی از تنوع را دارند انتخاب شوند.

۲- حداقل نمودن تعداد نسل: تعداد نسل را می‌توان از طریق افزایش فاصله نسل یا از طریق استفاده از انجماد اسپرم حداقل نمود. فنآوری‌هایی از قبیل انجماد اسپرم و جنین، فرصت‌هایی را برای حداقل کردن کاهش ژنتیکی فراهم می‌کند.

۳- حداکثر نمودن اندازه جمعیت

۴- حداکثر نمودن نسبت اندازه جمعیت موثر به اندازه جمعیت یا N_e/N (Targon *et al.*, 2000)

اندازه جمعیت موثر نه تنها به اندازه سرشماری شده بلکه به تنوع اندازه خانواده، نابرابری نسبت جنسی و نوسانات تعداد در طی نسل‌ها بستگی دارد و یکسان سازی اندازه خانواده^۲ باعث افزایش جمعیت موثر خواهد شد (جوآنروح علی آباد، ۱۳۸۱).

^۱ Genetic Variation

^۲ Equalization of family size

۶-۱- نشانگرهای ژنتیکی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیتی و روابط خویشاوندی

هر فنوتیپ یا صفت (قابل توارث) موجود زنده که با صفت معادل خود در موجود زنده دیگر تفاوت داشته باشد یک نشانگر محسوب می‌شود. نشانگرهای ژنتیکی جایگاه‌های خاص روی یک کروموزوم دارند که به عنوان نشانه‌های اختصاصی برای تجزیه و تحلیل‌های ژنومی به خدمت گرفته می‌شوند. در واقع تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم در افراد یک جامعه و یا نژاد که از افراد به نتاج آنها منتقل می‌گردد می‌تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شود. نشانگرهای ژنتیکی به عنوان ابزاری برای تهیه نقشه‌های پیوستگی مولکولی و ارزیابی جایگاه‌های ژنتیکی چند شکلی در صفات اقتصادی کمی کاربردهای بالقوه‌ای را در برنامه‌های اصلاحی حیوان و گیاه پیدا کرده‌اند. هر آنچه که در میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف به لحاظ ژنتیکی تفاوت داشته و سبب تمایز آنها از یکدیگر گردد به عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می‌شود. چند شکلی بودن و توارث پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی می‌باشند. از مهمترین ویژگی‌های یک نشانگر برتر می‌توان به این موارد اشاره نمود:

۱- تشخیص آسان همه فنوتیپ‌های ممکن (افراد هتروزیگوت و افراد هموزیگوت)

۲- نداشتن تاثیر بر روی آلل‌های موجود در سایر جایگاه‌های ژنی نشانگر (نداشتن اپیستازی)

۳- تظاهر در مراحل اولیه نمو

۴- حداقل بودن یا عدم اثر متقابل با نشانگرهای دیگر

۵- پیوستگی بسیار نزدیک با ژن‌های مورد نظر

۶- توارث پذیری کامل

۷- آسان بودن اندازه گیری (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱).

۱-۷-۱- انواع نشانگرها

۱-۷-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی^۱

نشانگرهای مورفولوژیکی به علائمی از قبیل فلس‌ها، اتولیت‌ها، پارازیت‌ها و ترکیب عنصری قسمت‌های مختلف بدن گفته می‌شود که به طور مستقیم در فنوتیپ جانور و گیاه قابل تشخیص و توارث پذیر هستند. طول کل، طول چنگالی، طول پوزه، ارتفاع سر، قطر چشم، و ... چند نمونه از صفات مورفولوژیک قابل اندازه‌گیری در ماهیان می‌باشند (صفری، ۱۳۸۵).

اگر چه نشانگرهای مورفولوژیکی به طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند ولی دارای محدودیت‌های اساسی همچون تعداد کم این نشانگرها، دقت کم، تاثیرپذیری شدید از محیط، مرحله رشد و سن و وجود غالبیت در بروز می‌باشند. اساس و تفسیر ژنتیکی بسیاری از این نشانگرها نامشخص بوده و شناسایی افراد ناخالص از خالص ممکن نیست، اما به دلیل ساده و کم هزینه بودن و عدم نیاز به امکانات پیچیده و گران قیمت برای اندازه‌گیری‌ها محققین بسیاری از این نشانگرها استفاده می‌نمایند (صفری، ۱۳۸۵).

۱-۷-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی

وجود اختلاف در شکل، اندازه و تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند بیانگر وجود اختلاف ژنتیکی باشد. بنابر این، این نشانگرها نمایانگر تنوع در ساختمان کروموزوم‌ها می‌باشند. تلوسانتريک‌ها، ایزوکروموزوم‌ها، جابجایی و الگوهای بایندينگ از این گروه هستند. مطالعات سیتوژنتیکی به منظور مقایسه اختلافات موجود بین افراد یک گروه و آشکار شدن مسیر تکاملی تغییرات در کروموزوم‌های تشکیل دهنده ژنوم، تفکیک گونه‌ها و بعضاً جمعیت‌های مختلف از نظر تعداد و نوع کروموزوم‌ها انجام می‌گیرد (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱).

۱-۷-۳- نشانگرهای مولکولی^۲

هرگونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNA که از والدین به نتاج قابل انتقال باشد به عنوان نشانگر مولکولی به کار گرفته می‌شود و به دو دسته نشانگرهای مبتنی بر پروتئین و نشانگرهای مبتنی بر DNA تقسیم می‌شوند.

¹ Morphological Markers

² Molecular Markers

۱-۷-۳-۱- نشانگرهای پروتئینی

برخی از تفاوت‌ها در ترتیب نوکلئوتیدی DNA بین دو موجود ممکن است که به صورت پروتئین‌هایی با اندازه‌های مختلف بروز کند که از طریق بیوشیمیایی قابل آنالیز و مطالعه است. این نشانگرها را نشانگر پروتئینی می‌گویند که به دو نوع آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند. مطالعات ابتدائی برای شناسایی جمعیت‌های ماهی با استفاده از نشانگرهای غیر آنزیمی مثل هموگلوبین و ترانسفرین بود که به سرعت به سمت پروتئین‌های آنزیمی تمایل پیدا کرد (Ferguson *et al.*, 1995).

آنزیم‌های موجود در هر فرد ممکن است دارای بیش از یک فرم مولکولی باشند. فرم‌های مولکولی متفاوت یک آنزیم در یک فرد را ایزوزایم می‌نامند. ساختمان اولیه ایزوزایم‌ها از این جهت متفاوتند که به وسیله ژن‌های متفاوت کدگذاری می‌شوند و در نتیجه چنین ساختمان مولکولی متفاوت یک آنزیم که دارای فعالیت آنزیمی (کاتالیزوری) یکنواخت و مشخص هستند را اصطلاحاً ایزوزایم گویند. محصولات ایزوزایم دو آلل متفاوت در یک جایگاه ژنی به عنوان آلوزایم شناخته می‌شوند. به عبارت بهتر آلوزایم‌ها به زیر گروهی از ایزوزایم‌ها اطلاق می‌شوند که از آلل‌های مختلف یک جایگاه ژنی معین ایجاد می‌شوند. هنگامی که دو آلل از یک جایگاه ژنی بوجود می‌آیند، شکل‌های مختلف الکتروفورتیکی هنوز نقش‌های معینی را ایفاء می‌کنند و پروتئین‌های حاصل از این آلل‌ها تحت عنوان آلوزایم شناخته می‌شوند (Carvalho, 1998).

از عیوب نشانگرهای پروتئینی می‌توان به نیار به مقدار زیادی نمونه تازه یا تازه فریز شده (کشتن موجود زنده)، پلی‌مورفیسم پائین، محدودیت روش‌های رنگ آمیزی و مشکل بودن آنالیز داده‌ها بخصوص در پلی‌پلوئیدها اشاره کرد (Ferguson *et al.*, 1995).

۱-۷-۳-۲- نشانگرهای DNA

تفاوت‌های موجود در سطح DNA که هیچ گونه تظاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می‌کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینه رشته‌های پلی‌پلوئیدی تاثیر بر جا می‌گذارند در واقع نشانگرهای DNA چند شکلی موجودات را در سطح DNA تعیین می‌کنند. این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می‌کنند و در نتیجه

توالی‌های کدکننده و غیر کدکننده را در بر می‌گیرد. بررسی اینگونه تفاوت‌ها که فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم DNA امکان پذیر است و به آنها نشانگرهای مولکولی در سطح DNA گویند (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱). فراوانی بالا، هم بازر بودن اکثر این نشانگرها، امکان به کارگیری آنها در تمام مراحل زندگی حتی دوران جنینی، عدم تاثیر از شرایط محیطی، امکان استفاده از نرم افزارهای رایانه‌ای مختلف در آنالیز داده‌ها، قدرت تمایز بالای این نشانگرها و نمایان ساختن تفاوت بین ترتیب‌های غیر کدکننده علاوه بر اختلاف موجود در ترتیب‌های کدکننده از مزایای این نشانگرها می‌باشد. این نشانگرها به دو دسته مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند. انواع مختلفی از این نشانگرها، با تفاوت‌های بسیاری از لحاظ تکنیکی، روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازبندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع گردیدند و تحولی عظیم در اطلاعات تنوع ژنتیکی ایجاد کرده‌اند (قره یاضی، ۱۳۷۵) و به عنوان ابزارهای ضروری در ایجاد اهدافی چون نگهداری بیولوژیک مطالعات تکاملی و نیز پروژه‌های نقشه برداری ژنی در آمده‌اند (دانشور آملی، ۱۳۸۳). از ۲۴ سال گذشته توجه به نشانگرهای DNA افزایش پیدا کرده، در ابتدا DNA میتوکندریائی و سپس تکنیک‌های مولکولی پیشرفت کرده و به سمت DNA هسته‌ای سوق پیدا کرده است (Ferguson *et al.*, 1995).

۱-۲-۳-۷-۱- مواد ژنتیکی خارج کروموزومی^۱ (mtDNA)

اندازه mtDNA در اکثر ماهیان حدود 16500 ± 500 جفت باز می‌باشد و در گونه‌های جانوری ژنوم میتوکندری دارای ۳۷ ژن که شامل ۱۳ ژن رمز دهنده پروتئین، ۲۲ ژن rRNA و یک ناحیه بعنوان آغاز همانندسازی می‌باشد (Rezvani Gilkolaei, 1997).

Botstein و همکاران در سال ۱۹۸۰ روش تفاوت طول قطعات حاصل از هضم یا RFLP^۲ را برای مطالعه مستقیم DNA به عنوان نشانگرهای ژنتیکی جدید معرفی نمودند. اساس مولکولی RFLPها وجود یا عدم وجود نقاط قابل تشخیص آنزیم‌های محدود کننده به علت وقوع جهش‌های نقطه‌ای، حذف، اضافه و یا معکوس شدن قطعه‌ای از کروموزوم و یا سایر تغییرات ژنی - کروموزومی می‌باشد.

^۱ Mitochondrial DNA

^۲ Restriction Fragment Length Polymorphism

۲-۲-۳-۱-۷-۱-مواد ژنتیکی کروموزومی

۱-۲-۳-۲-۲-۱-RAPD^۱

در زمانی کمتر از یکسال دو گروه مستقل (Williams *et al.*, 1990; Welsh and Mecllland, 1990) روش جدیدی را برای ارزیابی پلی مورفیسم بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در انستیتوی تحقیقاتی بیولوژیک کالیفرنیا ارائه کردند. این تکنیک انگشت نگاری قابل تشخیص ژنوم بدون استفاده از سیستم‌های رادیواکتیو و توالی یاب DNA ژنوم را برای ارزیابی پلی مورفیسم بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز فراهم کرد. هر چند اساس این دو تکنیک یکسان بوده است ولی Welsh و Mecllland در سال ۱۹۹۰ آنرا AP-PCR^۲ و Williams و همکاران در سال ۱۹۹۰ آنرا RAPD نامیدند. روش AP-PCR مشابه با RAPD بوده و در هر دو از یک آغازگر استفاده می‌شود ولی غلظت آغازگر مورد استفاده در آن حدود ۱۰ برابر بیشتر است. پلی مورفیسم مشاهده شده به دلیل تفاوت توالی در یک یا هر دو جایگاه ژنی اتصال آغازگر است که در صورت حضور یا فقدان یک باند متجلی می‌شود. آغازگرهای RAPD مختص به ژنوتیپ، گونه و جنس خاص نیست و قابل استفاده در تمام موجودات می‌باشد. امکان بررسی همزمان بیش از یک مکان ژنی در این تکنیک وجود دارد. این روش گرچه آسان و کم هزینه است ولی معایب فراوانی دارد که از جمله آن می‌توان به عدم تکرار پذیری نشانگرهای RAPD، حساسیت فوق‌العاده به آلودگی، عدم تشخیص سیستم آللی (به دلیل غالب و مغلوبی بودن RAPD تشخیص هموزیگوتی و هتروزیگوتی غیر ممکن است)، امتیازدهی باندها و نامعلوم بودن قرابت و شباهت باندهائی که بر روی ژل الکتروفورزی دارای مهاجرت یکسان هستند، اشاره نمود (Phillips and Vasil, 2001).

۲-۲-۳-۲-۲-۲-AFLP^۳

Vos و Zabeau در سال ۱۹۹۳ روش جدیدی را تحت عنوان قطعات برش یافته انتخابی ابداع نمودند که حاصل آن نشانگر AFLP است. این نشانگر ژنتیکی بر اساس آنالیز قطعات برش یافته DNA بنیان نهاده شده است که در آن از تکنیک DNA برای تکثیر قطعات مورد نظر و شناسائی آن استفاده می‌شود به علت استفاده از واکنش PCR، این

^۱ Random Amplification Polymorphic DNA

^۲ Arbitrary Primed DNA

^۳ Amplified Fragment length Polymorphism

تکنیک متفاوت از روش RFLP می‌باشد، در حقیقت این روش ترکیبی از AFLP و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز است در مرحله اول DNA مورد نظر توسط دو آنزیم برش دهنده هضم می‌شود به طوری که دو انتهای برش یافته دارای فرم برشی متفاوت می‌باشند. سپس دو آداپتور (DNA دو رشته‌ای به طول حدود ۱۸ جفت باز که یکی از آنها از انتهای آن مکمل دو انتهای برش یافته باشد) به دو انتهای برش یافته اتصال می‌یابد. در مرحله بعد با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی آداپتورها (حدود ۲۰ جفت باز) قطعات مورد نظر تکثیر می‌شوند که دارای تکرار پذیری بالایی هستند و در یک واکنش مناسب بین ۵۰ تا ۱۰۰ باز قابل تشخیص است. بر این اساس مقدار زیادی باند پلی‌مورفیک جهت بررسی تنوع ژنتیکی یا تهیه نقشه ژنتیکی امکان پذیر است. نشانگر AFLP غالب است و شناسایی وضعیت هتروزیگوتی از هموزیگوتی میسر نیست (Phillips and Vasil, 2001).

۳-۲-۳-۲-۳-۱- ماهواره‌ها^۱

DNA ماهواره‌ای زمانی مطرح گردید که معلوم شد در سانتریفیوژ کلرید سزیم، بخش کوچکی از DNA کل باند ماهواره‌ای تشکیل می‌دهد که از باند ژنومی اصلی جدا قرار می‌گیرد که این بخش کوچک دارای توالی‌های ساده‌ای هستند که کمتر از ۵۰۰ جفت باز دارند که هزاران یا میلیون‌ها بار تکرار می‌شوند بعدها انواع دیگری از DNA ماهواره‌ای با واحدهای تکراری بسیار کوتاهتر در طول توالی‌یابی ژن انسولین انسانی کشف گردید که تحت عنوان مینی‌ستلایت‌ها^۲ شناخته می‌شوند و شامل واحدهای تکراری ۶۴-۱۵ جفت باز می‌باشند. سومین گروه ریزماهواره‌ها می‌باشند که تحت عناوین STR^۳ یا SSR^۴ شناخته می‌شوند توالی‌های تکراری DNA هستند که دارای نگاره مرکزی یا موتیف تکرار شونده‌ای به طول یک تا شش جفت باز می‌باشند دو گروه اخیر بنام VNTR^۵ نیز شناخته می‌شوند (O'Reilly and Wright, 1995 نقل از صفری، ۱۳۸۵).

^۱ Satellites

^۲ minisatellite

^۳ Short Tandem Repeat

^۴ Simple Sequence Repeat

^۵ Variable Number Tandem Repeat

۴-۲-۲-۳-۷-۱- نشانگرهای ریزماهوره

واژه ریزماهوره در سال ۱۹۸۵ توسط Jeffery مطرح گردید و مفهوم آن توالی‌های کوتاه تکرار شونده در ژنوم موجودات می‌باشد. در دهه گذشته نشانگرهای ریزماهوره بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. علت اصلی کاربرد این نشانگر، قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه و تحلیل‌های جمعیتی و همچنین مطالعات اکولوژیکی می‌باشد. تنوع زیاد، قابلیت رتبه‌دهی آسان، همباز بودن و پراکندگی یکنواخت در سراسر ژنوم از دلایل عمده کاربرد وسیع این نشانگر محسوب می‌شود (صفری، ۱۳۸۵).

فراوانی ریزماهوره‌ها متفاوت و بستگی به اندازه ژنوم دارد. برای مثال برآورد شده که فراوانی ریزماهوره در ژنوم انسان به طور متوسط ۱۰ برابر ژنوم گیاهان است و توزیع ریزماهوره‌ها نه تنها در گونه‌های مختلف متفاوت است بلکه در درون یک ژنوم و در بین کروموزوم‌های مختلف نیز متفاوت است. از لحاظ توزیع و سازماندهی ریزماهوره‌ها در ژنوم‌ها با نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی مشخص شد که ریزماهوره‌ها در یک ناحیه جمع نشده و به طور یکنواخت در نواحی مختلف کروموزوم توزیع شده‌اند. اما با روش هیبریداسیون فلورسنت و هیبریداسیون در ژل، مشخص شد که این توالی‌ها در برخی از قسمت‌های کروموزوم تجمع دارند. به طور کلی توالی‌های مونونوکلوئیدی (poly A/T) فراوانی بیشتری نسبت به (poly C/G) دارند. آنها در نواحی اینترون و درون ژنی فراوانی بیشتری دارند. در ژنوم انسان نیز poly A/T فراوانی بیشتری دارد، اما این نوع ریزماهوره به دلیل بی‌ثباتی در واکنش PCR نشانگر مناسبی نیست (Rico et al., 1997).

در گونه‌های ماهی ریزماهوره‌ها تقریباً هر ۱۰ kbp، یکبار رخ می‌دهند و این در حالی است که ماهوارک‌ها هر ۱۵۰۰ kbp بوقوع می‌پیوندند. این امر باعث می‌شود که در مطالعات مربوط به نقشه‌یابی ژنومی، ریزماهوره‌ها بسیار کارآمدتر باشند. به نظر می‌رسد که هر ژنی حداقل یک ریزماهوره داشته باشد که در یک اینترون^۱ یا در نواحی ۳ یا ۵ کنار ردیف‌گذارنده قرار گرفته‌اند. توزیع ریزماهوره‌ها در سرتاسر ژنوم‌های یوکاریوتی کم و بیش یکنواخت است و لیکن در نواحی‌گذارنده و احتمالاً در تلومرها کمتر یافت می‌شوند. اسامی مختلفی برای شرح ردیف‌های تکراری متوالی بکار برده شده‌اند که از آن جمله می‌توان به تکرارهای ردیفی ساده (SSR) و

^۱ Intron

تکرارهای متوالی کوتاه (STR) اشاره نمود. برای پرهیز از سردرگمی، امروزه اصطلاح ریزماهوره بعنوان بهترین تعریف برای این نوع ردیف‌ها پذیرفته شده است (Tautz *et al.*, 1986).

کارکرد ریزماهوره‌ها را می‌توان به دو دسته رمزگذاری و تنظیم‌کنندگی تقسیم کرد، همچنین این توالی‌ها غالباً مناطق مستعدی برای جهش بوده و بر فرآیندهای سلولی تأثیر می‌گذارند. اطلاعات زیادی بیانگر آن است که SSRs مستقر در نواحی ابتدایی می‌توانند بر بیان ژن موثر باشند. توانایی ریزماهوره‌ها در اتصال به پروتئین‌ها و فعالیت به عنوان افزایش دهنده در بیان ژن از دیگر کارکردهای آنها می‌باشد. ترکیبی از فعالیت تنظیم‌کنندگی و رمزگذاری و نیز میزان بالای جهش این امکان را مطرح می‌کند که ریزماهوره‌ها از منابع عمده تنوع ژنتیکی در یوکاریوت‌ها هستند (نوروزی، ۱۳۸۶).

۱-۴-۲-۳-۷-۱ اشکال مختلف ریزماهوره‌ها

گفتیم که ریزماهوره‌ها ردیف‌هایی هستند که پشت سر هم تکرار می‌شوند و اندازه واحد تکرار شونده بین ۱ تا ۶ جفت باز می‌باشد. ریزماهوره‌ها بر اساس ترتیب توالی و شکل و ساختارشان به چهار گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

- ۱- ریزماهوره‌های کامل^۱: در این گروه یک واحد کامل ریزماهوره پشت سر هم و بدون هیچ تداخلی دیده می‌شود (مانند GTGTGTGTGTGTGT).
- ۲- ریزماهوره‌های ناقص^۲: در این گروه در درون واحدهای ریزماهوره‌ای یک یا دو نوکلئوتید غیر ریزماهوره‌ای مشاهده می‌شود که در ساختمان آن ایجاد تداخل می‌کند (مانند GTGTGTCTGTGTGT).
- ۳- ریزماهوره‌های گسیخته^۳: در این گروه تعداد کمی جفت باز که بیش از دو نوکلئوتید هستند و با ساختمان تکراری توالی جور نیستند باعث گسیختگی ریزماهوره‌ای می‌شوند (مانند GTGTGTCCCCTGTGTGT).
- ۴- ریزماهوره‌های مرکب یا ترکیبی^۴: در این گروه نیز دو ساختار یا بیش از آن پشت سر هم و یا یکی در درون دیگری قرار گرفته است (مانند GTGTGT GCGCGCGC) (Gold steine and Schlotterer, 1998).

¹ Perfect microsatellite

² Imperfect microsatellite

³ Interrupted microsatellite

⁴ Compound microsatellite

۲-۴-۲-۲-۳-۱-۷-۱- چندشکلی^۱ در ریزماهورها

تنوع تعداد واحدهای تکرار شونده در ریزماهورها، چند شکلی بسیار بالای آنها را سبب می‌گردد. این تنوع خود ناشی از نرخ بالای جهش در این نشانگرها است که یکی از خصوصیات مهم ریزماهورها می‌باشد. میزان جهش در این جایگاه‌ها 10^{-9} تا 10^{-10} جهش در هر نسل است و با بلند شدن رشته ریزماهورهای میزان جهش به مراتب افزایش می‌یابد. وجود چنین ناپایداری‌های قابل توارث در جایگاه‌های ریزماهورها آنها را تبدیل به ابزاری سودمند برای مطالعات ژنتیکی و تکاملی کرده است. بررسی‌های شجره‌ای در انسان نرخی حدود 10^{-3} جهش در هر جایگاه در هر نسل را نشان داده است ولی این نرخ در مگس سرکه نسبتاً پایین و حدود 6×10^{-6} می‌باشد. عواملی همچون تعداد و نوع تکرار ردیف کناری و نوترکیبی بر میزان جهش ریزماهورهای مؤثر می‌باشد و با توجه به میزان جهش بالا دو نوع مکانیسم برای این جهش‌ها پیشنهاد شده است (Ellegren, 2000).

الف- لغزش^۲ رشته مکمل در طی فرآیند تکثیر

بر اساس این نظریه در خلال نسخه برداری نسخه جدید DNA سنتز شده می‌تواند به شکل غیرعادی قرار گیرد ولی به دلیل ساختار تکرار شونده DNA ریزماهورها، اکثر بازهای دو رشته‌ای جدید هنوز به صورت جفت شده باقی مانده و تنها یک ساختار حلقه‌ای کوچک به صورت جفت نشده باقی می‌مانند. در صورتی که سنتز DNA ادامه پیدا کند، تعداد تکرارها در رشته جدید تغییر خواهد کرد و از اینرو لغزش نسخه برداری منجر به ایجاد یک سری از آلل‌ها با اندازه متفاوت (تعداد تکرارهای متفاوت) در افراد جمعیت می‌شود (عرفانی مقدم، ۱۳۸۲).

ب- کراسینگ اور نابرابر^۳

کراسینگ اور بین کروموزوم‌های همولوگ در مرحله میوز انجام می‌شود که به طور ناقص با هم جفت می‌شوند، کراسینگ اور نامتعادل موجب حذف شدگی در یک مولکول و اضافه شدن در مولکولی دیگر و متعاقب آن باعث انبساط و انقباض آرایه‌ها می‌گردد (Goldstone and Schlotterer, 1998).

¹ Polymorphism

² Slippage

³ Unequal crossing-over

۳-۴-۲-۳-۱-عوامل مؤثر بر میزان جهش

افزایش تعداد واحدهای ریزماهوره، کاهش طول تکرار (دی نوکلئوتیدی نسبت به تترانوکلئوتیدی) و کاهش تعداد CG نواحی مجاور واحدها، باعث افزایش میزان جهش می گردند. همچنین بررسی ها نشان داده میزان جهش در نرها نسبت به ماده ها بیشتر است (نوروزی، ۱۳۸۶).

۴-۴-۲-۳-۱-تکامل ریزماهوره ها

به منظور برآورد میزان تنوع در جمعیت و فاصله ژنتیکی از داده های ریزماهوره و همچنین برای توصیف تنوع ژنتیکی در جایگاه های ریزماهوره ای از دو مدل اساسی جهش آلی نامحدود^۱ (IAM) و مدل جهش مرحله ای^۲ (SMM) استفاده می شود. Crow در سال ۱۹۶۴ جهت درک تحقیقات در سطح مولکولی جمعیت ها مدل IAM را پیشنهاد می کند که پیش بینی می کند که جهش تنها به حالت آلی جدید می انجامد و همیشه آللهایی در جمعیت به وجود می آید که قبلا وجود نداشته و این حالات می توانند هر تعداد واحد تکرار شوند (مانند GT) رخ می دهد. بر عکس در مدل SMM که توسط Kimura و Ota در سال ۱۹۷۳ به عنوان یک تئوری در مبحث ژنتیک جمعیت معرفی گردید، پیش بینی می کند که جهش به صورت اضافه شدن یا حذف یک واحد تکرار شونده (مانند GT) رخ می دهد. این بدان معنی است برخی از جهش ها آللهایی را تولید خواهند کرد که از قبل وجود داشته اند. اهمیت استفاده از مدلی که بهتر با داده های ریزماهوره ای همخوانی داشته باشد در این است که این کار موجب خواهد شد که برآوردهای دقیق تری از اندازه جمعیت و وقایع ساختاری آن بدست آوریم. مطالعات اولیه بر روی مدل های جهش حاکی از آن است که SMM میزان تنوع مشاهده شده در جایگاه های ریزماهوره ای را دقیق تر پیش بینی می نماید. بررسی انواع ترتیب های ریزماهوره ای نشان می دهد که تغییر پذیری جایگاه های سه یا چهار نوکلئوتیدی در مقایسه با جایگاه های دو نوکلئوتیدی و ماهوارک ها شباهت بیشتری با SMM دارند (Hansen, 2004).

^۱ Infinite Allele Model (IAM)

^۲ Step Mutation Model (SMM)

۵-۴-۲-۳-۷-۱-جداسازی ریزماهورها

برای کاربرد ریزماهورها و استفاده از آنها نیازمند استخراج و جداسازی و تعیین توالی ناحیه مجاور آن می‌باشد. برای این منظور روش‌های مختلفی ابداع شده که شامل روش سنتی، مبتنی بر RAPD، روش بسط آغازگر، دو رگه گیری انتخابی و مبتنی بر AFLP می‌باشد که در ذیل به شرح روش بسط آغازگر که بر خلاف دیگر روش‌ها از تکنیک PCR استفاده نمی‌شود پرداخته می‌شود.

۱-۵-۴-۲-۳-۷-۱-روش بسط آغازگر

در این روش ابتدا برای طراحی و ساخت کتابخانه ژنومی، DNA را هضم نموده و برای تعیین اندازه آنها قطعات حاصل از هضم را بر روی ژل آگارز برده و پس از انتخاب و جداسازی قطعات مناسب ۶۰۰-۳۰۰ جفت باز قطعه مورد نظر را وارد یک حامل فاژی کرده تا تک رشته تشکیل شود. سپس این ناقل به میکروارگانیزم‌ها انتقال یافته و یک کتابخانه ژنومی نسبی تشکیل داده و این کتابخانه ژنومی نسبی با استفاده از کاوشگری که واحد تکرار شونده $(CCT)_n$ یا $(CA)_n$ را دارد غربال می‌گردد و ردیف یابی که با کاوشگر مذکور جفت شوند صورت گرفته و در آخر طراحی آغازگرهایی متناظر با ردیف‌های منحصر به فرد واقع در هر دو طرف آنها انجام می‌گیرد (Rico *et al.*, 1997).

۶-۴-۲-۳-۷-۱-مزایای ریزماهورها

این نشانگرها دارای مزایای متعددی بشرح ذیل می‌باشد:

- ۱- دارای توارث همباز^۱ می‌باشند و از توارث ساده مندلی تبعیت می‌کنند، یعنی می‌توان افراد هتروزیگوت را از هموزیگوت به راحتی تفکیک نمود.
- ۲- در ژنوم موجودات به فراوانی یافت می‌شوند و پراکندگی آنها نیز در سطح ژنوم موجودات عالی یکنواخت می‌باشد.

^۱ Co-dominant

۳- چند شکل بالائی دارند، علاوه بر این توانائی آنها در تشخیص میان افراد، در صورت استفاده از ترکیبی از جایگاه‌ها، این تکنیک را در مطالعه جریان ژنی و تعیین هویت بسیار توانمند ساخته است.

۴- مقدار بسیار کمی DNA نیاز دارند و به وسیله PCR قابل تکثیر هستند.

۵- امتیاز دهی آنها آسان و دقیق است.

۶- معمولاً قابلیت استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌یک گونه در گونه‌های بسیار نزدیک دیگر وجود دارد (O'Reilly and Wright, 1995 نقل از صفری، ۱۳۸۵).

۷-۴-۲-۳-۷-۱- معایب و مشکلات ریزماهواره‌ها

از محدودیت‌ها و مشکلات کار با ریزماهواره‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

تعیین توالی

یکی از مشکلات ریزماهواره‌ها که در واقع مشکل عملی و ابتدائی آنها است تعیین توالی برای ساخت و طراحی نشانگر مورد نیاز است و در ابتدا باید این عمل انجام شود که انجام آن مستلزم صرف وقت و هزینه زیادی است (O'Reilly and Wright, 1995 نقل از صفری، ۱۳۸۵).

اشتباهات آلل خوانی^۱

این اشتباهات در اثر لغزش DNA پلیمراز رخ می‌دهد، که منجر به تولید باندهای پهن و متعددی می‌گردد که همچون سایه در اطراف باند اصلی قرار گرفته و این باندها را باندهای نارسا می‌نامند و گفته می‌شود که در اثر حوادث لغزش در طول PCR بوجود می‌آید. این باندها معمولاً وضوح کمتر از باندهای اصلی دارند و می‌توان از آنها صرف‌نظر کرد اما اگر با فرآورده‌های مربوط به یک فرد هتروزیگوت هم پوشانی داشته باشد آنگاه تشخیص این دو باند مشکل می‌شود. می‌توان چند روش را برای رفع این مشکل به کار برد، برای مثال انتخاب جایگاه‌هایی با واحدهای تکرار چهار نوکلئوتیدی مناسب است زیرا با توجه به فاصله بیشتر بین آلل‌ها در این جایگاه‌ها تعیین

^۱ Scoring Errors

آلل ساده تر و نارسائی کمتر است. همچنین می توان از جایگاه های دو نوکلئوتیدی به همراه کاهش اندازه فرآورده ها حدود ۱۲۰ جفت باز استفاده کرد، زیرا اندازه کوچک آلل ها به لحاظ فیزیکی سبب می گردد تا صحت تعیین آلل ها افزایش یافته و نارسایی کمتر شود، هر چند که میزان تغییر پذیری قابل تشخیص نیز کاهش می یابد. در روش دیگر می توان برای افزایش دقت از چندین نشانگر اندازه برای ژل ها استفاده کرد، ضمناً می توان از برنامه هایی مانند ژنوتایپر که جهت تشخیص باندهای نارسا طراحی شده اند استفاده کرد (O'Reilly and Wright, 1995 نقل از صفری، ۱۳۸۵).

ایجاد آلل های صفر^۱

آلل های صفر آلل هایی هستند که ضعیف تکثیر شوند و یا پس از تکثیر و تفکیک قابل رؤیت نباشند. وجود جهش در توالی های مجاور ریزماهوره ها^۲ از اتصال آغازگر جلوگیری کرده و در نتیجه هیچ فرآورده ای در PCR تولید نمی شود. البته کیفیت پایین DNA استخراجی و جهش در درون ترتیب مورد تکثیر نیز می توانند باعث ایجاد آلل های صفر شوند وجود آلل های خنثی موجب برآورد نادرست هتروزیگوسیتی در داخل یک جمعیت می گردد (Hansen, 2004).

این آلل ها بطور معنی داری می توانند در الگوهای تنوع مشاهده شده در جایگاه های ریزماهوره ای شرکت نمایند. نوع و منشاء آلل های صفر، اولین بار در سال ۱۹۹۳ و در جایگاه های ریزماهوره ای دو نوکلئوتیدی انسان گزارش گردید و بعد از آن مرتباً بر تعداد این گزارشات افزوده شد. وقوع آلل های صفر را می توان از روی افزایش هموزیگوت ها نسبت به آنچه که در شرایط هاردی واینبرگ مورد انتظار است، تشخیص داد. وقوع این آلل ها با فراوانی بالا ممکن است بصورت افزایش تعداد موارد عمل نمودن PCR بروز نماید (Hansen, 2004).

هموپلاسی اندازه یا تشابه ساختمانی در اندازه

چند شکلی و تغییرات مشاهده شده در ریزماهوره ها، ناشی از تغییرات طول قطعات تکثیر شده است. دو آلل در صورتی از همه لحاظ یکسان هستند که بدون جهش از آلل اجدادی یکسان ایجاد شده باشند. دو آلل ممکن

¹ Null Alleles

² Flanking

است اندازه یکسان و یا حتی توالی یکسان داشته ولی از یک جد مشترک نباشند که هموپلاسی اندازه نامیده می‌شوند. آنها ممکن است از یک آلل ولی با یک تاریخ متفاوت ایجاد شده باشند. بی‌توجهی به هموپلاسی اندازه منجر به برآورد رو به پایین زمان انشعاب واقعی بین جمعیت‌ها خواهد شد. این پدیده ممکن است از طریق مقایسه توالی دو آلل هم‌اندازه مشخص شود (Hansen, 2004).

۸-۴-۲-۳-۷-۱- انتخاب مدل جهش مناسب

انتخاب مدل‌های جهشی مناسب برای توجیه تنوع در جایگاه‌های ریزماهورای آسان نیست. در حال حاضر با توجه به عدم قطعیتی که در مورد نقش نسبی مدل‌های جهش وجود دارد، توصیه می‌شود محققینی که از تغییرپذیری ریزماهورای (بدون آزمون و بویژه در گونه‌هایی که تعداد زیادی آلل بروز می‌دهند) استفاده می‌نمایند، روشی محافظه کارانه در پیش گیرند و از آماره‌های F مرسوم بهره گیرند (Hansen, 2004).

۹-۴-۲-۳-۷-۱- حفاظت شدگی ریزماهوراها

۱-۹-۴-۲-۳-۷-۱- تولد و مرگ ریزماهوراها

در اولین مطالعات توسط Mesier و همکاران در سال ۱۹۹۶ حفاظت شدگی یک جایگاه ژنی ریزماهورای ترانوکلئوتیدی درون یک ژن بین همه انواع گونه‌های میمون و گونه انسان نشان داده شده و از روی تغییرات توالی‌های جایگاه آنها (در اثر جهش) مدلی برای پیدایش یا تولد و تکامل ریزماهوراها ارائه گردید. در همین راستا Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۹ از بررسی توالی‌های جایگاه‌های ژنی ریزماهوراها در گونه‌های مختلف نتیجه گرفتند که در مرحله‌ای خاص از انتهای چرخه تکاملی ریزماهوراها، انقطاع در توالی‌های تکراری در یک مرحله و حذف شدن بخش‌های بزرگتر تکراری در مرحله بعد اتفاق می‌افتد و ایشان این مرحله را مرگ ریزماهوراها نام نهادند (عرفانی مقدم، ۱۳۸۲).

۱۰-۴-۲-۲-۳-۷-۱- ریزماهوره‌های بسیار حفاظت شده

Rico and Hewitt در سال ۱۹۹۶ حفاظت شدگی جایگاه‌های ریزماهوره‌ای را به مدت ۴۷۰ میلیون سال میان گونه‌های ماهی نشان داده‌اند. Fitzsimmons و همکاران در سال ۱۹۹۵ چنین حالت پایدار را به مدت ۳۰ میلیون سال پیش میان گونه‌های لاک پشت دریایی ثابت کردند. Ezenwa و همکاران در سال ۱۹۹۵ حفاظت شدگی ۲۷ جایگاه تری‌نوکلوتیدی از هرگونه زنبور میان ۲۷ گونه دیگر از خانواده زنبورها که حداکثر ۱۴۴ میلیون سال پیش از آنها انشقاق یافته را بررسی کردند و ثابت نمودند که میان فاصله سیستماتیک و دو فاکتور حفاظت شدگی محل آغازگرها و هتروزیگوسیتی و پلی‌مورفیسم ایجاد شده، نسبت آشکاری وجود دارد (عرفانی مقدم، ۱۳۸۲).

۱۱-۴-۲-۲-۳-۷-۱- کاربرد ریزماهوره‌ها

هم اکنون در انسان هزاران نشانگر ریزماهوره وجود دارد که توزیع متراکمی در هر بخش از کروموزم دارند و هر روز بر تعداد این نشانگرها افزوده می‌شود و به کمک آنها نقشه‌های مربوط به تک تک ژن‌ها به سرعت مکان یابی می‌شود. این نشانگرها برای تعیین و حل بسیاری از ناهنجاری‌های ژنتیکی در انسان با ارزش بوده و شناسایی بسیاری از بیماری‌های زیانبار را در انسان تسریع می‌کند، برای مثال در سرطان‌ها در برخی از آنها افزایش یا کاهش طول ریزماهوره‌های سلول به میزان زیادی اتفاق می‌افتد که این تغییرات به راحتی قابل تشخیص است. چنین نقشه‌هایی در سایر موجودات نیز در حال تهیه هستند و اساس نقشه‌های جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی را تشکیل می‌دهند. از موارد دیگر کاربرد ریزماهوره‌ها، استفاده در انگشت نگاری DNA و در مطالعات مربوط به تعیت هویت، مسائل حقوقی، قضایی، جنایی، دیرین‌شناسی و همچنین کاربرد آنها در تشخیص ژنوتیپ‌ها و تمایز بین افراد می‌باشد. مطالعات مربوط به بررسی روابط خویشاوندی، آزمون انساب و تعیین اصالت در انسان و حیواناتی مثل اسب که اصیل بودنشان از اهمیت زیادی برخوردار است، بسیار مورد توجه می‌باشد. چنین مطالعاتی برای مدیریت جمعیت‌های اهلی و درک الگوهای آمیزشی در حیات وحش مفید می‌باشد. به عنوان مثال در صنعت گاو گوشتی با افزایش نگرانی مصرف کنندگان از مصرف گوشت‌های آلوده به جنون گاوی کارشناسان مایلند تا منشاء گوشت‌های آلوده موجود در بازار را داشته و لکه مربوطه را شناسایی کنند تا دقیقاً نمونه گوشت مشکوک را به جمعیت خاصی منتسب نمایند. بررسی رفتارهای تولید مثلی، شناسایی

ساختار جمعیت‌های گیاهی و جانوری از دیگر کاربردهای ریزماهورها می‌باشد. وراثت دو والدین و همبازی ریزماهورها این نشانگرها را برای بررسی روابط بین افراد و تجزیه و تحلیل شجره و شناسایی والدین مناسب کرده است خصوصیات ریزماهورها همچنین باعث استفاده از این نشانگرها در آبی‌پروری و مدیریت شیلاتی، در مطالعات ساختار جمعیتی، تشخیص نژادهای پرورشی از طبیعی، ارزیابی رابطه ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت والدین، تشخیص ژینوژنر، پلی‌پلوئیدی، تشخیص دورگه‌ها و ارزیابی تکاملی گردیده است (صفری، ۱۳۸۵).

۱۲-۴-۲-۳-۷-۱- تشخیص آلل‌های ریزماهورهای

این نشانگرها نیز همانند سایر نشانگرهای مبتنی بر PCR، از این طریق تکثیر شده و فرآورده‌های حاصله پس از الکتروفورز تشخیص داده می‌شوند. تکثیر ناحیه مورد نظر با استفاده از یک جفت آغازگر که مکمل قسمتی از ردیف‌های پهلویی ناحیه تکرارشونده می‌باشند، صورت می‌گیرد. این ردیف‌ها کاملاً اختصاصی می‌باشند و در ژنوم کامل تنها یکبار رخ می‌دهند. بنابر این حتی اگر در ریزماهورهای خاص واحد تکرارشونده در چندین محل متفاوت در ژنوم روی دهد، PCR تنها یک محل را تکثیر خواهد کرد (محلی که دارای ردیف‌های پهلویی متناظر با آغازگرهای مربوطه می‌باشد). طول فرآورده PCR مطابق با تعداد واحد تکرارشونده در آن محل متفاوت است. الکتروفورز باید به گونه‌ای باشد که امکان تمیز باندهایی که تنها باندازه یک باز متفاوتند را بوجود آورد. انحصاری بودن آغازگرها موجب می‌شود که در هر فرد تنها یک یا دو باند (در فرد هتروزیگوت دو باند و در فرد هموزیگوت یک باند) بدست آید (نویدی، ۱۳۸۵).

پس از الکتروفورز سه راه برای نمایان سازی آلل‌ها وجود دارد:

۱- نشاندار کردن با آغازگرهای رادیواکتیوی یا استفاده از نوکلئوتیدهای نشاندار. هر دو راهکار موجب نشاندار شدن فرآورده PCR می‌شوند و فرآورده‌ها را می‌توان بر روی فیلم‌های حساس به اشعه ایکس نمایان ساخت. این روش علیرغم دقت زیاد، بدلیل بهره‌گیری از مواد رادیواکتیو و خطرات ناشی از آن به تجهیزات ویژه نیاز داشته و تنها در آزمایشگاه‌های مجهز قابل انجام است.

۲- نشاندار کردن فلورستی آغازگرها و سپس استفاده از سیستم ردیف‌یابی خودکار^۱. بدین ترتیب توالی قطعه تکثیر شده تعیین می‌شود و در نتیجه تعیین دقیق اندازه آلل امکانپذیر می‌گردد. این روش دقیق‌ترین روش موجود می‌باشد ولی تجهیزات مورد نیاز آن بسیار گران بوده و در هر آزمایشگاهی وجود ندارد.

۳- استفاده از رنگ آمیزی‌های ویژه مانند رنگ آمیزی نیترات نقره^۲ که بسیار حساس بوده و مقادیر بسیار جزئی DNA را نیز نمایان می‌سازد. سادگی و سهولت کاربرد این روش، کارآمدی برابر با سایر روش‌ها، ارزان بودن، امکان استفاده از آن در هر نوع شرایط آزمایشگاهی و حساسیت بسیار بالا از برتری‌های این روش می‌باشند (نویدی، ۱۳۸۵).

خصوصیات برخی از نشانگرهای DNA در جدول ۱-۱ آمده است.

¹ Automated Sequencing System

² Silver Staining

جدول 1-1 - مقایسه خصوصیات چند نشانگر DNA (صفری، 1385)

منبای مقایسه	ALP	PBR	RFLP	RAPD	AFLP	Microsatellite
چگونگی کاربرد	خیلی سریع	سریع	کند	خیلی سریع	آهسته	خیلی سریع
سلامتی	مطمئن	مطمئن	مواد رادیو اکتیو	مطمئن	ژل پلی اکریلامید	ژل پلی اکریلامید
کیفیت DNA	پایین	پایین	بالا	بالا	بالا	پایین
کمیت DNA	پایین	پایین	بالا	پایین	پایین	پایین
نیاز به دانستن توالی	بله	بله	خیر	خیر	خیر	بله
تشخیص جهش نقطه‌ای	خیر	بله	مشکل	خیر	خیر	خیر
میزان چند شکلی	پایین	بالا	بالا	بالا	پایین	بالا
فوتوتیب مولکولی	همبارز	همبارز	همبارز	غالب	همبارز	همبارز
نیاز به موجود زنده	خیر	خیر	بله	خیر	خیر	خیر
تکرار پذیری	صد در صد	صد در صد	تقریباً 95 درصد	متوسط	بالا	صد در صد

۸-۱- اندازه نمونه مورد نیاز

یکی از موارد مهم برای متخصصین ژنتیک و آمار تعیین حداقل اندازه نمونه مورد نیاز برای ارزیابی تغییر پذیری ریزماهواره ها و ارائه تفاسیر قابل فهم از داده‌ها می‌باشد. ارتباط بین تعداد نمونه با نتایج بدست آمده در هر مطالعه، ارتباطی مستقیم است بطوریکه هر چه تعداد نمونه بیشتر باشد، ارتباط با نتایج بیشتر است. اما در بعضی موارد جمع آوری نمونه‌های بیشتر همانند جمع آوری ماهی سفید نژاد پاییزه امکان پذیر نمی‌باشد. طبق نظر (O'Connell & Wright 1997) تعداد ۵۰ نمونه و شناسایی بین ۵ تا ۱۰ آلل در خصوص ساختار جمعیت کافی است و نتایج بدست آمده قابل اطمینان است اگر چه اندازه کم نمونه، تعداد آلل‌های شناسایی شده در هر لوکوس را کاهش می‌دهد اما بر آلل‌های معمول و فراوانی آنها بی‌تاثیر است. از این رو با وجود اختلاف در اندازه نمونه ارزیابی بیشتر آلل‌های معمول و فراوانی آللی، اندازه‌گیری قابل قبولی از تغییرات ژنتیکی ارائه می‌کند که بسیار کم بوسیله اندازه نمونه تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

به دلیل اینکه تعداد آلل‌های مشاهده شده در ریزماهواره ها معمولاً زیاد می‌باشد و فراوانی هر آلل ممکن است پایین باشد به طور معمول تعداد ۵۰ تا ۱۰۰ نمونه برای آنالیزهای آماری لازم می‌باشد. اگر چه این تعداد نیز به تعداد و فراوانی آلل‌ها بستگی دارد و تکنیکهای عددی برای نمونه سازی مانند شبیه سازی مونتوکارلو و روش زنجیره ای ماکاروف در تجزیه و تحلیل با تعداد کم کمک می‌نماید (سالاری علی آبادی، ۱۳۸۷).

Ruzzente و همکاران (۱۹۹۸) تعداد نمونه بیشتر از ۵۰ عدد را برای کم کردن خطا در داده های ریزماهواره ای (به جهت تعداد زیاد اللهای مشاهده شده) پیشنهاد دادند، Silva و Russo (۲۰۰۰) تعداد نمونه بالاتر از ۳۰ عدد را پیشنهاد دادند.

Rico و همکاران (۱۹۹۵) در بررسی ریزماهواره ای *Whiting (Merlangius merlangus)* در ۵ منطقه از شمال آتلانتیک تعداد ۸۰-۵۰ نمونه از هر منطقه جمع آوری کردند.

Herweden و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی ریزماهواره ای تنوع ژنتیکی ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus*)

کلا ۵۷۳ نمونه از ۶ منطقه Great barrier reef جمع آوری کرد.

Pruett و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) با استفاده از روش ریزماهواره ای در خلیج مکزیکو واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده تعداد ۴۲ نمونه را جمع آوری و مورد ارزیابی قرار دادند.

Renshaw و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) با استفاده از روش ریزماهواره ای تعداد ۲۴ نمونه را جمع آوری کردند.

کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه جمعیت کلمه (*Rutilus rutilus*) تعداد ۶۰ نمونه از هر منطقه را مورد بررسی قرار دادند.

قاسمی و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه جمعیت‌های سیم (*Abramis brama*) تعداد ۶۰ نمونه از هر منطقه را مورد بررسی قرار دادند.

Kitanishi و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* با استفاده از روش ریزماهواره ای ۱۹-۵۰ نمونه در هر ناحیه را مورد بررسی قرار دادند.

Menezes و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه تنوع ژنتیکی *Katsuwonus pelamis* با استفاده از روش ریزماهواره ای ۴۵-۵۰ نمونه در هر ناحیه را مورد بررسی قرار دادند.

صفری (۱۳۸۵) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) با استفاده از روش ریزماهواره تعداد ۱۰۸ نمونه در کل و ۳۳-۸ نمونه در هر منطقه را نمونه برداری و مورد ارزیابی قرار داد.

نوروزی (۱۳۸۶) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) با استفاده از روش ریزماهواره تعداد ۳۶۱ نمونه در کل و ۵۴-۱۸ نمونه در هر منطقه را نمونه برداری و مورد ارزیابی قرار داد.

ریحانی (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) ۹۰ نمونه ماهی (۳۰ نمونه از هر منطقه) را مورد ارزیابی قرار داد.

سالاری (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) ۱۸۴ نمونه ماهی (۴۱-۲۰ نمونه در هر منطقه) را مورد بررسی قرار داد.

در بررسی شجاعی (۱۳۸۸) با توجه به میزان کم صید ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*) در پاییز و دشواری دسترسی به نمونه های بیشتر در این فصل تعداد ۳۵ نمونه از هر منطقه مورد ارزیابی قرار گرفت.

در جدول ۱-۲ تعداد نمونه‌های مورد بررسی سایر ماهیان توسط دیگر محققین جهت مقایسه آورده شده است.

جدول ۱-۲- خلاصه ای از تعداد نمونه های مورد استفاده در گونه های مختلف

رفرنس	متوسط نمونه در هر منطقه	کل نمونه	روش کار	گونه
Rico <i>et al.</i> , 1995	۵۰-۸۰	۳۵۰	ریزماهواریه	<i>Merlangius merlangus</i>
Herwerden <i>et al.</i> , 2003	۹۰	۵۷۳	ریزماهواریه	<i>Lethrinus miniatus</i>
Watts <i>et al.</i> , 2004	۶-۲۲	۱۰۹	ریزماهواریه	<i>Pleuronectes platessa</i>
Aguilar <i>et al.</i> , 2005	۹-۴۸	۴۰۸	ریزماهواریه	<i>Esox lucius</i>
Porta <i>et al.</i> , 2006	۳۵-۱۵۲	۲۵۰	ریزماهواریه	<i>Soela senegalensis</i>
Charrier <i>et al.</i> , 2006	۲۹-۵۶	۲۸۲	ریزماهواریه	<i>Pollachius pollachius</i>
Lucentini <i>et al.</i> , 2006	۱۱-۵۰	۳۰۳	ریزماهواریه	<i>Esox lucius</i>
Yamamoto <i>et al.</i> , 2006	۴۰-۶۰	۶۰	ریزماهواریه	<i>Salvenius leucomaenis</i>
Keyvan shokoh <i>et al.</i> , 2007	۶۰	۱۸۰	ریزماهواریه	<i>Rutilus rutilus</i>
Ghasemi <i>et al.</i> , 2007	۶۰	۱۸۰	ریزماهواریه	<i>Abramis brama</i>
Menezes <i>et al.</i> , 2008	۵۰	۱۵۰	ریزماهواریه	<i>Katsuwonus pelamis</i>
Kitanishi <i>et al.</i> , 2008	۱۹-۶۰	۲۷۰	ریزماهواریه	<i>Oncorhynchus masou</i>
صفری، ۱۳۸۵	۸-۳۲	۱۰۴	ریزماهواریه	<i>Acipenser nudiventris</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	۹۰	۹۰	ریزماهواریه	<i>Rutilus rutilus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	۲۱-۴۰	۱۸۴	ریزماهواریه	<i>Rachycentron canadum</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	۳۵	۲۱۰	ریزماهواریه	<i>Rutilus frissi kutum</i>

۹-۱- استخراج DNA

نیاز اصلی در هر مطالعه ژنتیکی، استخراج DNA می‌باشد. در مورد ماهیان منبع استخراج می‌تواند بافت ماهیچه، قلب، سیبک، باله‌ها، آبشش‌ها، خون، فلس، مدفوع و غیره باشد. در آنالیز ریزماهواریه‌ها استخراج DNA از بافتهای مرده (مانند باله‌ها، مو و غیره) به آسانی امکان پذیر می‌باشد که این امر در موجودات در حال تهدید یا در معرض انقراض ضروری به نظر می‌رسد زیرا با برداشتن باله می‌توان ماهی را زنده نگه داشت (سالاری علی آبادی، ۱۳۸۷).

روشهای متعددی برای استخراج DNA در ماهیان وجود دارد از جمله می‌توان به روش فنل - کلروفرم، استات آمونیوم، جوشاندن، اتانول، کیت، CTAB^۱ اشاره نمود. از معمول‌ترین روش‌ها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در مطالعات ژنتیک جمعیت، استفاده از روش فنل - کلروفرم می‌باشد. استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم به دلیل مزیت جداکنندگی فنل و کلروفرم در مقابل پروتئین، یکی از روش‌هایی است که در آن نسبت به بقیه روش‌ها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر وجود دارد ولی در روش جوشاندن به دلیل آنکه پس از لیز شدن بافت توسط گرما و هیدروکسید پتاسیم، مواد زاید از عصاره حاصل شده جدا نمی‌گردند، نتایج مطلوبی پس از الکتروفورز مشاهده نمی‌شود و باندها بصورت ضعیف ظاهر شده و تشخیص موقعیت باندها نسبت به یکدیگر مشکل می‌باشد (Bonnaud *et al.*, 1997).

در بررسی شجاعی (۱۳۸۸) از روش Hilis & Mortiz (1990) با استفاده از فنل - کلروفرم استفاده گردید، DNA استخراج شده از باله‌ها با استفاده از روش فنل - کلروفرم از کیفیت و کمیت مطلوبی جهت استفاده در PCR و تولید باند برخوردار بوده و استفاده از این روش جهت استخراج DNA در ماهی سفید مناسب است. روش فنل - کلروفرم بسیار وقت گیر، پرهزینه و سمی بوده و بایستی ابتدا محلولها و بافرهای متعددی را بصورت تازه و استاندارد آماده نمود و در صورتیکه در هنگام استخراج DNA دقت کافی در جداسازی محلولها نگردد DNA استخراج شده دارای آلودگی فنلی یا پروتئینی خواهد بود که در تولیدات حاصل از PCR نتایج منفی خواهد داشت. لازم به ذکر است که به دلیل سمیت شدید فنل بایستی در هنگام کار و استخراج DNA کاملاً موارد ایمنی را رعایت نمود.

علاوه بر روش فنل - کلروفرم روش استات آمونیوم نیز برای استخراج DNA استفاده شد، که علیرغم سریع بودن استخراج، هزینه کمتر و سمی نبودن به دلیل کیفیت پایین DNA استخراج شده، کنار گذاشته و روش فنل - کلروفرم ادامه یافت.

Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی ریزماهوره ای تنوع ژنتیکی تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) از روش CTAB جهت استخراج DNA استفاده نمودند.

^۱ Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

Wirgin و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی تاسماهی آتلانتیک (*Asipenser oxyrinchus*) از روش فنل-کلروفورم DNA را استخراج و استفاده نمودند.

Herwerden و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی ریزماهواره ای تنوع ژنتیکی ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus*) از روش فنل-کلروفورم جهت استخراج DNA استفاده نمودند.

Pourkazemi (1996) در بررسی ساختار جمعیتی تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) جهت استخراج DNA از روش فنل-کلروفورم استفاده نمود.

صفری (۱۳۸۵) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی شیب (*Acipenser nudiventris*) و نوروژی (۱۳۸۶) نیز در بررسی ساختار جمعیتی ازون برون (*Acipenser stellatus*) از روش فنل-کلروفورم استفاده نمودند.

ریحانی و سالاری (۱۳۸۷) در مطالعه ساختار ژنتیکی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) و سوکلا (*Rachycentron canadum*) به کمک مارکر ریز ماهواره از روش فنل-کلروفورم برای استخراج DNA استفاده نمودند. در جدول ۱-۳ روش استخراج DNA توسط سایر محققین برای سایر گونه های ماهیان جهت مقایسه و تأیید روش استخراج آورده شده است.

جدول ۱-۳- روش استخراج DNA در گونه های مختلف، مقایسه نوع بافت و تعداد آغازگرهای ریز ماهواره ای استفاده شده در بررسی ساختار جمعیتی سایر گونه ها توسط سایر محققین

گونه	نوع بافت	روش استخراج	تعداد آغازگر	رفرنس
<i>Esox lucius</i>	خون و ماهیچه	فنل- کلروفورم	۱۱	Aguilar et al., 2005
<i>Rachycentron canadum</i>	باله	فنل- کلروفورم	۲۰	Pruett et al., 2005
<i>Rachycentron canadum</i>	باله	فنل- کلروفورم	۱۰	Renshaw et al., 2005
<i>A. oxyrinchus</i>	باله	فنل- کلروفورم	۹	Wirgin et al., 2002
<i>Cyprinus carpio</i>	باله	فنل- کلروفورم	۹	Yan et al., 2005
<i>Pollachius pollachius</i>	ماهیچه	فنل- کلروفورم	۶	Charrier et al., 2006
<i>Salvenius leucomaenis</i>	باله	فنل- کلروفورم	۴	Yamamoto et al., 2006
<i>A. nudiventris</i>	باله	فنل- کلروفورم	۴	صفری، ۱۳۸۵
<i>Rutilus rutilus</i>	باله	فنل- کلروفورم	۴	ریحانی، ۱۳۸۷
<i>Rachycentron canadum</i>	باله	فنل- کلروفورم	۱۰	سالاری، ۱۳۸۷
<i>Rutilus frissi kutum</i>	باله	فنل- کلروفورم	۹	شجاعی، ۱۳۸۸

۱۰-۱- آغازگرهای مورد استفاده

ریزماهواریها در ردیفهای پهلویی ناحیه تکرارشونده خود بسیار حفاظت شده هستند و منبع با ارزشی برای پرایمرهای اختصاصی محسوب می‌شوند. تکثیر ناحیه مورد نظر با استفاده از یک جفت آغازگر که مکمل قسمتی از ردیفهای پهلویی ناحیه تکرارشونده می‌باشند، صورت می‌گیرد. این ردیفها کاملاً اختصاصی می‌باشند و در ژنوم کامل تنها یکبار رخ می‌دهند. بنابر این حتی اگر در ریزماهواری خاص واحد تکرارشونده در چندین محل متفاوت در ژنوم روی دهد، PCR تنها یک محل را تکثیر خواهد کرد (محلی که دارای ردیفهای پهلویی متناظر با آغازگرهای مربوطه می‌باشد). در این بررسی به منظور جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر از ۹ جفت پرایمر ریزماهواری استفاده شد که مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جایگاههای مختلف ریزماهواری ماهی سفید در جدول ۳-۲ آمده است. این پرایمرهای طراحی شده برای کپورماهیان طراحی شده اند و از این نظر اختصاصی محسوب می‌شوند (Ternur *et al.*, 2004).

استفاده از ریزماهواریها در گونه‌هایی که با هم خویشاوندی بسیار نزدیک یا کمی نزدیک دارند متداول است و معمولاً موفقیت آمیز است اما با افزایش فاصله فیلوژنیکی توانایی استفاده کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در ردیفهای پهلویی ناحیه تکرارشونده یا مناطق پهلوگیری ریزماهواریهاست که محل باند شدن با پرایمرها می‌باشد (نوروزی، ۱۳۸۶).

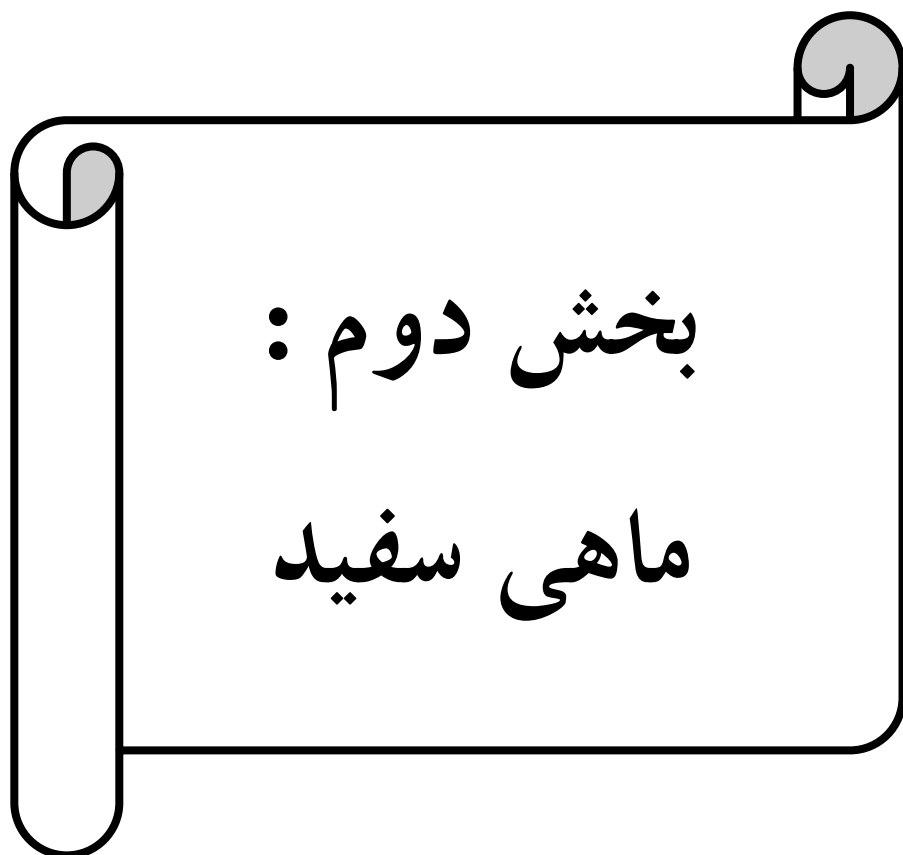
Zhao و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از چهار جفت آغازگر ریزماهواری، Yue و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از نه جفت آغازگر ریزماهواری، Saura و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از پنج جفت آغازگر ریزماهواری، Grujo و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهواری، Sanchez و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از چهار جفت آغازگر ریزماهواری، Herverden و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از هشت جفت آغازگر ریزماهواری، Israel و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهواری، Lundrigan و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهواری و Taylor و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ده جفت آغازگر ریزماهواری، Cui و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از نه جفت آغازگر ریزماهواری، نویدی (۱۳۸۵) با استفاده از پانزده جفت آغازگر ریزماهواری و نوروزی (۱۳۸۵) با استفاده از ده جفت آغازگر ریزماهواری مطالعات خود را در زمینه تنوع

ژنتیکی گونه های مختلف مورد بررسی قرار دادند که قابل مقایسه با تعداد آغازگر در مطالعه حاضر(نه جفت آغازگر ریزماهواره) می باشد.

تعداد آغازگر های استفاده شده توسط سایر محققین برای ماهیان دیگر جهت مقایسه در جدول ۴-۱ آورده شده است.

جدول ۴-۱- مقایسه تعداد پرایمرهای ریزماهواره ای استفاده شده در بررسی ساختار جمعیتی سایر گونه ها

رفرنس	تعداد پرایمر	گونه
Aguilar <i>et al.</i> , 2005	۱۱	<i>Esox lucius</i>
Pruett <i>et al.</i> , 2005	۲۰	<i>Rachycentron canadum</i>
Beacham <i>et al.</i> , 2004	۱۴	<i>Oncorhynchus nerka</i>
Charrier <i>et al.</i> , 2006	۶	<i>Pollachius pollachius</i>
Yamamoto <i>et al.</i> , 2006	۴	<i>Salvenius leucomaenis</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	۴	<i>Rutilus rutilus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	۱۰	<i>Rachycentron canadum</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	۱۵	<i>Rutilus frissi kutum</i>



چکیده

ساختار جمعیت‌های ماهی سفید در دریای خزر با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت (ریزماهواره ای) مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سفید در دریای خزر با استفاده از روش ریزماهواره در زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸۶ تعداد ۲۱۰ نمونه ماهی از سواحل جنوبی دریای خزر شامل مناطق تنکابن، خشک‌رود، تالاب انزلی (بهاره و پاییزه)، گرگان‌رود، ورودخانه کورا در آذربایجان جمع‌آوری شد. DNA ژنومی نمونه‌ها از بافت نرم باله ماهی به روش فنل-کلروفرم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۱۵ جفت پرایمر ریزماهواره صورت گرفت. محصولات تکثیر شده آن با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و بانیترا نقره رنگ آمیزی شد. جهت سنجش وزن مولکولی محصول PCR بر حسب جفت باز (bp) از نرم افزار UVITech استفاده گردید. مقادیر مربوط به فراوانی آللی، تعداد آللهای واقعی و موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، تعادل هاردی-واینبرگ، مقادیر F_{st} ، R_{st} و جریان ژنی بر اساس تست AMOVA با استفاده از نرم افزار ژنتیکی GeneAlex محاسبه گردید. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که از ۱۵ جفت پرایمر ریزماهواره ای بررسی شده در ماهی سفید، ۹ جفت آنها پلی مورف و ۶ جفت آنها مونومورف بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۹ محاسبه شد. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد که کلیه نمونه‌ها به جز نمونه‌های پاییزه تالاب انزلی در جایگاههای AF277576 و EF144125، نمونه‌های خشک‌رود در جایگاه EF144125، گرگان‌رود و کورا در جایگاه AF277576، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P \leq 0/05$)، ($P \leq 0/001$) را نشان دادند. بر اساس تست F_{st} و R_{st} نمونه‌های تمام مناطق نمونه برداری اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P \leq 0/01$).

بر اساس تست F_{st} بیشترین اختلاف ژنتیکی ($F_{st}=0/217$) بین نمونه‌های رودخانه گرگان‌رود و خشک‌رود که دارای کمترین جریان ژنی (۱/۵) است مشاهده شد و کمترین میزان اختلاف ژنتیکی ($F_{st}=0/086$) بین نمونه‌های رودخانه تنکابن و گرگان‌رود که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴/۲۸) است مشاهده گردید. بر اساس تست R_{st} بیشترین اختلاف ژنتیکی ($R_{st}=0/271$) بین نمونه‌های بهاره تالاب انزلی و نمونه‌های تنکابن و کمترین

میزان اختلاف ژنتیکی ($R_{st}=0/026$) بین نمونه های رودخانه تنکابن و پاییزه تالاب انزلی به دست آمد. همچنین میزان تمایز نمونه های بهاره و پاییزه تالاب انزلی نیز قابل توجه ($F_{st}=0/15$) می باشد. تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۲ منطقه و ۶ ناحیه، منطقه اول ناحیه رودخانه کورا و منطقه دوم (نواحی تالاب انزلی) (نمونه های بهاره و پاییزه)، خشکروود، تنکابن، گرگانرود) بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال ۹۹٪ اختلاف بین نمونه های اختلاف هر ناحیه ($P \leq 0/01$ و $0/83$ ٪)، اختلاف بین مناطق نمونه برداری ($P \leq 0/01$ و $0/14$ ٪)، اختلاف بین نواح ($P \leq 0/01$ و $0/3$ ٪) محاسبه شد.

بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود با نمونه های پاییزه تالاب و خشکروود ($0/646$) و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود و تنکابن ($0/237$) وجود دارد.

نتایج این مطالعه حاکی از وجود جمعیت های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت رودخانه کورا است که این امر باید در بازسازی ذخایر این گونه مورد توجه قرار گیرد. کلمات کلیدی: ماهی سفید؛ تنوع ژنتیکی؛ دریای خزر؛ میکروستلایت (ریزماهواره).

ماهیان استخوانی دریای خزر به عنوان گروهی از آبزبان بسیار اقتصادی دریای خزر محسوب می شوند که بعد از ماهیان خاویاری در رده دوم درآمد زایی قرار دارند، ضمن آنکه در زمینه اشتغال و کارآفرینی به عنوان اولین گروه و بالاترین رتبه به شمار می آیند. میزان کل ماهیان استخوانی صید شده در دریای خزر به ۱۶۰۰۰-۱۵۰۰۰ تن می رسد که سرآمد ماهیان استخوانی دریای خزر که بالاترین مقدار و والاترین محبوبیت و بیشترین ارزش اقتصادی را به خود اختصاص داده است، ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*) می باشد که میزان برداشت سالیانه آن به ۷-۸ هزار تن (شیلات ایران، ۱۳۸۵)، از کل ۱۶۰۰۰-۱۵۰۰۰ تن ماهیان استخوانی (غنی نژاد، ۱۳۸۴) می رسد. پراکنش عمده ماهی سفید در سواحل دریای خزر از رودخانه اترک در قسمت شمالی دریای خزر تا سواحل قسمت جنوبی دریای خزر و بخصوص در مناطق غربی و شرقی انزلی و حتی رودخانه اترک می باشد و در قسمت شمالی دریا و به ویژه رودخانه های ولگا و اورال بندرت مشاهده می شود. این ماهی در سواحل ایران به رودخانه های دیناچال، حویق، لمیر، چلونند، شیرود، شفارود، رودخانه های منتهی به تالاب انزلی، سفیدرود، شلمانرود، خشکروود، چشمه کیله (تنکابن)، چالوس، تجن، بابلرود، سرخرود و گرگانرود جهت تولید مثل مهاجرت می نماید. بنابراین می توان اینگونه نتیجه گرفت که ۹۰٪ ذخایر این ماهی بومی سواحل ایران است (قلی اف، ۱۹۹۷). این ماهی در دریای خزر دارای دو نژاد بهاره و پاییزه می باشد (رضوی صیاد، ۱۳۷۲) که بیش از ۹۸ درصد ذخایر ماهی سفید دریای خزر را، جمعیت فرم بهاره تشکیل می دهد (رضوی صیاد، ۱۳۷۲). با توجه به از بین رفتن بسیاری از مناطق تخم ریزی، مسیرهای مهاجرت طبیعی، وجود آلودگی های شهری و صنعتی و تکثیر طبیعی این ماهی به نحو چشمگیری کاهش پیدا کرده (رضوی صیاد، ۱۳۷۸) و تکثیر مصنوعی آن از سالها پیش آغاز گردیده است. Coad (۲۰۰۰) این گونه را در ردیف ۴ گونه ی در معرض خطر در ایران قرار داد. عدم مدیریت صحیح و اتکاء دراز مدت ذخایر ماهی سفید بر تکثیر مصنوعی با توجه به غالبیت تدریجی و کامل نژادهای حاصل از تکثیر مصنوعی (۹۰-۱۰۰٪) در سواحل جنوبی دریای خزر اثرات جبران ناپذیری بر مخزن ژنی اینگونه خواهد گذاشت که از جمله آن آمیزشهای خویشاوندی ی باشد. عدم شناخت جمعیتها و در پی آن با تکثیر و رهاسازی یک نژاد یا جمعیت همچون نژاد بهاره و بهره برداری بی رویه از نژاد یا جمعیتهای دیگر همچون نژاد پاییزه موجبات انقراض این جمعیتها را فراهم خواهد ساخت، همچنین با توجه به

هزینه بالای بازسازی ذخایر مشخص نیست مولدین تکثیر شده مولدین بومی آبهای ایران یا ماهیان حوضه رودخانه کورا (آذربایجان) می باشند که به جهت تغذیه به آبهای ایران مهاجرت نموده اند بنابراین شناخت جمعیت‌های این ماهی از مهمترین عوامل در تکثیر مصنوعی این گونه است. در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه ها، جمعیتها، نژادها با استفاده از صفات مرفومتريک و مریستیک مثل طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی، پلاکهای مصنوعی صورت می گرفت. اما با توجه به حساسیت بالای صفات مرفومتريک و مریستیک به تغییرات محیطی و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان، از طرفی محدود بودن تفسیر داده های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها (Adams, 2002)، پیشرفت علم استفاده از مارکرهای مولکولی مثل ریزماهوره ها یا Microsatellite، RAPD، AFLP، RFLP، Alzyme که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی باشند را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Rayman, 1991). بنابراین تحقیق حاضر با اهداف زیر انجام گرفت:

- ۱- تعیین تنوع ژنتیکی این گونه در مناطق مختلف نمونه برداری
- ۲- شناخت جمعیت های احتمالی ماهی سفید در سواحل جنوبی دریای خزر
- ۳- مقایسه ماهی سفید سواحل جنوبی دریای خزر با رودخانه کورا جهت تعیین ساختار جمعیت این گونه را برای تکثیر مصنوعی

و با توجه به بررسی های اولیه این فرضیات مطرح گردید:

- ۱- روش Microsatellite با استفاده از پرایمرهای موجود (مورد استفاده) کارائی لازم برای جدا سازی جمعیت‌های احتمالی ماهی سفید (جمعیت کورا و جمعیت یا جمعیت‌های ماهی سفید سواحل جنوبی دریای خزر) را دارد.
- ۲- این روش توانایی جداسازی نژادهای بهاره و پاییزه ماهی سفید در تالاب انزلی را دارد.
- ۳- ماهی سفید در هر منطقه دارای تنوع ژنتیکی است و تنوع ژنتیکی ماهی سفید در هر منطقه نمونه برداری نسبت به منطقه دیگر تغییر می کند.

¹- Random Amplification Polymorphic DNA

²- Amplified Fragment Length Polymorphism

³-Restriction Fragment length Polymorphism

۲-۲-کلیات

۲-۲-۱- بیولوژی ماهی سفید

۲-۲-۱-۱- رده بندی ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum* (Kamansky, 1901)



شکل ۱-۲- ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frissi kutum* (Kamansky, 1901)

Kingdom: Animalia
Phylum: Chordata
Sub phylum: Vertebrata
Super class: Gnathostomata
Grade: Pisces
Class: Osteichthyes
Sub class: Actinopterygii
Infra class: Nepterygii
Order: Cypriniformes
Sub order: Cyprinoidei
Family: Cyprinidae
Genus: *Rutilus*
Species: *Rutilus frissi*
Sub species: *Rutilus frissi kutum kamensky*
Persian name: Mahi Sefid
English name: Kutum
Russian name: Kutuma

۲-۲-۱-۲- مشخصات ماهی سفید

ماهی سفید با نام علمی (*Rutilus frissi kutum* (kamensky, 1901) خاص دریای خزر است و انتشار آن مربوط به دریای خزر میانی و جنوبی می باشد. ماهی سفید دوکی شکل و از پهلو فشرده است و به استثناء تعداد اندکی، فلس ها در آنها گرد، (Cycloid) سفید و سخت به قطر ۱۲-۵/۶ میلی متری باشد و در ناحیه سرفاقد فلس است. سرپوش به طور کامل آبششها را می پوشاند، اپیدرم نازک و شفاف و دارای غدد مخاطی است که سطح بدن را لغزنده می سازد و رنگ سفید نقره ای ماهی بعلا رنگیزه بلورهای گوانین است و رنگ پشت تیره و طرفین نقره ای روشن و ناحیه شکم سفید می باشد (برگرفته از تهامی، ۱۳۸۰).

ماهی سفید دارای سه باله فرد و دوجفت باله زوج است که باله دمی هموسرک بوده و بریدگی بین دو شاخه آن عمیق است. بالهای زوج سینه ای و شکمی در قسمت جلوی بدن واقع شده و باله پشتی دارای ۳ شعاع سخت و ۹ شعاع نرم و باله مخرجی دارای ۳ شعاع سخت و ۱۰ شعاع نرم می باشد. تعداد فلس بر روی خط جانبی این ماهی بین ۶۲-۵۳ عدد می باشد ولی در بیشتر ماهیان سفید این تعداد در دامنه ۵۸-۵۵ عدد متغیر است. در جلو و طرفین پوزه دو سوراخ بینی که هر کدام به یک کیسه بویایی متصل میشوند، قرار دارد.

حس شنوایی در این ماهی قوی است و صدا توسط کیسه شنا تقویت میگردد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). ماهیان نر دارای اندامی کشیده اند و هنگام مهاجرت و تخم‌ریزی نقاط سفید و برجسته ای به نام برجستیه‌های پوستی بر روی سر و بدن آنها دیده می شود که در اثر شاخی شدن برخی از سلولهای پوست بوجود می آید (عبدلی، ۱۳۷۸). دهان در ماهی سفید قدامی - تحتانی بوده و در اطراف دهان سیلک ندارد. دارای فکهای متحرک می باشد که با مجموعه ارتباط مفصلی دارند. دارای زبان کوچک و کم تحرک میباشند و فاقد دندان بر روی آرواره ها بوده و در عوض دندانهای حلقی در یک ردیف و به صورت ۵-۵ و ۶-۵ می باشند. دارای مری کوچک و راست بوده و معده فاقد زواید پیلور است و مخرج در جلوی اولین شعاع باله مخرجی قرار گرفته که سوراخ دفعی تناسلی و ادراری می باشد. اندامهای تناسلی ماهی سفید در داخل محوطه شکمی و در ارتباط نزدیک با کلیه ها می باشد (تهامی، ۱۳۸۰). حداکثر سن ماهی سفید ۹ الی ۱۰ سال و حداکثر وزن آن به ۵ الی ۶ کیلوگرم میرسد. ماهی سفید نر در سن سه سالگی و ماهی سفید ماده در سن ۴ سالگی به سن بلوغ می رسند (رضوی صیاد، ۱۳۷۸). اندازه تخم ماهی سفید نسبتاً درشت بوده و قطر آن ۱/۷-۱/۳ میلیمتر است. قطر تخمها پس از لقاح به ۳/۱-۲/۷ میلیمتر می رسد.

رنگ تخم ماهی سفید زرد و نارنجی و در برخی موارد سفید و براق است و پس از لقاح شفافتر و بی رنگتر می گردد. ماهی سفید را میتوان جزء ماهیان پر تخم محسوب نمود که تعداد تخم آن حداکثر به ۱۲۴۷۱۲ عدد و حداقل به ۳۳۷۶۸ عدد می رسد. میزان متوسط تخم در ماهی سفید (هم آوری مطلق) برابر ۸۶۰۰۰ عدد می باشد و هم آوری نسبی ماهی سفید بطور متوسط ۵۳/۴۸ می باشد، یعنی هر کیلوگرم از وزن ماهی سفید بطور متوسط شامل ۵۳۴۸۰ تخم می باشد (رضوی صیاد، ۱۳۶۷). طول ماهیان سفید بالغ که به رودخانه ها مهاجرت می نمایند بین ۶۱-۳۴ سانتی متر و وزن آنها ۱۶۳۵-۷۱۷ گرم می باشد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). در فصل پاییز مناطق عمیق

و در زمستان نواحی ساحلی و نزدیک مصب رودخانه ها را ترجیح می دهد. فصل تخم ریزی اوایل فروردین تا اواخر اردیبهشت می باشد. تخم ریزی در آبی که دما در آن $13-12^{\circ}\text{C}$ و بستر قلوه سنگی باشد، انجام می شود.

۲-۲-۲- تغذیه ماهی سفید

تغذیه ماهی سفید را در شرایط طبیعی میتوان در دو مرحله مورد بررسی قرار داد:

الف) بررسی تغذیه ماهی سفید در مرحله لاروی (Fry) وانگشت قد در رودخانه ها و قبل از مهاجرت

ب) بررسی تغذیه ماهی سفید در سنین و اندازه های مختلف تا سن بلوغ

نوزاد ماهی سفید در چند روز اول علاوه بر فیتوپلانکتونهایی مانند *Microspora* و *Navicula* و... از زئوپلانکتونهایی مانند *Daphnia* و *Rotifera* و *Naplius* و... نیز تغذیه می نماید. نوزاد ماهی سفید بعد از چند روز قادر است از زئوپلانکتونهای درشت تر و بنتوزها تغذیه کند که در این مرحله بسیار پرخور میباشد (تهامی، ۱۳۸۰).

پس از مهاجرت ماهیها به دریا، غذای اصلی ماهی سفید را نرمتان تشکیل می دهند و کرمینه نرمتان غذای دلخواه این ماهیها می باشد. تفاوت خاصی در میل به انواع غذاهای مختلف با ارجحیت غذایی یکسان در مورد ماهیان نر و ماده به چشم نمی خورد (زرین کمر، ۱۳۷۵) و نیز تغذیه ماهی سفید در هنگام مهاجرت تولیدمثلی به کلی قطع می گردد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹).

۲-۲-۳- تولیدمثل طبیعی ماهی سفید

تکثیر طبیعی ماهی سفید پس از مهاجرت آن از دریا به رودخانه هایی که شرایط مناسب از نظر دبی آب، درجه حرارت، شفافیت آب و بستر را دارا باشند صورت می گیرد (عبدلی، ۱۳۷۸).

ماهی ماده معمولاً در نقاط کم عمق تخم ریزی می نماید بطوریکه گاهی اوقات به هنگام تخم ریزی، باله پشتی و قسمتی از پشت ماهی نمایان است و تخم ریزی بصورت منقطع صورت می گیرد. همواره در کنار ماهی ماده یک یا دو ماهی نر دیده می شوند. ماهی ماده خود را بخصوص در قسمت سینه و شکم به سنگریزه ها و سنگهای کف بستر می مالد و با حرکات موجی، عضلات و فشاری که بر روی تخمدانها وارد میکند، مقداری از تخمهای خود

را از مجرای تناسلی خارج می نماید. همزمان با ماهی ماده، ماهیان نر نیز سر و بدن خود را از دو طرف به سر و بدن ماهی ماده نزدیک می کنند و ضمن تماس با آن حرکاتی مانند حرکات ماهی ماده انجام می دهند و با این عمل مقداری اسپرم از مجرای تناسلی آنها به طرف بیرون در داخل آب جاری می گردد (تهامی، ۱۳۸۰).

از اختلاط تخم و اسپرماتوزوئیدها، تخمهای بارور حاصل می گردد. تخمهای لقاح یافته در اثر چسبندگی که دارند به قلوه سنگهای کف بستر می چسبند و اکسیژن لازم برای آنها از طریق جریان آب تأمین می گردد. پس از سپری شدن مدت زمان دوره نمو تخم یا انکوباسیون که بستگی به درجه حرارت آب رودخانه دارد لاروها از تخم خارج می گردند. این لاروها در ابتدا همانند لاروسایر ماهیان فاقد کیسه هوایی هستند و از محتویات کیسه زرده تغذیه می نمایند.

پس از جذب کامل زرده موجود در کیسه، لاروها به سطح آب آمده و کیسه هوایی خود را از هوا پر می کنند و مدتی پس از آن به زندگی در رودخانه ادامه داده و از زئوپلانکتونها تغذیه می نمایند و پس از اینکه وزن آنها در حدود یک گرم شود شروع به مهاجرت بطرف دریا می نمایند. برای این کار مدتی در مصب رودخانه باقیمانده و خود را با آب شور سازش می دهند و سپس جهت تغذیه و رشد به دریا می روند (موسوی، ۱۳۷۴).

۴-۲-۲- تکثیر مصنوعی ماهی سفید و برنامه بازسازی ذخایر آن در ایران

کم شدن نسل ماهی سفید و انقراض آن، در رابطه با عوامل مختلف مانند از بین رفتن نقاط اصلی تخم‌ریزی آن در مرداب انزلی، صید بی رویه، آلودگی های شیمیایی و فیزیکی آب رودخانه ها، استفاده از آب رودخانه ها برای کشاورزی، اثرات پسروری و پیشروی آب دریای خزر، افزایش رسوبات رودخانه ها و ورود فاضلابهای شهری، صنعتی و پسابهای کشاورزی و غیره به داخل رودخانه ها و بالاخره از بین رفتن نژاد پائیزه و... سبب گردید که از سه دهه قبل و بطور جدی پس از انقلاب اسلامی ایران، کار تکثیر و پرورش مصنوعی ماهی سفید و رها کردن آن به رودخانه ها به منظور بازسازی ذخایر با ارزش ماهی سفید و افزایش میزان قابل صید آن توسط شرکت سهامی شیلات ایران انجام گیرد.

این عمل سبب گردید که ذخایر ماهی سفید ترمیم یافته و میزان برداشت سالانه افزایش یابد (رضوی صیاد، ۱۳۷۴). اولین اقدام برای تکثیر مصنوعی ماهی سفید در سال ۱۳۱۸ صورت گرفت و پس از آن تا سال ۱۳۴۱ حدود ۲۸۹ میلیون قطعه لارو ماهی سفید تولید و به رودخانه های سیاه درویشان در تالاب انزلی، شفارود در غرب گیلان و شلمان رود در شرق استان گیلان رها شده است. در سال ۱۳۴۳ مراکز کوچکی در کنار رودخانه های حویق و سفیدرود، برای تکثیر مصنوعی ماهی سفید احداث شد که سالانه در این مراکز، چندین میلیون قطعه لارو تولید و به همان رودخانه رهاسازی گردیدند. از سال ۱۳۶۰ تکثیر مصنوعی و رهاسازی انبوه بچه ماهیان سفید شروع شد و در طی سالهای بعد با روند افزایشی ادامه پیدا کرد (رضوی صیاد، ۱۳۷۴).

تکثیر مصنوعی ماهی سفید به روش دونفره انجام می شود به این ترتیب که شخص تکثیر کننده ماهی را گرفته و شخص کمکی با یک پارچه نظیف خشک، تمام بدن ماهی را خشک می کند. تخلیه تخم به روش دوشیدن صورت می گیرد و برای ریختن اسپرم در ماهی نیز از این روش استفاده می کنیم بطوریکه با یک دست سر ماهی را نگه داشته و با دست دیگر به قسمت آنال ماهی فشار می آوریم تا تخمکها بیرون بریزند و تخمها یا اسپرمها خارج شوند. معمولاً به ازای هر ماهی ماده، اسپرم ۲ الی ۳ ماهی نر را خالی کرده و سپس به مدت یک دقیقه تشت حاوی تخمک و اسپرم را بهم زده و برای رفع چسبندگی، تخمکها را با آب رودخانه مخلوط کرده بطوریکه تخمها آب را جذب نمایند.

این عملیات باید کم کم انجام شود یعنی به ازای هر ۵ دقیقه تقریباً ۲ الی ۳ پیمان آب وارد تشت می کنیم که بسته به درجه حرارت آب می تواند ۲۰ الی ۴۰ دقیقه به طول بینجامد. بعد از حدود ۴ ساعت که تخمکها به استحکام لازم رسیدند برای نگهداری تخمها و آماده شدن آنها برای انتقال به سالن از انکوباتورهای سیس گرین که بصورت قطاری در رودخانه بسته شده اند استفاده می شود و بعد از ۲۴ الی ۳۶ ساعت آنها را از سیس گرین خارج کرده و پس از شستشو در جعبه های یونولیتی بسته بندی کرده و به سالن انکوباتور منتقل می کنیم و در آنجا تخمها را روی انکوباتورویس می ریزیم تا مراحل نهایی تکامل جنینی را طی کند.

بسته به درجه حرارت آب بین ۸ تا ۱۲ روز لارو ماهی سفید هیچ می شود و بعد از آن لاروها را به استخرهای خاکی منتقل کرده و به مدت ۴۵ تا ۶۰ روز در آنجا نگهداری می کنند تا تبدیل به بچه ماهی انگشت قد شوند،

سپس آنها را در تمام رودخانه های حوزه جنوبی دریای خزر رهاسازی می کنند تا در نهایت باعث افزایش ذخایر و حفظ این گونه با ارزش شود.

۵-۲-۲- پراکنش جغرافیایی ماهی سفید

پراکنندگی ماهی سفید در دریای خزر و دریای سیاه و آزوف و رودخانه های متصل به آنهاست. در مورد چگونگی انتشار در دریای سیاه و دریای آزوف اطلاعات دقیقی در دسترس نیست اما چگونگی انتشار این ماهی در دریای خزر به قرار زیر است :

ماهی سفید عمدتاً در حوزه جنوبی خزر از رودخانه کورا واقع در ضلع غربی تا رودخانه اترک واقع در جنوب شرقی پراکنده است . در حوزه جنوبی دریای خزر ذخایر این ماهی در منطقه گیلان به مراتب بیشتر از منطقه مازندران و گلستان است . ماهی در حوزه دریای خزر بیشتر در قسمت جنوبی و میانی دیده می شود و از این نواحی جهت تخم ریزی به رودخانه های دیناچال ، گرگانرود، شلمان رود، سفیدرود ، تنکابن ، سفارود ، حویق ، لنگرود ، آستارا و.. وارد می شود، در قسمت آذربایجان وارد رودخانه اترک و کورا و تعداد بسیار کمی هم وارد دلتای رودخانه لنگران می گردند (قاسم الف، ۱۳۷۵).

۶-۲-۲- مهاجرت ماهی سفید

۱-۶-۲-۲- مهاجرت ماهی سفید در دریا

ماهی سفید پس از رسیدن به سن بلوغ فقط به مدت کوتاهی آن هم صرفاً برای تخم ریزی به رودخانه های حوزه جنوبی مهاجرت می کند و بقیه ایام سال را برای تغذیه و رشد و سپری کردن ایام زمستان (خواب زمستانی) در دریا به سر می برد. در دریا نیز در فصول مختلف با توجه به درجه حرارت آب و موادغذایی موجود در بستر دریا و جریانهای دریایی، محیط زندگی خود را تغییر داده و بنا به نیاز خود مهاجرتهایی را انجام می دهد(رضوی صیاد، ۱۳۷۲). مطالعات انجام گرفته در طی سالهای متمادی در ارتباط با مهاجرت ماهی سفید را می توان به شرح زیر خلاصه نمود که پس از شروع سیرکولاسیون بهاره و با توجه به حرارت هوا ممکن است از اواخر بهمن یا اسفند آغاز شود. ماهی سفید رفته رفته از نقاط عمیق دریا به ساحل مهاجرت می کند و با گرم شدن

تدریجی آب در نقاط کم عمق بر میزان مهاجرت افزوده می شود به طوریکه در یک شرایط تقریباً مساعد در اواخر اسفند ماه گله های ماهی سفید کلا به سمت ساحل هجوم می آورند. در این هنگام ماهیانی که به سن بلوغ رسیده اند تمایل بیشتری به ساحل و آب شیرین رودخانه ها نشان می دهند و این ماهیان بنا به خواستگاه طبیعی خود، رودخانه های مورد نظر را به منظور زاد و ولد تعقیب می نمایند. در حال حاضر قسمت عمده مهاجرین بهاره را رودخانه های منطقه گیلان به خصوص منطقه طالش تشکیل می دهند. مهاجرت به رودخانه ها تا پایان تخم ریزی که عمدتاً تا اواخر اریبهبشت ماه است ادامه دارد و ماهیان گروه گروه به این رودخانه ها مهاجرت می نمایند. در این هنگام کلیه ماهیان سفید زیر سن بلوغ و همچنین ماهیان مهاجر پاییزه در حوزه جنوبی دریای خزر مشغول به تغذیه می باشند. پس از اتمام زاد و ولد مهاجرین بهاره و مراجعت ماهیان از رودخانه به دریا کلیه مولدین به منظور ترمیم قوای از دست رفته شروع به تغذیه می نمایند. افزایش درجه حرارت در طی بهار و تابستان سبب تولیدات غنی بنتیک در حوزه جنوبی می گردد و این موجودات کفزی غذای مناسبی برای ماهی سفید به شمار می روند لذا ماهی سفید در تمام روزهای باقیمانده بهار و تابستان به تغذیه می پردازد. تغذیه ماهی سفید در تابستان به اتمام نمی رسد، بلکه با توجه به شرایط مناسب آب و هوا در فصل پاییز نیز ادامه می یابد (رضوی صیاد، ۱۳۷۲). در فصل پاییز مشاهده شده است که ماهی سفید به طور گله ای مهاجرت هایی در امتداد ساحل از طرف غرب به شرق و بالعکس از طرف شرق به غرب انجام می دهد. اینگونه مهاجرت ها با مساعد بودن شرایط جوی و همچنین جریانهای مناسب دریایی صورت می گیرد به طوریکه اگر صیادان دام گستر یا صیادانی که با پره های دریایی به صید مشغول هستند در مسیر این مهاجرتها قرار بگیرند از صید خوبی برخوردار خواهند شد. در اواخر زمستان با مطبق شدن آب دریای خزر (از نظر درجه حرارت) ماهی سفید رفته رفته سواحل کم عمق را رها نموده به سمت منطق عمیق که از درجه حرارت مطلوب تری برخوردارند رهسپار می شود بطوریکه در آغاز فصل زمستان به خصوص چله بزرگ (اول دی لغایت ۱۰ بهمن) به ندرت می توان ماهی سفید را در ساحل مشاهده نمود ماهی سفید زمستان را در چاله ها و گودالهای بستر دریا سپری می نماید. در سالهای اخیر که صید یا دام در دریا آزاد شده صیادان به دنبال صید ماهی، نقاط عمیق زیر دریا را از دام انباشته اند. در پاره ای از موارد که صیادی شانس دسترسی به خوابگاه زمستانی ماهی سفید را پیدا می کرد با چندین رشته دام موفق به صید انبوهی می شدو این امر نشان می دهد که ماهی سفید در طی زمستان در

پناهگاههای مخصوصی که در دریا به طور طبیعی ایجاد شده زندگی می کند و در تمام این مدت نه تنها تغذیه ندارد بلکه از تحرک بسیار کمی برخوردار می باشد به طوری که اگر صیادی به این منطقه دسترسی پیدا کند می تواند چندین شبانه روز بودن اینکه محل دام گذاری را تغییر بدهد به صید انبوه غیر منتظره ماهی سفید دست یابد و این در شرایطی است که دامهای صیادان مجاور ممکن است خالی از ماهی سفید باشد. عمقی که ماهی سفید در آن زمستان را سپری می کند در پاره ای از موارد به ۱۰۰ متر و حتی بیشتر می رسد. با پایان گرفتن چله بزرگ و آغاز چله کوچک (۱۰ بهمن لغایت ۲۰ اسفند) در صورتی که آب و هوا مناسب باشد ماهی سفید رفته رفته از جایگاه زمستانی خارج می شود، این عمل با گرم شدن تدریجی آب شدت بیشتری به خود می گیرد و بالاخره از اواخر تابستان، ماهی سفید به طور گله ای به منظور تغذیه و تخم ریزی رهسپار ساحل گردیده که مهاجرت ماهی سفید برای تخم ریزی و ازدیاد نسل در دو مرحله، مهاجرت پاییزه و بهاره، صورت می گیرد. البته مهاجرت ماهی سفید منطقه ای بوده و جزء ماهیان مهاجر واقعی نمی باشد، لذا به ماهی سفید ماهی نیمه مهاجر می گویند (رضوی صیاد، ۱۳۷۲).

۱-۱-۶-۲-۲- مهاجرت پاییزه

مهاجرین پاییزه در صورت مساعد بودن شرایط جوی معمولاً در اواسط پاییز ولی عمدتاً در آذر ماه شروع به مهاجرت می نمایند. این گروه معمولاً به رودخانه هایی مهاجرت می کنند که بسیار طویل بوده و دارای بستری با گیاهان آبی باشند. مهاجرین پاییزه که عمدتاً فیتوفلیک (گیاه دوست) هستند بر روی گیاهان آبی تخم ریزی می نمایند. در گذشته میزان ذخایر ماهی سفید پاییزه چشمگیر بوده است. مرداب انزلی یکی از بهترین مناطق تخم ریزی مهاجرین پاییزه به شمار می رفت و قسمت اعظم مهاجرت ماهی سفید از طریق کانال انزلی و رودخانه های نهنگ روگا، سوسروگاف پیربازار روگا و راسته خاله به مرداب انزلی صورت می گرفته و سالیانه میلیونها بچه ماهی سفید از طریق همین روگها به دریا رهسپار می شدند. مهاجرین پاییزه پس از مهاجرت به محل های تخم ریزی و سپری نمودن زمستان در آن مناطق در اواخر زمستان و اوایل بهار با گرم شدن آب تخم ریزی نموده و بلافاصله به دریا بر می گردند. به غیر از تالاب انزلی سایر مناطقی که تیپ ماهی سفید پاییزه جهت تخم ریزی به آن مهاجرت می کند رودخانه سفید رود و قره سو را می توان نام برد (امینیان فتیده، ۱۳۸۵).

۲-۱-۶-۲- مهاجرت بهاره

هم اکنون ذخایر عمده دریای خزر را تشکیل داده که عمدتاً سنگ دوست (لیتوفیلیک) هستند. قسمت اعظم این ماهیان به رودخانه‌هایی مهاجرت می‌کنند که دارای بستر سنگی یا سنگلاخی است. مهاجرین بهاره مهاجرت به رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر را در آغاز سیر کولاسیون بهاره شروع میکنند. البته با توجه به درجه حرارت آب و هوای منطقه ابتدا به رودخانه‌های منطقه گلستان و مازندران و سپس به رودخانه‌های منطقه گیلان وارد می‌شوند. مهاجرت این ماهیان در رودخانه‌های مازندران تا اواسط فروردین ماه و در رودخانه‌های استان گیلان تا به خصوص رودخانه‌های منطقه تالش تا اواخر اردیبهشت ماه ادامه می‌یابد. مهاجرت ماهی سفید تیپ بهاره به رودخانه اساساً به ۴ فاکتور مهم بستگی دارد که شامل درجه حرارت آب رودخانه، دبی رودخانه، جریان ساحلی ناشی از باد و وجود امنیت مناسب می‌باشد (امینیان فتیده، ۱۳۸۵).

۲-۲-۷- صید و ارزش شیلاتی ماهی سفید

میزان صید ماهی سفید طی سالهای گذشته بیانگر آن است که این ماهی دارای ذخایر قابل توجهی بوده و بیشترین میزان صید ثبت شده در طی دهه‌های گذشته، ۵۸۵۴ تن در سال بوده است (پیری و همکاران، ۱۳۷۸). این میزان صید در دهه‌های بعد به لحاظ صید بی‌رویه، تخریب مناطق مستعد تخم‌ریزی در رودخانه‌ها بدلیل شن برداری، ورود فاضلابهای کشاورزی، شهری و صنعتی بداخل این منابع آبی و کاهش سطح آب دریای خزر (رضوی صیاد، ۱۳۷۲، ۱۳۷۸؛ سادلایف و همکاران ۱۹۶۵؛ غنی نژاد و همکاران، ۱۳۸۱، ۱۳۸۴) کاهش چشمگیری یافت. کاهش میزان صید ماهی سفید در دهه ۶۰ به اوج خود رسید. ورود هزاران نفر صیاد دامگستر به دریا در سالهای پس از انقلاب اسلامی، موجب افزایش فعالیت صیادی شده و فشار مضاعفی بر این ذخیره و صید آن در اوایل دهه ۶۰ وارد نمود. کار بازسازی ذخیره ماهی سفید از سال ۱۳۶۱ آغاز گردید که تاثیر بسزایی در احیای جمعیت این گونه داشته است. بی‌شک، افزایش میزان صید ماهیان سفید در دو دهه اخیر حاصل ۲۵ سال رهاکرد بچه ماهیان سفید بوده است، بطوریکه بعد از روند افزایشی تکثیر مصنوعی و رهاسازی انبوه بچه ماهیان سفید در سال ۱۳۶۰ که در قسمت تکثیر مصنوعی توضیح داده شد، در طول سالهای ۶۹-۶۱ با افزایش میزان رها سازی بچه ماهیان سفید، رشد میزان صید این ماهی را نیز شاهد بودیم. با توجه به نوسانات

رها سازی بچه ماهیان و میزان صید در سالهای پس از سال ۶۹، در مجموع میزان رها کرد نسبت به مقدار صید ماهی سفید در حد پائین تری بوده است. از سال ۱۳۷۳-۱۳۸۴ میزان صید این ماهی با کاهش همراه بوده است. کاهش کیفیت و میانگین وزن بچه ماهیان رها سازی شده، کاهش ضریب بازگشت بچه ماهیان رها سازی شده از جمله عوامل نقصان میزان صید این ماهی محسوب می شود. طی سالهای ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ میزان صید ماهی سفید روند افزایشی شدیدی داشته که افزایش میزان رها کرد بچه ماهی سفید و بالا رفتن کیفیت بچه ماهیان رها سازی شده و تغییرات اکولوژیک احتمالی در دریای خزر از جمله دلایل افزایش میزان صید این گونه محسوب می گردد (عبدالملکی، ۱۳۸۷). در مجموع در طی بیست و هفت سال اخیر شیلات ایران، حدود ۳ میلیارد عدد بچه ماهی سفید به رودخانه های منتهی به دریای خزر در سواحل ایران، رها سازی نموده و بیش از ۲۰۰ هزار تن ماهی سفید نیز صید شده است. بر اساس شکل ۱-۲، درصد بالایی از میزان کل صید ماهیان استخوانی دریای خزر در آبهای ایران، به ماهی سفید اختصاص یافته بطوریکه در برخی سالها این رقم به بیش از ۶۰ درصد هم بالغ گردیده است که این امر حاکی از نقش اقتصادی و تأمین کننده نیاز پروتئینی، این گونه در بین سایر گونه ها می باشد. علاوه بر آن نقش بارز تکثیر مصنوعی را در افزایش میزان صید ماهیان استخوانی، بویژه سهم صید این گونه نسبت به کل صید نشان می دهد غالبیت تدریجی و کامل نژادهای حاصل از تکثیر مصنوعی در سواحل جنوبی دریای خزر شکل یافته است، بطوریکه ۹۰-۱۰۰ درصد ماهی سفید از طریق تکثیر مصنوعی است (پورکاظمی، ۱۳۷۹). لازم بذکر است که در گذشته در مناطق شرقی سواحل ایران در آبهای استان گلستان، میزان صید ماهی سفید در حد محدودی بود که با توجه به روند افزایشی رها کرد بچه ماهیان سفید در آبهای این استان، میزان صید این گونه افزایش یافته است (غنی نژاد و همکاران، ۱۳۸۱).

۸-۲-۲-۲- مروری بر مطالعات انجام شده

۸-۲-۲-۱- مطالعات انجام شده در ایران

Pourkazemi (1996) اولین مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی تاس ماهیان سواحل جنوبی دریای خزر را انجام داد که در آن از الکتروفورز آلوزایمها، RFLP و DNA میتوکندریایی برای مطالعه جمعیت ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) استفاده گردید. مطالعه آلوزایمها تنوع بالایی را در بین و درون جمعیتها نشان داد. میانگین

هتروزایگوسیتی $0/108 \pm 0/02$ محاسبه شد و درصد لوکوسهای پلی مورف $63/3$ درصد بود. به طور کلی تفاوت معنی داری در فراوانی آلل‌ها بین ۴ منطقه جغرافیایی مورد مقایسه وجود نداشته است. مطالعه RFLP بر روی ژن ND5/6 انجام گرفت که ۹ ترکیب مختلف هاپلوتیپی در ۱۲۰ نمونه مشخص شد. میانگین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی به ترتیب $0/009 \pm 0/001$ و $0/4322 \pm 0/002$ محاسبه شد و تست ناهمگونی جغرافیایی، اختلاف معناداری را در پراکنش هاپلوتیپ‌ها نشان نداد. وی عدم تشخیص جمعیت را جریان بالای ژنی بین جمعیت‌ها، حساسیت پایین روش بکار رفته، تعداد کم نمونه و مناسب نبودن ژن مورد مطالعه عنوان نمود. ساختار جمعیتی تاس ماهی روس (*Acipenser gueldenstaedti*) با استفاده از تکثیر ناحیه D-Loop توسط (Rezvani Gilkolaiee, 1997) ارزیابی گردید. وی ۷ ترکیب هاپلوتیپی مختلف را در این گونه گزارش نمود و میانگین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی را به ترتیب $0/005 \pm 0/000$ و $0/75 \pm 0/00$ به دست آورد. منطقه D-loop در پنج تاس ماهی جنوب دریای خزر تعیین توالی گردید و مشخص شد که این ناحیه در تاس ماهیان جنوب دریای خزر هتروپلاسمی را نشان می‌دهد. در پنج گونه، هترو پلاسمی، بوسیله یک توالی ۸۲ bp که در این منطقه تکرار می‌گردد ایجاد می‌شود. اختلافات کم در توالی این ناحیه شاید به این دلیل است که مولکول DNA میتوکندیایی بسیار حفاظت شده است و برای مطالعه فیلوژنیکی مناسب نمی‌باشد. مطالعه تعیین توالی قسمتی از ژن ND5/6 میزان بالایی از تنوع توالی را در بین ۵ گونه تاسماهی نشان داد. وی اظهار داشت که ممکن است این قسمت برای مطالعات جمعیتی و فیلوژنیکی مناسب باشد.

(Rezvani Gilkolaiee (1997) با استفاده از روش RAPD به مطالعه گونه‌های خاویاری دریای خزر پرداخت. تفاوت معنی داری در جایگاههای ژنی RAPD گروههای فیل ماهی متعلق به مناطق غربی و شرقی جنوب دریای خزر مشاهده شد. همچنین در این مطالعه تاس ماهی ایرانی و فیل ماهی دریکن کلاستر قرار گرفتند. ماهی شیپ و اوزون برون در کلاستر جداگانه دیگری قرار گرفتند و مشخص گردید که تاس ماهی روس، خویشاوندی نزدیکی با فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی دارد.

(Rezvani Gilkolaiee (2000) در مطالعه تنوع میتوکندری جمعیت‌های تاس ماهی روسی در جنوب دریای خزر از روش RFLP و ژن ND5/6 استفاده کرد و نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در پراکنش هاپلوتیپ‌ها در شرق و غرب سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که دلیل آن را پراکنش ژنتیکی عنوان نمود.

قرائی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RAPD به تشخیص مولکولی دو گونه تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) و تاس ماهی روسی (*A. guldenstaedtii*) پرداخت. با استفاده از این روش تاس ماهی ایرانی به عنوان یک گونه مستقل از تاس ماهیان روسی تفکیک گردید.

عطائی (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی در رودخانه سفید رود، جنوب شرقی و غربی دریای خزر را با استفاده از PCR-RFLP مورد بررسی قرار داد. نتایج مطالعات فوق مشخص کرد که جمعیت‌های مورد مطالعه همگن بودند.

قاسمی (۱۳۸۲) به مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش RFLP پرداخت. نتایج بررسی نشان داد که جمعیت ماهی شیپ رودخانه اورال از سواحل جنوبی دریای خزر متفاوت بوده و آنزیم *Cfr13I* به عنوان یک مارکر مولکولی جهت تمایز این دو جمعیت معرفی گردید ولی جمعیت‌های احتمالی سواحل جنوبی دریای خزر به خوبی از جمعیت‌های شمالی قابل تفکیک نبودند.

خارا (۱۳۸۳) با بررسی ناحیه‌ای در میتوکندری با طول ۳۵۰۰ جفت باز توانست جمعیت وارداتی سیم (*Abramis brama*) از آذربایجان را از جمعیت‌های بومی جدا کند. با استفاده از این روش میزان تنوع درون گونه‌ای جمعیت سیم تالاب انزلی و دریای خزر صفر بود و در نمونه‌های ارس خیلی پایین بود که دلیل آن کاهش ذخایر این گونه عنوان گردید.

شعبانی (۱۳۸۴) با بررسی دو ناحیه D-LOOP و ND5/6 در روی میتوکندری توانست ازون برون (*Acipenser stellatus*) ولگا و حوزه جنوبی خزر را از هم جدا کند و آنزیم *HinfI* برش دهنده با ژنوتیپ C را به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی ماهیان رودخانه سفید رود و آنزیم *MboI* برش دهنده با ژنوتیپ B یا C و آنزیم *HaeIII* با ژنوتیپ B را بعنوان مارکر مولکولی ازون برون رودخانه ولگا معرفی نمود. ولی اختلاف معنی داری بین نمونه‌های جمع آوری شده در بخش جنوبی دریای خزر مشاهده نگردید.

صفری (۱۳۸۵) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش ریز ماهواره‌ای، جمعیت ماهی شیپ رودخانه اورال را از سواحل جنوبی دریای خزر جدا کرده و اعلام نمود احتمالاً بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد.

خوش خلق (۱۳۸۵) در بررسی تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) و تاس ماهی روسی (*A. guldenstaedti*) با استفاده از مارکرهای ریز ماهواره ای، سه جمعیت مستقل تاسماهی ایرانی (جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود، جمعیت تاسماهی ایرانی منطقه ترکمنستان و جمعیت تاسماهی ایرانی ناحیه سه شیلاتی) را تشخیص داد.

نوروزی (۱۳۸۶) از روش مولکولی ریز ماهواره در بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی اوزون برون دریای خزر استفاده نمود و توانست جمعیت‌های اوزون برون سواحل جنوبی دریای خزر را از هم جدا نماید.

کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی جمعیت‌های کلمه ایران (*Rutilus rutilus*) با استفاده از روش ریز ماهواره، تفاوتی بین جمعیت انزلی و خلیج گرگان مشاهده نکردند.

قاسمی و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی ساختار جمعیتی جمعیت‌های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) با استفاده از روش ریز ماهواره، این دو جمعیت را از هم جدا دانستند.

ریحانی (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) جمعیت این ماهی در روسیه را متفاوت از جمعیت‌های انزلی و خلیج گرگان دانست، اما نتوانست تفاوتی بین جمعیت کلمه انزلی و ترکمن مشاهده نماید.

سالاری (۱۳۸۷) با استفاده از روش مولکولی ریز ماهواره در بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) توانست سه جمعیت از این ماهی را در بندرعباس، بوشهر و چابهار مشاهده نماید.

۲-۸-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

Anger و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از ۴ لوکوس ریز ماهواره به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی آزاد جویباری (*Salvelinus fontinalis*) که در پنج دریاچه در پارک ملی مانریسی کانادا قرار دارند پرداخته و تنوع ژنتیکی بالایی را بین جمعیت‌ها مشاهده کردند.

Rico و همکاران (۱۹۹۶) در بررسی ساختار ژنتیک ماهی وایتینگ (*Merlangius merlagu*) در پنج منطقه در شمال شرقی آمریکا با استفاده از ۶ لوکوس ریز ماهواره، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در سه لوکوس و سطح بالای هموزیگوسیتی را در همه مناطق مشاهده کردند و تمایز ژنتیکی پایین در این بررسی را ناشی از مهاجرت بین مناطق دانستند.

Beacham و همکاران (۱۹۹۷) به بررسی ساختار جمعیتی ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) در رودخانه کان نیوفلاند در طی ۴ سال نمونه برداری و مصبهای تولیدیک بروک و برنالد بروک در طی دو سال نمونه برداری، با استفاده از ۴ لوکوس ریزماهواره نتوانستند جمعیت‌های مصبها را از هم جدا نمایند ولی جمعیت رودخانه کان را کاملاً از جمعیت‌های مصبها متفاوت تشخیص دادند.

Shaw و همکاران (۱۹۹۹) در ارزیابی جمعیت‌های شگ ماهی اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) با استفاده از دو تکنیک RFLP و ریزماهواره نتوانستند اختلافی بین جمعیتها مشاهده نمایند و این عدم اختلاف بین گروههای مختلف را ناشی از مهاجرت تغذیه ای دانستند.

O' Reilly و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی دنداندار (*Dissostichus eleginode*) در سواحل شرقی و غربی آمریکای جنوبی با استفاده از ۱۱ لوکوس ریزماهواره به ناهمگونی نمونه‌ها در دو منطقه پی بردند. Zhou و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه ذخایر مولدین تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) در طی ۳ سال نمونه برداری در رودخانه یانگ تسه با استفاده از ۴ لوکوس ریزماهواره، تمایز ژنتیکی مشخصی بین نمونه‌های سالهای متفاوت مشاهده ننموده و فقدان تنوع در بین گروههای سالهای متفاوت را حاکی از ثابت ماندن تنوع و پایداری ژنتیکی در حیوانات با طول عمر طولانی دانستند.

Norris و همکاران (۱۹۹۹) پراکنش ژنتیکی و وجود تنوع ژنتیکی بین و درون ۳ جمعیت ماهی آزاد پرورشی و ۴ جمعیت وحشی را در منطقه ایرلند و نروژ با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره مورد آنالیز قرار دادند و میزان بالایی از چند شکلی را در همه جمعیتها مشاهده کردند..

Banks و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از نشانگر ریزماهواره، وجود ۵ زیر جمعیت مجزا را در ماهیان آزاد چینوک با استفاده از آنالیز داده‌های ریزماهواره در ناحیه مرکزی کالیفرنیا نشان دادند.

Ruzzante و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ۵ لوکوس ریزماهواره به بررسی ساختار جمعیتی روغن ماهی آتلانتیک (*Gadus morhua*) در لابرادر نیوفلاند پرداختند و به این نتیجه رسیدند که کادهای ساکن خلیج گیلبرت لابرادر از نظر ژنتیکی از کادهای دور از ساحل شمال شرقی نیوفلاند و نزدیک ساحل خلیج Trinity قابل تشخیص می‌باشد.

Susnik و همکاران (۲۰۰۱) که به ساختار جمعیت گریلینگ (*Thymallus thymalus*) در رودخانه سوکا در اسلونی با استفاده از ۵ لوکوس ریزماهواره پرداختند، نتوانستند با این روش جمعیت‌های آدریاتیک و دانوب را از هم جدا کنند.

Appleyard و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر ماهی تن (*Thunnus obesus*) در سواحل شرقی و غربی اقیانوس هند با استفاده از روش ریزماهواره و DNA میتوکندریایی پرداختند با توجه به نتایج بدست آمده، احتمال جدائی جمعیتی شرق و غرب اقیانوس هند را ضعیف اعلام کردند و نتوانستند فرضیه پان میکتیکی جمعیت ماهی تن چشم درشت را در اقیانوس هند رد کنند.

Smith و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از ۴ لوکوس ریزماهواره و روش PCR-RFLP به مطالعه ساختار ژنتیکی تاس ماهی سفید در شاخه اصلی رودخانه Fraser و یکی از انشعابات فرعی آن، رودخانه Nechko، پرداختند. اطلاعات به دست آمده حاکی از وجود چهار منطقه جغرافیائی زیستی در رودخانه Fraser می‌باشد (ناحیه پایینی و پایین Hell's Gate، ناحیه میانی بین Hell's Gate و کیلومتر ۵۵۳ رودخانه Fraser می‌باشد، بالاتر از تلاقی Nechko و ناحیه رودخانه Nechko) که این مناطق به علت وجود موانع مهاجرتی تاس ماهی سفید می‌باشند. مطالعه DNA میتوکندریایی ۹ ترکیب هاپلوتیپی را نشان می‌دهد و تنها اختلاف نوکلئوتیدی، بین Nechko و منطقه بالائی Fraser وجود دارد. دو روش بکار رفته نتایج یکسانی را نشان می‌دهند با این تفاوت که مارکر ریزماهواره تنوع بالاتری را نشان می‌دهد.

Wirgian و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی جمعیت‌های زیرگونه تاس ماهی اطلس با استفاده از روشهای ریزماهواره ای و تعیین توالی DNA میتوکندریایی پرداختند. هر دو روش، سطح بالائی از تنوع ژنتیکی را در ماهیان سواحل اطلس نشان داد و در نمونه‌های کانادائی تنوع ژنتیکی وجود نداشت. آنها اظهار داشتند موتاسیون و تغییرات تکاملی در جایگاههای ریزماهواره بیشتر از DNA میتوکندریایی می‌باشد. هر دو روش بطور واضح جمعیت‌ها را تفکیک می‌کند اما آنالیز ریزماهواره تفاوت جغرافیائی بین جمعیت‌های سواحل جنوبی آمریکا را بخوبی نشان می‌دهد.

Adams و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از تکنیکهای نشانه گذاری و ریزماهواره به بررسی ساختار جمعیتی قزل‌آلای رودخانه‌ای (*Salvalinus fontinalis*) دریاچه‌های حوضه آبریز خلیج هند پرداختند و اظهار داشتند که علی

رغم عدم وجود موانع فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه‌ها، هر دریاچه جمعیت تولید مثلی مجزائی دارد. حتی داده‌های نشانه گذاری هم دلالت بر مهاجرت جزئی و عدم مهاجرت بین دریاچه‌ها داشت.

Zhou و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تنوع ژنتیکی تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) ۲۵ پرایمر ریز ماهواره تاس ماهی دریاچه‌ای را استفاده کردند که ده پرایمر به خوبی تنوع را نشان داد. آنها میزان تنوع ژنتیکی بالایی در نمونه‌های بالغ و جوان بدست آوردند. این روش تنوع بالایی را نسبت به آلوزایم‌ها و RAPD در جمعیت رودخانه یانگ تسه نشان داد.

Herwerden و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از ۸ لوکوس به بر ریز ماهواره ای به بررسی تنوع و ساختار جمعیتی *Lethrinus miniatus* Red throat emperor در ۶ منطقه از ۳ ناحیه جغرافیائی Great Barrier Reef (GBR) پرداختند. داده‌ها فقط یک جمعیت را مشخص کرد. آنها اظهار داشتند که بعید به نظر می‌رسد ذخایر ژنتیکی مشخص در GBR موجود باشد.

Renshaw و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) ۲۰ لوکوس ریز ماهواره را کلون و شناسایی نمودند که شامل ۲ دی نوکلئوتید، ۱ تری نوکلئوتید، ۳ تترا و دی نوکلئوتید مرکب، ۹ دی نوکلئوتید و ۵ لوکوس ناقص ریز ماهواره ای می‌باشد.

Pruett و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) ۲۰ پرایمر ریز ماهواره را در ماهی سوکلای خلیج مکزیکو واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند، نتایج حاکی از تغییر تنوع ژنتیکی بین ۰-۰/۹۱۰ و تعداد ۱۵-۱ آلل در جایگاههای مختلف میکروستلایتی می‌باشد.

Smith و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از آلوزایم‌ها و ۸ لوکوس ریز ماهواره به بررسی ساختار جمعیتی ماهی دندان دار (*Dissostichus eleginoides*) در بخش جنوبی اقیانوس اطلس، آرام و هند پرداختند. داده‌های آلوزایمی، تمایز ژنتیکی کمی را در بین ماهیان دندان دار اقیانوس اطلس جنوبی نشان داد و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را تایید کرد لیکن داده‌های ریز ماهواره ای تنوع ژنتیکی مشخصی را نشان داده و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را رد کرد.

Birgitte و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ۶ لوکوس ریز ماهواره ای به آنالیز ۱۰ جمعیت اردک ماهی شمال (*Esox Lucius*) از اروپا و شمال آمریکا پرداختند و تنوع ژنتیکی بسیار پایین اردک ماهی شمال در داخل جمعیت‌های اروپایی را به کاهش جمعیت موثر ناشی از حوادث عصر یخبندان و بعد آن نسبت دادند.

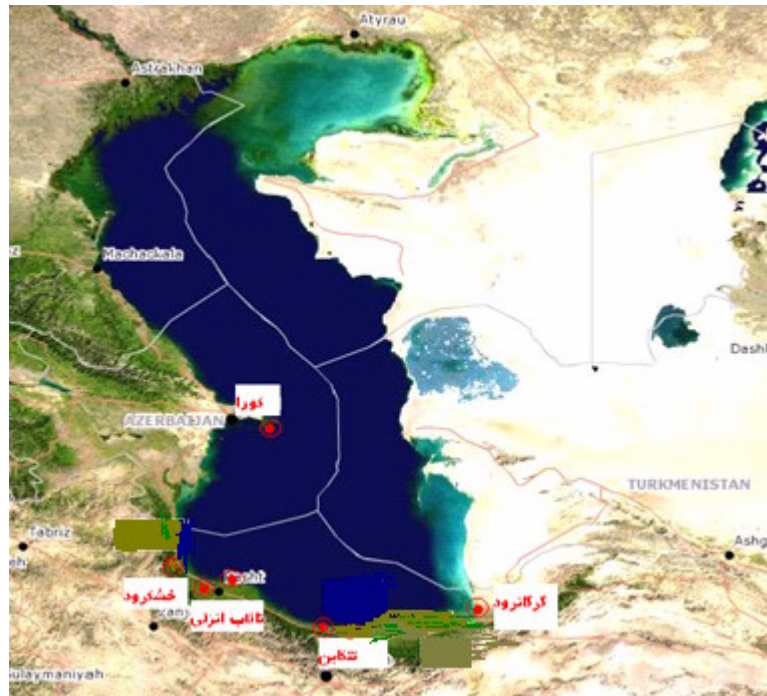
Chauhan و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی کپورچینی (*Cirrhinus mrigala*) رودخانه های براهاماپوترا، گانگوس، ایندوس، ماهانادی تفاوت ناچیزی را بین نمونه های مناطق مختلف مشاهده نمودند.

Thai و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۴ لوکوس ریز ماهواره ای به مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) در ویتنام پرداخته و تنوع بالایی را در ماهیان وحشی نسبت به ماهیان پرورشی مشاهده کردند.

۲-۳- مواد و روشها

۲-۳-۱- نمونه برداری

در این بررسی پس از مطالعه اولیه و تعیین ایستگاه ها، ۲-۳ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله سینه ای و پشتی ۲۱۰ عدد از ماهیهای صید شده با استفاده از تورسالیکیک در استانهای گلستان (رودخانه گرگانرود: ۳۵ نمونه)، مازندران (رودخانه تنکابن: ۳۵ نمونه، خشکروود: ۳۵ نمونه) ، گیلان(تالاب انزلی؛ نمونه های بهاره ۳۵ نمونه، نمونه های پاییزه ۳۵ نمونه) در سواحل جنوبی خزر و نیز از رودخانه کورا در آذربایجان به تعداد ۳۵ نمونه، با استفاده از قیچی جدا سازی و در الکل اتانول ۹۶٪ نگهداری و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید. لازم به ذکر است در کلیه مناطق به جز تالاب فقط از نمونه های بهاره نمونه گیری شده است (شکل ۲-۲، جدول ۱-۲). نمونه برداری این تحقیق از اسفند ماه ۸۵ شروع و در پائیز ۸۶ خاتمه یافت.



شکل ۲-۲- نقشه های مکان های نمونه برداری ماهی سفید

جدول ۱-۲ تعداد و پراکنش نمونه های جمع آوری شده از ماهی سفید برای بررسی های مولکولی

استان	ناحیه نمونه برداری	تعداد نمونه
گلستان	گرگانرود	۳۵
مازندران	تنکابن	۳۵
گیلان	تالاب انزلی	بهاره
		پاییزه
	خشکرد	۳۵
آذربایجان	کورا	۳۵

۲-۳-۲- مواد مصرفی و تجهیزات

۱-۲-۳-۲- مواد مصرفی مورد نیاز

فنل متعادل شده (PH = ۷/۵-۸) ساخت کمپانی Merck ، کلروفورم ساخت کمپانی Merck ، اتانول مطلق و ۷۰ درصد ساخت کمپانی Merck ، پروتئیناز K (MBI Fermentas) سر سمپلر (Treff)، میکروتوپ ۱/۵، ۰/۵، و ۰/۲ میلی لیتری (Treff)، STE، تهیه شده از شرکت سیناژن، SDS^۱ تهیه شده از شرکت سیناژن، ۱۵ جفت آغازگر اختصاصی کپورماهیان ساخت کمپانی MWG-Biotech ، استات سدیم با PH = ۵/۲ تهیه شده از شرکت سیناژن، آگارز، شاخص وزنی DNA (pBR322 DNA/Alul Marker,20) ساخت کمپانی MBI Fermentas ، dNTP Mix ، ساخت کمپانی MBI Fermentas (حاوی ۱۰ میلی مول از هر یک از نوکلئوتیدهای خالص dGTP, dTTP, dATP, dCTP در بافری با PH = ۷/۵ ، آنزیم Taq DNA Polymerase (حاوی ۵ واحد Taq DNA Polymerase در هر میکرولیتر محلول) تهیه شده از شرکت سیناژن، آنزیم Rnase، اتیدیم بروماید ساخت شرکت Sigma ، بافر TBE^۲ (PH=۸) تهیه شده از شرکت سیناژن، MgCl_۲ تهیه شده از شرکت سیناژن با غلظت ۵۰ میلی مولار، بافر PCR(10X) (شامل ۵۰۰KCL میلی مولار و ۲۰۰ Tris-HCL میلی مولار) تهیه شده از شرکت سیناژن، بافر سنگین کننده^۳، پلی آکریل آمید (آکریل آمید+ بیس آکریل آمید) تهیه شده از شرکت سیناژن، نترات نقره تهیه شده از

^۱ . Sodium Dodecyl sulfate (C₁₂H₁₅O₄SNA)

2.Tris Boric acid EDTA

3.Loding buffer(Bromophenol Blue)

4.Ammonium per sulfste

شرکت سیناژن، فرمالدئید ساخت کمپانی Merck، پودر NaBH_4 تهیه شده از شرکت سیناژن، A.P.S تهیه شده از شرکت سیناژن، TEMED ساخت کمپانی Merck، روغن معدنی PCR تهیه شده از شرکت سیناژن، نمونه باله سینه و باله پستی ۲۱۰ عدد از ماهی های سفید از مناطق مختلف، آب مقطر استریل، دستکش یکبار مصرف.

۲-۳-۲-۳- تجهیزات مورد استفاده

نمونه بردارهای متغیر ساخت کمپانی Eppendorf، دستگاه بن ماری، سانتریفوژ Hettich با قدرت چرخش rpm ۱۳۰۰۰، دستگاه انکوباتور، الکتروفورز افقی مدل 7601-EPS شرکت پایا پژوهش، الکتروفورز عمودی مدل VEU-7305 شرکت پایا پژوهش، دستگاه ترانس ایلومیناتور مدل DOC-008.XD ساخت کمپانی UVI، دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Bwacn2000، دستگاه ترمال سایکلر ساخت کمپانی Eppendorf و ترمال سایکلر Corbett Research(CR) ورتکس.

۲-۳-۳- استخراج DNA

تمامی ژنوم بوسیله شکستن سلول ها، جدا نمودن پروتئین ها و هیدرات های کربن از اسیدهای نوکلئیک و در نهایت رسوب دادن DNA با اتانول مطلق از بافت ها استخراج می شود. به این ترتیب که در ابتدا بافت مورد نظر در یک بافر لیز کننده همراه با پروتئیناز (آنزیمی برای شکستن پروتئین ها) همگن شده و سپس یک حجم فنل به آن افزوده شده و به شدت مخلوط می شوند. از آنجایی که فنل و آب مخلوط شدنی نیستند بر اساس بار الکتریکی مربوط، پروتئین ها و اسیدهای آمینه به سمت فاز فنلی مهاجرت می کنند و در مقابل اسیدهای نوکلئیک در فاز آبی باقی می مانند. این فرایند ادامه پیدا می کند و باقیمانده فنل بوسیله افزودن کلروفرم و سپس استخراج فاز آبی از مخلوط جدا می گردد. در نهایت DNA بوسیله اتانول از فاز آبی جدا شده و ته نشین می شود (Hoelzel and Dover, 1991).

در آزمایشگاه استخراج DNA به دو روش استخراج با فنل - کلروفرم و بدون استفاده از فنل و کلروفرم انجام می شود که به علت انتخاب روش اول برای انجام این تحقیق از بیان روش دوم خودداری می گردد. به منظور

استخراج DNA از بیومس ماهی سفید روش استاندارد فنل - کلروفرم (Hillis and Moritz, 1990) با کمی تغییر

و با مراحل ذیل به ترتیب انجام گردید:

۱. حدود ۵۰ میلی گرم نمونه باله ماهی سفید پس از آنکه بوسیله کاغذ صافی کاملاً خشک گردید به ویال یا تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و له شد.

۲. سپس برای هضم بافت مورد نظر بویژه پروتئین ها بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر STE ، ۳۰ میکرولیتر SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۱۰ درصد و ۷-۴ میکرولیتر پروتیناز ۱۰k میلی گرم در میلی لیتر اضافه گردید.

۳. جهت فعال نمودن کامل آنزیم پروتیناز ویال حاوی نمونه را به مدت ۴-۳ ساعت در ترمومیکسر یا بن ماری ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شده در طی این مدت نمونه بطور کامل هضم شده و به صورت امولسیون غلیظ در آمد.

۴. سپس جهت دناتورده شدن پروتئین و حل چربی ها به آن ۵۰۰ میکرولیتر فنل (PH = ۸) اضافه کرده، چند لحظه بوسیله ورتکس مخلوط شده و برای مدت حداقل یک ساعت با استفاده از شیکر بهم زده و بلافاصله در سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. باید توجه داشت که بهم خوردن بسیار شدید این دو محلول (فنل و امولسیون حاصل از هضم نمونه) ممکن است موجب شکستن مولکول DNA به قطعات کوچکتر گردد.

۵. سپس به آرامی فاز بالایی را توسط یک نمونه بردار^۱ جدا کرده و در داخل ویال جدیدی ریخته و برای حذف بقایای فنل بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه نمونه دوباره مراحل شیکر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و سانتریفوژ ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه و جدا سازی فاز بالایی طبق مرحله قبل انجام شد.

۶. به فاز رویی ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم سه مولار اضافه کرده، لوله ها بوسیله دست به آرامی چندین مرتبه سر و ته شدند و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. رسوب سفید رنگی در تیوپ شکل می بندد که همان DNA است، الکل و استات دور ریخته شده بعد از خشک کردن به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، را با الکل ۷۰ درجه شستشو داده به مدت ۲ دقیقه در دوره ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ

^۱. sampler

نمونه و فاز رویی خالی شد، جهت خشک شدن و تبخیر الکل از رسوب DNA نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در هوای اتاق (از انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نیز می توان استفاده کرد) قرار داده شدند.

۷. پس از خشک شدن بر روی رسوب DNA ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۳ میکرولیتر RNase اضافه شده در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا DNA بطور کامل در آب حل و قطعات RNA ناخواسته هضم گردد سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۴-۳-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید.

۱-۴-۳-۲- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

برای تعیین کمیت DNA نمونه های DNA استخراج شده پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL (مدل DE ۲۰۴۰) با آب مقطر، ۵ میکرولیتر DNA ژنومی به وسیله آب مقطر به حجم $300\mu L$ رسانده شد، مقدار جذب نوری نمونه ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت $A_{260}/280$ به وسیله دستگاه اندازه گیری و ثبت شده و در پایان غلظت DNA با استفاده از فرمول ۱-۲ محاسبه گردید.

فرمول ۱-۲

$$A_{260} \times D \times 50 = \text{غلظت DNA بر حسب نانو گرم بر میلی لیتر (ng/ml)}$$

A میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر

$$D = 300/5 = 60$$

اگر نسبت جذب $A_{1}/A_{2} = 1/8$ باشد DNA مناسب است و اگر $A_{1}/A_{2} > 1/8$ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر نسبت جذب $A_{1}/A_{2} < 1/8$ باشد نشان دهنده ناخالصی و آلودگی با فنل و پروتئین است.

۲-۳-۴-۲- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز

مواد مورد استفاده: بافر TAE با غلظت 10X (تریس استات)، آگارز، بافر سنگین کننده، اتیدیوم بروماید ۱ درصد، آب مقطر تزریقی.

تجهیزات مورد استفاده: نمونه بردارها و نوک های مربوطه به آنها با توانایی برداشتن نمونه با حجم ۲۰ میکرولیتر، سینی ژل و شانه های آن، دستکش یک بار مصرف، دستگاه UV ترانس ایلومیناتور، الکتروفورز افقی و منبع تامین کننده جریان الکتریسته مدل 7601-EPS شرکت پایا پژوهش

روش ارزیابی: در این روش DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد (بر حسب اندازه DNA) طی مراحل زیر الکتروفورز گردید.

۱- تانک الکتروفورز ژل را تمیز و خشک نموده و در سطح افقی قرار داده شد.

۲- سینی مخصوص ژل را در محلی مسطح قرار داده و شانه روی ژل قرار داده شده بطوری که تا یک میلی متر با کف سینی ژل فاصله داشته باشد و دو طرف سینی با استفاده از چسب نواری بسته می شود.

۳- برای تهیه ژل آگارز یک درصد ۳ میلی لیتر بافر TAE (10x) را در ارلن ریخته و ۰/۳ گرم آگارز به آن اضافه گردید و حجم آن با آب مقطر به ۳۰ میلی لیتر رسانده شد.

۴- سوسپانسیون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز در آن حل و شفاف شود و سپس ارلن در دمای محیط آزمایشگاه قرار می گیرد تا سرد شود.

۵- زمانی که دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد رسید مقدار یک میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۱ درصد به آن اضافه و محلول کاملاً بهم زده شد.

۶- آگارز مذاب را در سینی ژل ریخته و اجازه داده تا منعقد گردد.

۷- پس از بستن ژل حامل های دو طرف سینی را باز و ژل به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد و پس از مدتی شانه ژل به آرامی از ژل خارج گردید.

۸- ۵ میکرولیتر از DNA ژنومی همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط و با دقت به هر یک از چاهک های ژل ریخته شد.

۹- تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۹۰ ولت و ۴۵ میلی امپر تنظیم گردید.

۱۰- پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر بر روی دستگاه UV ترانس ایلومیناتور منتقل گردید و کیفیت DNA از لحاظ خلوص، آلودگی فنلی، پروتئین و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

۵-۳-۲- آماده سازی آغازگر

طراحی آغازگرهای ریز ماهواره ای بر اساس ترادف DNA ژنومی خانواده کپور ماهیان که Turner و همکاران در سال ۲۰۰۴، Crooijmans و همکاران در سال ۱۹۷۷ و Dimsoski و همکاران در سال ۲۰۰۰ بکار گرفتند با این فرض که با توجه به حفاظت شدگی ریز ماهواره ها شاید بتواند روی گونه ماهی سفید دریای خزر هم پاسخگو باشد مورد استفاده قرار گرفت و از شرکت MWG-Biotech برای سنتز سفارش داده شد. آغازگرهای لیوفلیزه طبق دستور شرکت سازنده بصورت محلول در آورده شد و بر حسب غلظت آن به نسبت ۱ به ۵ رقیق سازی انجام گرفت و در میکروتیوبهای ۰/۵ میلی لیتری بصورت جداگانه هر کدام ۱۰۰-۲۰ میکرولیتر ریخته و در ۲۰-درجه سانتیگراد قرار داده شد. از آنجایی که داشتن توالی DNA مربوط به یک منطقه خاص از ژنوم یک گونه این اجازه را می دهد تا همین منطقه خاص از ژنوم مربوط به گونه های بسیار نزدیک یا جمعیت های مشابه از یک گونه را با همان یک جفت آغازگر تکثیر گردد لذا برای تمامی مناطق همین ۱۵ جفت آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در ماهی سفید در جدول ۲-۲ آمده است.

جدول ۲-۲ پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی

Locus	Primer sequence	Gen bank	Refrence
Ca_1	AAGACGATGCTGGATGTTTAC CTATAGCTTATCCCGGCAGTA	AF277573	Dimoski et al., 2000
Ca_2	GGCAGTGAGGGACGCAGAC TCTAGCCCCAAATTTTACGG	AF277574	
Ca_3	TTGAGTGGATGGTGTGTA GCATTGCCAAAAGTTACCTAA	AF277575	
Ca_4	GTGAAGCATGGCATAGCACA CAGGAAAGTGCCAGCATAAC	AF277576	
Ca_5	TTGAGTGGATGGTGTGTA GCATTGCCAAAAGTTACCTAA	AF277577	
Ca_6	GTGAAGCATGGCATAGCACA CAGGAAAGTGCCAGCATAAC	AF277578	
Ca_7	GTTTGAAGTGGGATTAAT GTTGTGTATACCTTGTTAAAG	AF277579	
Ca_8	GTGAAGCATGGCATAGCACA CAGGAAAGTGCCAGCATAAC	AF277579	
LCO_1	CACGGGACAATTTGGATGTTTTAT AGGGGGCAGCATAACAAGAGACAAC	AY318777	Turner et al., 2004
LCO_2	ATTTTATAGGAGTGATGTTTACAGCAT CAAGTGTGTCATTGAGGAAGTGAG	AY318778	
LCO_3	GCAGGAGCGAAACCATAAAT AAACAGGCAGGACACAAAGG	AY318779	
LCO_4	ATCAGGTCAGGGGTGTCACG TGTTTATTTGGGGTCTGTGT	AY318780	
MFW_1	GTCCAGACTGTTTCATCAGGAG GAGGTGTACTGAGTACACGC	EF144118	Crooijmans et al.; 1997
MFW_2	CACACCGGGCTACTGCAGAG GTGCAGTGCAGGAGTTTGC	EF144119	
MFW_3	GATCAGAAGTACAGAGAAG CCTTACAGAAAACCTGTTTGC	EF144120	

۶-۳-۲- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (Mullis et al., 1985)

برای انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰ نانو گرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از آغازگرها (۳۰ پیکو مول) بعلاوه ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر Taq ($5u/\mu$)، ۲/۵ میکرولیتر بفر PCR (10x)، ۰/۸ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن را با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده، بعد از چند ثانیه سانتیفریژ، تیوپ ها در ترموسایکلر قرار گرفتند و یا برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید، سپس روی یخ ترکیبات جدول ۳-۲ با مقادیر مشخص شده افزوده گردید و محتویات ویال ها توسط نمونه بردار خوب به هم زده شد و سپس ویال ها را به

مدت ۱۰ ثانیه سانتزیفیوژ کرده تا محتویات لوله ها ته نشین گردد (لازم به ذکر است هر گاه در شرایط استاندارد PCR نتیجه ای مشاهده نشود مقدار MgCl₂ و تعداد سیکل ها تغییر می یابد).

جدول ۲-۳ نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA استخراجی	۱۰۰ نانو گرم	۱ میکرو لیتر ≤
آنزیم تک DNA پلیمرز	5u / μ	۰/۲ میکرو لیتر
DNTPS		۰/۵ میکرو لیتر
MgCl ₂	۱۰ میلی مولار	۰/۸ میکرو لیتر
PCR Buffer	۵۰ میلی مولار	۲/۵ میکرو لیتر
آغازگر ۱	۱۰X	۱ میکرو لیتر
آغازگر ۲	۳۰ /Variable پیکو مول	۱ میکرو لیتر تا ۲۵ میکرو لیتر
آب مقطر		

۱-۶-۳-۲- بهینه کردن PCR و پروفیل های حرارتی آن

برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید (جدول ۴-۲) در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) غلظت MgCl₂، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs بهینه سازی گردید.

در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ تا ۸ درجه سانتی گراد انتقال می دهیم تا برای آزمایش های بعد که شامل انتقال بر روی ژل آگارز ۲٪ برای سنجش وجود و کیفیت محصول PCR و پلی اکریل آمید به منظور ایجاد باندهای مورد نظر می باشد در دسترس باشد. پس از آزمایش های فوق، محصولات PCR را به فریزر ۲۰ درجه سانتی گراد انتقال می دهیم.

جدول ۲-۴ برنامه های داده شده به دستگاه PCR

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (سانتی گراد)	مراحل
۱	۵-۱۰	۹۴	واسرشته سازی اولیه
	۰/۵	۹۴	واسرشته سازی
۲۰-۳۵	۰/۵	۵۳-۶۶	الحاق
	۰/۵-۳	۷۲	بسط
۱	۳-۱۰	۷۲	بسط نهایی

۷-۳-۲- الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با نشانگر DNA (MBI Fermentas, pBR322 DNA/Alui Marker, 20) بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و با روش رنگ آمیزی نترات نقره بدست آمد. شکل ۲-۳ نحوه تفکیک باندهای نشانگر pBR322 DNA/Alui Marker, 20 را بر روی ژل آگارز ۱/۷ و ۵/۹ درصد نشان می دهد. از آنجایی که حساسیت ژل پلی اکریل آمید ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر ژل آگارز می باشد. در تحقیق حاضر از این ژل برای بررسی نتایج PCR استفاده گردید (Bassam *et al.*, 1991).

۱-۷-۳-۲- مواد مورد استفاده: TBE(10X)، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد، TEMED، بافر سنگین کننده و نشانگر pBR322 DNA/Alui ساخت شرکت MBI Fermentase.

۲-۷-۳-۲- تجهیزات مورد استفاده: الکتروفورز عمودی و منبع تامین کننده جریان الکتریسته مدل VEU-7305 شرکت پایا پژوهش

۳-۷-۳-۲- روش کار جهت تهیه ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد: جهت تهیه ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد ابتدا ۳۱ میلی لیتر آب مقطر را با ۱۳/۵ میلی لیتر پلی اکریل آمید ۳۰ درصد و ۴/۵ میلی لیتر بافر TBE (10X) در داخل بالن دارای بازوی جانبی ریخته و به مدت ۴ دقیقه توسط دستگاه کمپرسور هواگیری شد و سپس ۳۸۵ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر از محلول TEMED به مخلوط قبلی اضافه شده این ترکیب در فضای بین دو شیشه که از طرفین و قسمت زیری مسدود و از قسمت بالایی نیز شانه ای را در فضای بین خود جا داده ریخته شد، جلوگیری از ایجاد حباب هوا در این مرحله کاملاً الزامی است. مدت زمان لازم

برای پلیمریزه شدن این ژل حدود ۳۰ دقیقه بوده و بعد از این مدت شانه به آرامی از قسمت بالایی خارج و بعد از شستشوی چاهک های ایجاد شده توسط محلول TBE(1x) (بافر الکتروود)، نمونه های PCR را به ترتیب در محل چاهک ها ریخته، و ژل در ستون عمودی بافر TBE(1X) قرار گرفت بطوری که ژل در بین دو مخزن بافر قرار گرفته و تنها ارتباط بین این دو بافر از طریق ژل میسر باشد. زمانی که دستگاه به مولد برق با ولتاژ ۱۵۰ ولت وصل می گردد به مخزن بالا قطب مثبت و به مخزن پایین قطب منفی وصل می شود. که باعث برقراری جریان از سمت مخزن بالا به سمت مخزن پایین و حرکت نمونه های لود شده در چاهک در این مسیر می شود و قطعات DNA تکثیر شده بر اساس وزن مولکولی خود در طول ژل از هم جدا می شوند، الکتروفورز نمونه ها در مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت نمایان شدن باندهای DNA از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد و برای اطمینان از تکرار پذیری نوارها آزمایش مجدداً در شرایط یکسان تکرار گردید (Bassam *et al.*, 1991).

۸-۳-۲- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره

جهت رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید سه نوع محلول به صورت زیر تهیه شدند:

۱- محلول A، بافر اسید استیک ۰/۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد

اتانول ۴۰ میلی لیتر

اسید استیک ۲۰ میلی لیتر

آب مقطر ۳۶۰ میلی لیتر

۲- محلول B، بافر نیترات نقره ۰/۱ درصد

نیترات نقره ۰/۲ گرم

آب مقطر ۲۰۰ میلی گرم

۳- محلول C، بافر فرمالدئید ۰/۱۵ درصد، NaBH₄ ۰/۱ درصد و NaOH ۴/۵ درصد

NaOH ۴/۵ گرم

NaBH₄ ۰/۰۳ گرم

آب مقطر ۳۰۰ میلی لیتر

فرمالین ۱/۲ میلی لیتر

لازم به ذکر است که جهت تهیه محلول شماره ۳ (محلول C) ابتدا هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل و سپس مواد دیگر بر روی آنها ریخته می شود.

پس از اتمام زمان الکتروفورز، ژل از صفحات شیشه ای با یک کاردک جدا و جهت رنگ آمیزی ابتدا دوبار و در هر بار به مدت ۳ دقیقه ژل در داخل محلول A بر روی شیکر قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B منتقل و در پایان این مدت دوبار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو شد. در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه یا تا زمانی که باندها بصورت نوارهای تیره رنگی دیده شوند در محلول C قرار داده شد. ژل های رنگ آمیزی شده به درون پوشش پلاستیکی منتقل و جهت نگهداری پرس شدند.

با توجه به وجود یا عدم وجود جهش در محل های ویژه جایگاه های ریز ماهواره ای، قطعات DNA با وزن مولکولی متفاوت از محصول PCR تولید می گردد که تفاوت بین باندهای DNA و اختلاف در وزن مولکولی که منجر به تولید ژنوتیب های مختلف می گردد را با قرار دادن یک شناساگر (در این تحقیق نشانگر pBR322) در کنار نمونه ها قابل تخمین است برای شناسایی ژنوتیب ها استفاده می شوند. این شناساگرها چیزی نیستند جز ژنوم باکتری های خاص که توسط آنزیم های مختلف به قطعات متعدد با وزن مولکولی مشخص برش داده شده اند (Bassam et al., 1991).

۹-۳-۲- ثبت تصاویر

تصاویر ژل پلی اکریل آمید پس از رنگ آمیزی ابتدا توسط دستگاه مستند سازی ژل^۱ ترانس ایلومیناتور مدل DOC008.XD ساخت کمپانی UVI همراه با برنامه نرم افزاری UVI DOC Version V.99.04 در آزمایشگاه بیو تکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در خزر آباد شهرستان ساری ثبت و ذخیره گردید.

¹ . Gel documentation

۱۰-۳-۲- سنجش وزن مولکولی محصول PCR و امتیاز دهی باندها

تصاویر ژل پلی اکریل آمید پس از ثبت و ذخیره شدن توسط دستگاه مستند سازی ژل جهت سنجش وزن مولکولی باندهای محصولی PCR و به دست آوردن اندازه آلل ها و تعیین انواع آنها و نیز تعیین ژنوتیپ ها از نرم افزار کامپیوتری LabImage version 3.3.3 استفاده گردید. در هر ژنوتیپ وجود یک باند به منزله هموزیگوستی و مشاهده دو باند، به منزله هتروزیگوستی منظور گردید.

۱۱-۳-۲- آنالیز آماری

فراوانی آللی، هتروزیگوستی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل های واقعی و موثر در جایگاه های ریز ماهواره ای، شاخص شانون، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس (Nei(1972,1978)، تعادل هاردی واینبرگ بر اساس χ^2 ، مقادیر Rst و Fst، جریان ژنی، ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۶ ناحیه و ۲ منطقه منطقه اول رودخانه کورا و منطقه دوم نواحی سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس آزمون AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار Gene Alex version محاسبه گردید (Peakall and smouse, 2005).

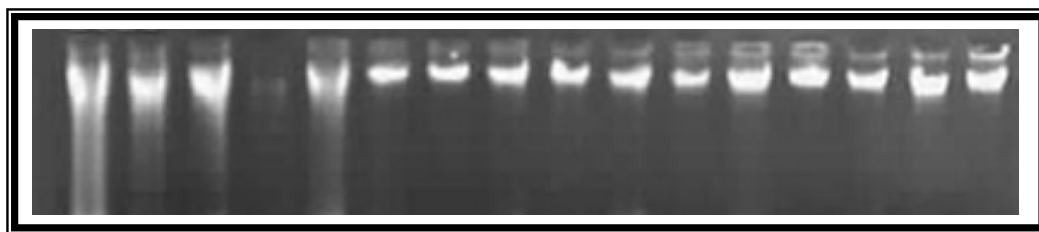
۲-۴- نتایج بررسیهای مولکولی

۲-۴-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کمیت و کیفیت DNA به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

۲-۴-۱-۱- روش الکتروفورزی

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA های استخراج شده از باله ماهی به روش فنل-کلروفورم از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشند. باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند و این بیانگر آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی، فنلی، آلودگی به RNA است (شکل ۳-۱)



شکل ۳-۱- نمونه‌ای از DNA استخراج شده به روش فنل-کلروفورم بر روی ژل آگاروز ۱٪

۲-۴-۱-۲- اسپکتروفتومتری DNA

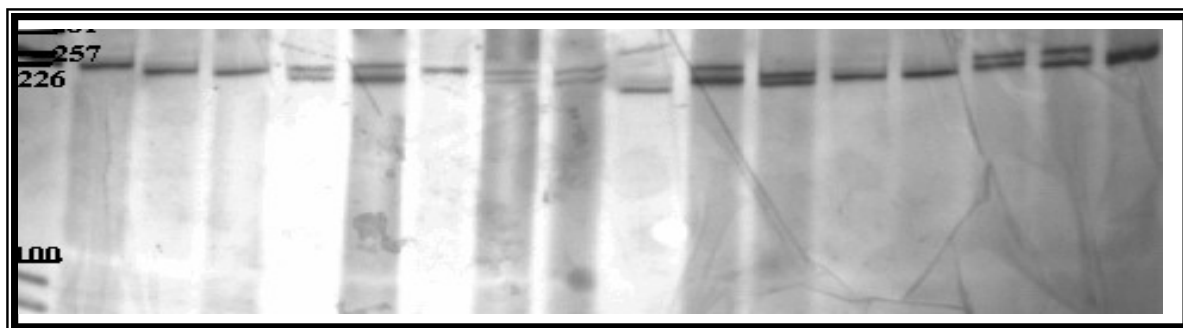
میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm بوسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت می باشد. نمونه هائی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی بر اساس فرمول محاسبه شده در کلیه ۲۱۰ نمونه بین ۱۵۰-۲۵۰ ng/1 بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA، در غلظت ۱۰۰ ng/1 مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۴-۲-۲- ارزیابی محصول PCR

پس از قرار دادن نمونه ها در دستگاه PCR مدت ۱/۵ ساعت برای تکمیل برنامه صرف گردید و سپس محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد.

۲-۴-۲-۱- جایگاه Lco1 (Turner et al., 2004)

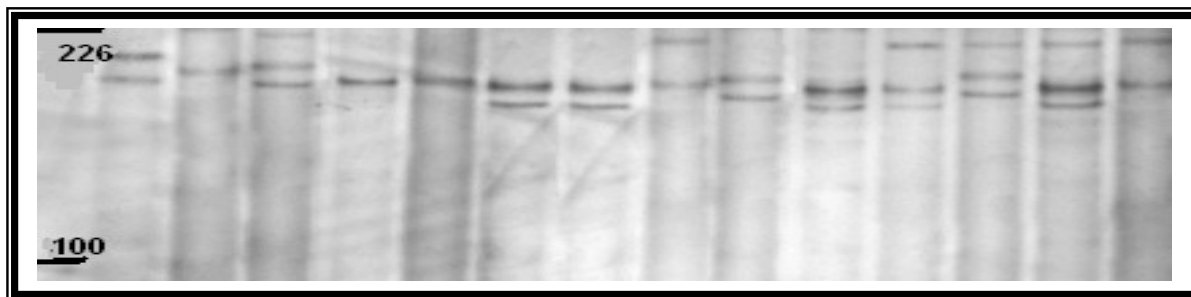
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۰°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۱۲ الل و دامنه اندازه اللی بین ۲۸۰-۱۸۴ جفت باز بود (شکل ۲-۴).



شکل ۲-۳- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر Lco1 (AY318777) پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۲-۴-۲-۲- جایگاه Lco2 (Turner et al., 2004)

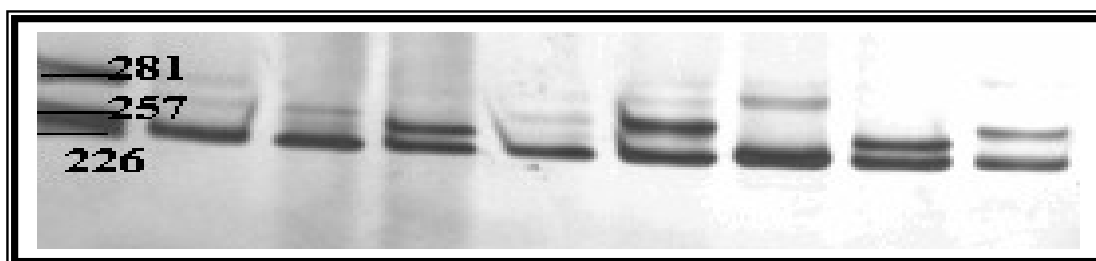
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۲°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۱۰ الل و دامنه اندازه اللی بین ۱۹۶-۱۳۲ جفت باز بود (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر (AY318778) Lco2 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۳-۲-۴- جایگاه Lco3 (Turner et al., 2004)

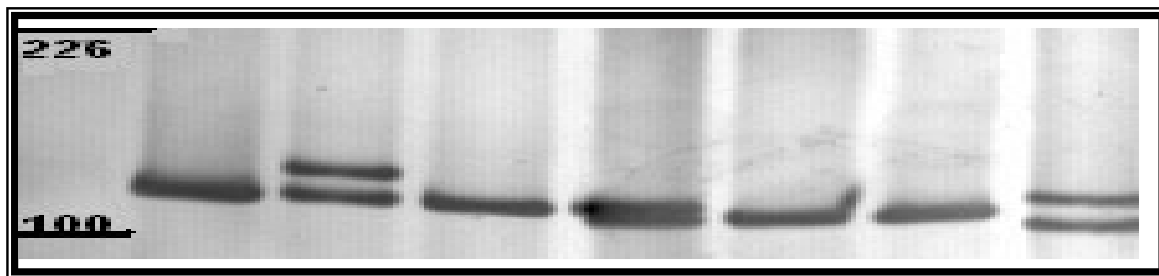
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای 63°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۱۶ الی و دامنه اندازه الی بین ۲۶۸-۱۶۰ جفت باز بود (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر (AY318779) Lco3 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۴-۲-۴- جایگاه Lco4 (Turner et al., 2004)

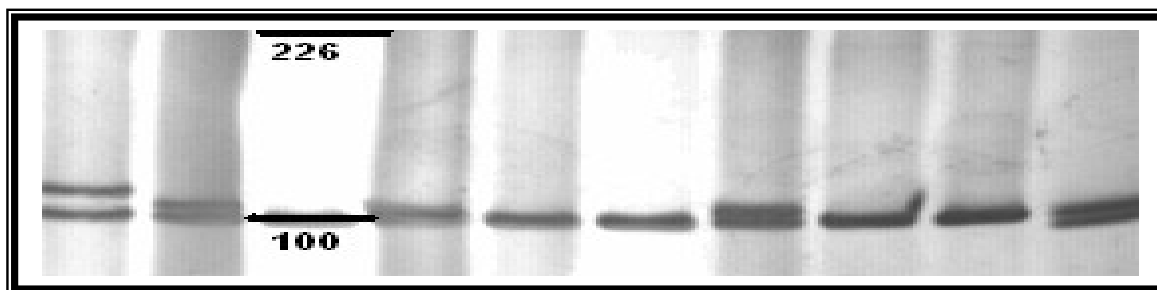
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای 57°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۴ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۱۶-۱۰۴ جفت باز بود (شکل ۴-۵).



شکل ۵-۵- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر Lco4 (AY318780) پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۵-۲-۴-۲- جایگاه Ca1 (Dimsoski et al., 2000)

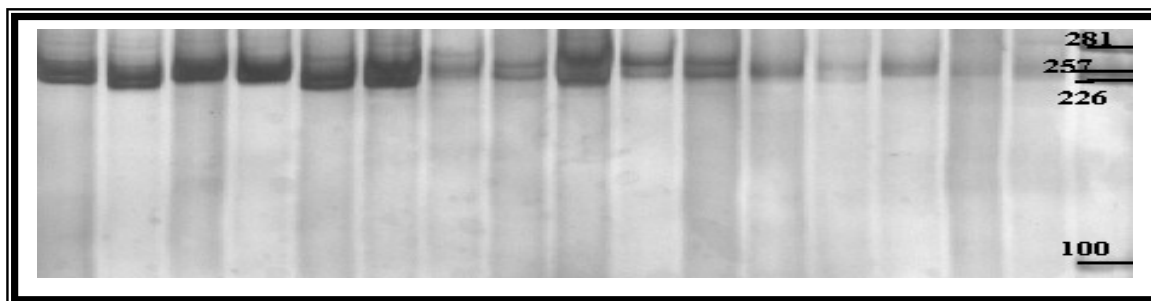
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای 55°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۴ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۱۶-۱۰۴ جفت باز بود (شکل ۴-۶).



شکل ۶-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر Ca1 (AF277573) پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۶-۲-۴-۲- جایگاه Ca2 (Dimsoski et al., 2000)

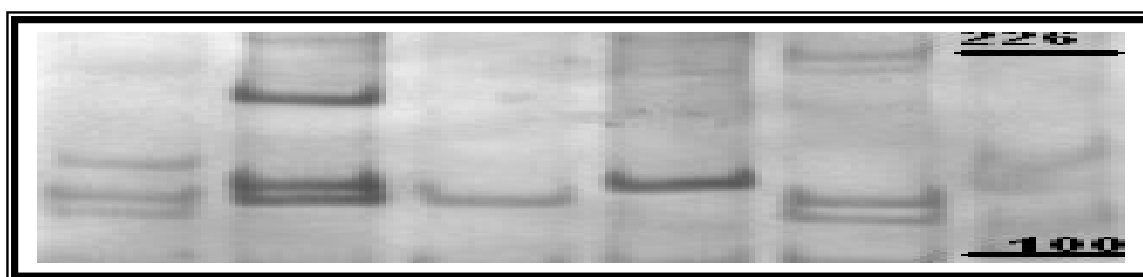
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای 58°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۱۰ الی و دامنه اندازه الی بین ۲۷۶-۲۳۲ جفت باز بود (شکل ۴-۷).



شکل ۷-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر (AF277574) Ca2 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۷-۲-۴-۲- جایگاه Ca3 (Dimsoski et al., 2000)

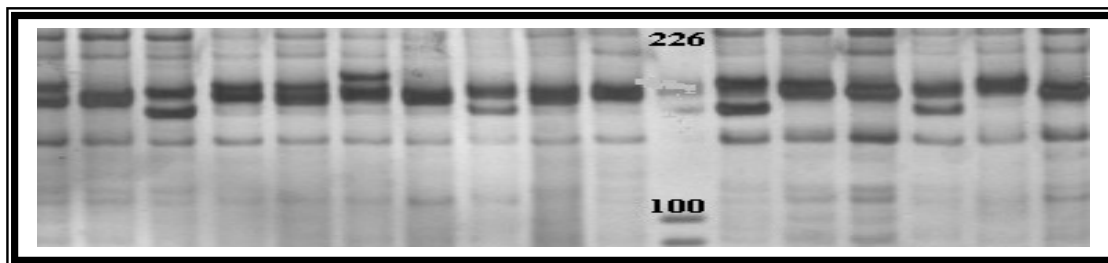
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۵۸°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۵ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۶۴-۱۳۶ جفت باز بود (شکل ۸-۴).



شکل ۸-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر (AF277575) Ca3 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۸-۲-۴-۲- جایگاه Ca4 (Dimsoski et al., 2000)

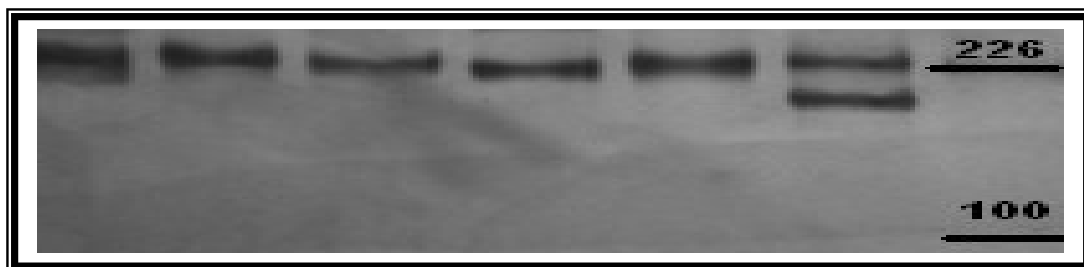
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۱°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۵ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۰۴-۱۲۰ جفت باز بود (شکل ۹-۴).



شکل ۹-۴- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر Ca4 (AF277576) پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۹-۲-۴-۲- جایگاه MFW2 (Crooijmans *et al.*, 1997)

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای 62°C مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۲۱۰ نمونه مورد مطالعه ۵ الی و دامنه اندازه الی بین ۲۲۴-۲۰۸ جفت باز بود (شکل ۱۰-۴).



شکل ۱۰-۴ محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر MFW2 (EF144125) پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

در مجموع ۹ جایگاه ریز ماهواره ای تولید باندهای پلی مورفیک DNA که دمای اتصال و تعداد الیهای مشاهده شده برای آنها در جدول ۳-۴ آمده است.

جدول ۵-۴- خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاههای پلی مورف

ردیف	نام جایگاه	GeneBank	محدوده بانندی (جفت باز)	دمای اتصال ° C	تعداد الی مشاهده شده
۱	Ca1	AF277573	۱۰۴-۱۱۶	۵۵	۴
۲	Ca2	AF277574	۲۳۲-۲۷۶	۵۸	۱۰
۳	Ca3	AF277575	۱۳۶-۱۶۴	۵۸	۵
۴	Ca4	AF277576	۱۳۸-۱۶۰	۶۱	۶
۵	Lco1	AY318777	۱۸۴-۲۸۰	۶۰	۱۲
۶	Lco2	AY318778	۱۳۲-۱۹۶	۶۲	۱۰
۷	Lco3	AY318779	۱۶۰-۲۶۸	۵۳	۱۶
۸	Lco4	AY318780	۱۰۴-۱۱۶	۵۷	۴
۹	MFW2	EF144125	۲۰۸-۲۲۴	۶۶	۵

۳-۴-۲- الیهای پلی مورف (چند شکلی)

مطابق با تعریف پلی مورف بودن (فراوانی الی کمتر از ۹۹ درصد است) ، تمام جایگاههای مورد آنالیز پلی مورف هستند. فراوانی الی جایگاههای مورد مطالعه در جدول ۶-۲ آمده است.

جدول ۶-۲- آلهها و اندازه های آن (جفت باز) در ۹ جایگاه مختلف پلی مورف در ماهی سفید

جایگاه آن	AF277573	AF277574	AF277575	AF277576	AY318777	AY318778	AY318779	AY318780	EF144125
A	۱۰۴	۲۳۲	۱۳۶	۱۳۶	۱۸۴	۱۳۲	۱۶۰	۱۰۴	۲۰۸
B	۱۰۸	۲۳۶	۱۴۸	۱۴۰	۲۰۰	۱۴۴	۱۶۸	۱۰۸	۲۱۲
C	۱۱۲	۲۴۸	۱۵۲	۱۴۴	۲۱۲	۱۴۸	۱۷۲	۱۱۲	۲۱۶
D	۱۱۶	۲۵۲	۱۵۶	۱۴۸	۲۱۶	۱۵۲	۱۸۰	۱۱۶	۲۲۰
E		۲۵۶	۱۶۴	۱۵۴	۲۲۰	۱۵۶	۱۸۸		۲۲۴
F		۲۶۰		۱۶۰	۲۳۶	۱۷۲	۱۹۲		
G		۲۶۴			۲۵۲	۱۷۶	۱۹۶		
H		۲۶۸			۲۶۰	۱۸۰	۲۰۴		
I		۲۷۲			۲۶۴	۱۹۲	۲۱۶		
J		۲۷۶			۲۷۲	۱۹۶	۲۲۰		
K					۲۷۶		۲۲۸		
L					۲۸۰		۲۳۲		
M							۲۵۲		
N							۲۵۶		
O							۲۶۴		
P							۲۶۸		

۴-۲-۴-۴-۴ واقعی (na) و موثر (ne)

معیار دیگری که برای تعیین میزان چند شکلی (پلی مورفیسم) جایگاهها استفاده می شود تعداد الل واقعی و موثر است. بیشترین تعداد الل واقعی در جایگاه AY318779 و مربوط به نمونه های بهاره تالاب انزلی و کورا (۱۳ الل) و کمترین مقدار آن در جایگاه AY318780 و مربوط به نمونه های کورا می باشد (۲الل). بیشترین تعداد الل موثر (۸/۸۸ الل) در جایگاه AY318779 در نمونه های کورا و کمترین مقدار آن در جایگاههای AF277576 مربوط به نمونه های گرگانرود (۱/۳۵ الل) می باشد.

جدول ۸-۲- تعداد الل واقعی و موثر ۹ جایگاه بررسی شده در ماهی سفید

کورا n=۳۵	گرگانرود n=۳۵		تنکابن n=۳۵		خشکروود n=۳۵		بهاره تالاب انزلی n=۳۵		پایزه تالاب انزلی n=۳۵		جایگاه الل	
	na	ne	na	ne	na	ne	na	ne	na	ne		
۱۳	۸/۸۸	۹	۴/۴۵	۱۰	۶/۳۱	۹	۴/۹	۱۳	۷/۴	۱۰	۷/۰۲	AY318779
۹	۶/۱۵	۶	۴/۱۳	۶	۴/۳۵	۷	۴/۷	۸	۵/۶	۷	۵/۹	AY318777
۷	۴/۶۴	۷	۴/۴	۶	۳/۵۳	۸	۳/۱	۶	۴/۵	۵	۳/۹۷	AY318778
۲	۱/۳۹	۴	۲/۴	۳	۲/۴۶	۳	۱/۵	۴	۲/۶	۴	۲/۸۲	AY318780
۴	۲/۶۴	۴	۲/۴	۴	۳/۳	۴	۳	۴	۲/۱	۵	۳/۱	EF144125
۴	۲/۷	۴	۳/۱۹	۴	۲/۶۸	۴	۲/۷	۴	۲/۴	۴	۳/۲	AF277573
۵	۳/۲۳	۴	۳/۵۳	۴	۳/۰۴	۶	۳/۷	۴	۳/۳	۸	۵/۹	AF277574
۵	۳/۸	۷	۵/۳۹	۵	۲/۶۴	۴	۳/۱	۴	۲/۲	۴	۳/۱	AF277575
۳	۲/۴۵	۶	۱/۳۵	۵	۳/۴۷	۳	۱/۱	۵	۳/۶	۵	۲/۸	AF277576
۵/۷۷	۳/۹۸	۵/۶۶	۳/۴۷	۵/۲۲	۳/۵۳	۵/۳۳	۳/۰۸	۵/۷۷	۳/۷۴	۵/۷۷	۴/۲	میانگین

۵-۲-۴-۵-۵-۲-نوع ژنتیکی

نوع ژنتیکی درون جمعیتی با معیارهای همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، برای هر ناحیه در هر جایگاه مورد مطالعه قرار گرفت و دامنه Ho در بین نواحی نمونه برداری در جایگاههای نه گانه ۱- ۰/۰۸۶ (۰/۵۴) میباشد که کمترین مقدار (۰/۰۸۶) در نمونه های کورا مربوط به جایگاههای EF144125 و AF277574 و بیشترین مقدار آن (۱) در جایگاه AF277573 در نمونه های بهاره تالاب انزلی مشاهده شد. دامنه

He نیز ۰/۸۷-۰/۱۰۹-۰/۴۹) است که کمترین مقدار آن در جایگاه AF277576 در نمونه های خشکرو و بیشترین مقدار آن در جایگاه AY318779 در نمونه های کورا مشاهده شد. مقادیر Ho و He در سطح جایگاهها برای کلیه نواحی نمونه برداری نیز محاسبه گردید که سطح تغییر پذیری هر جایگاه را در کل نواحی مورد بررسی را نشان می دهد. در این میان بیشترین مقدار He ۰/۸۴ در جایگاه AY318779 و کمترین مقدار آن (۰/۵۱) در جایگاه AY318780 و بیشترین مقدار Ho (۰/۷۷) در جایگاه AF277573 و کمترین مقدار آن (۰/۳۴) در جایگاه AY318777 مشاهده گردید. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در اکثر نواحی نمونه برداری در جایگاههای نه گانه، افزونی هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر He نسبت به Ho وجود دارد.

جدول ۹-۲- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)

برای نواحی نمونه برداری در هر جایگاه

کلیه نواحی	کورا n=۳۵		گرگانرود n=۳۵		تنکابن n=۳۵		خشکرو n=۳۵		بهاره تالاب انزلی n=۳۵		پایزه تالاب انزلی n=۳۵		جایگاه الل		
	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho			
	۰/۸۴	۰/۴۴	۰/۸۸۷	۰/۶۸۶	۰/۷۷۶	۰/۴	۰/۸۴۲	۰/۴۲۹	۰/۷۹۸	۰/۲۲۹	۰/۸۶۴	۰/۴۵۷	۰/۸۵۸	۰/۴۲۹	AY318779
	۰/۸۰	۰/۳۴	۰/۸۳۸	۰/۴	۰/۷۵۸	۰/۳۱۴	۰/۷۷	۰/۶۵۷	۰/۷۸۹	۰/۱۱۴	۰/۸۲۲	۰/۴۲۹	۰/۸۳۱	۰/۱۷۱	AY318777
	۰/۷۵	۰/۷۶	۰/۷۸۵	۰/۷۷۱	۰/۷۷۳	۰/۸۲۹	۰/۷۱۷	۰/۶۲۹	۰/۶۷۸	۰/۷۷۱	۰/۷۷۹	۰/۷۱۴	۰/۷۴۹	۰/۸۵۷	AY318778
	۰/۵۱	۰/۴۸	۰/۲۸۴	۰/۳۴۳	۰/۵۸۸	۰/۶	۰/۵۹۴	۰/۴	۰/۳۵۵	۰/۳۱۴	۰/۶۲۲	۰/۳۷۱	۰/۶۴۶	۰/۸۵۷	AY318780
	۰/۶۳	۰/۴۲	۰/۶۲۲	۰/۸۶	۰/۵۸۵	۰/۵۱۴	۰/۶۹۷	۰/۵۷۱	۰/۶۶۷	۰/۴۲۹	۰/۵۴۳	۰/۴۵۷	۰/۶۸۶	۰/۴۵۷	EF144125
	۰/۶۴	۰/۷۷	۰/۶۳۱	۰/۸۵۷	۰/۶۸۷	۰/۹۱۴	۰/۶۲۷	۰/۹۷۱	۰/۶۳۹	۰/۹۱۴	۰/۵۸۹	۱	۰/۶۹۳	۰/۹۷۱	AF277573
	۰/۷۲	۰/۵۳	۰/۶۹۱	۰/۸۶	۰/۷۱۷	۰/۶۵۷	۰/۶۷۱	۰/۸	۰/۷۳۱	۰/۲۸۶	۰/۶۹۸	۰/۷۱۴	۰/۸۳۲	۰/۶۲۹	AF277574
	۰/۶۸	۰/۳۸	۰/۷۳۷	۰/۴۸۶	۰/۸۱۵	۰/۴	۰/۶۲۲	۰/۲۸۶	۰/۶۸۲	۰/۱۱۴	۰/۵۴۷	۰/۲۸۶	۰/۶۸۴	۰/۶۸۶	AF277575
	۰/۵۷	۰/۴۹	۰/۵۹۲	۰/۵۴۳	۰/۲۶۰	۰/۲۸۶	۰/۷۱۲	۰/۸۸۶	۰/۱۰۹	۰/۱۱۴	۰/۷۲۱	۰/۷۱۴	۰/۶۵۲	۰/۴	AF277576
	۰/۶۸	۰/۵۱	۰/۶۷۴	۰/۴۷۳	۰/۶۶۲	۰/۵۴۵	۰/۶۹۵	۰/۶۲۵	۰/۶۰۵	۰/۳۶۵	۰/۶۸۷	۰/۵۷۱	۰/۷۳۶	۰/۶۰۶	کلیه جایگاهها

۶-۴-۲- شاخص شانون

چون حد نهایی هتروزیگوسیتی یک است و تفاوت میان مقادیر در چنین رنجی به خصوص برای نشانگرهای بسیار چند شکلی مثل ریزماهواره ها (که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند) به میزانی نمی باشد که اطلاعات دقیقی را بیان کند. بنابراین برای بزرگنمایی این مقادیر شاخص اطلاعات شانون (H) استفاده

شد. شاخص اطلاعات shanon (H) برای همه ایستگاهها به ازای جایگاههای نه گانه محاسبه گردید که نتایج حاصله را در جدول شماره ۱۰-۲ خلاصه گردیده است. بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه AY318779 در نمونه های بهاره تالاب (۲/۲۴) و و کمترین مقدار آن (۰/۲۵) در جایگاه AF277576 در نمونه های خشکروید مشاهده شد. به هنگام مقایسه جایگاهها با در نظر گرفتن تمام ایستگاهها نیز بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به جایگاه AY318777 (۱/۷۵) و AY318780 (۰/۸۷) می باشد.

جدول ۱۰-۲- شاخص اطلاعاتی شانون Shanon index در نواحی نمونه برداری و جایگاههای مختلف اللی

جایگاه ال	پایزه تالاب	بهاره تالاب	خشکروید	نتکابن	گرگانرود	کورا	میانگین
AY318779	۲/۰۹	۲/۲۴	۱/۸۲	۲/۰۲	۱/۷۹	۱/۳۲	۱/۷۱
AY318777	۱/۸۳	۱/۸۵	۱/۷۱	۱/۶	۱/۵۳	۱/۹۸	۱/۷۵
AY318778	۱/۴۸	۱/۶۴	۱/۳۸	۱/۴۳	۱/۶۵	۱/۷	۱/۵۴
AY318780	۱/۱۱	۱/۰۶	۰/۶۴	۰/۹۶۹	۱/۰۵	۰/۴۵	۰/۸۷
EF144125	۱/۳۱	۱/۰۴	۱/۲	۱/۲۸	۱/۱	۱/۱	۱/۰۰۵
AF277573	۱/۲۵	۱	۱/۱۴	۱/۱۲	۱/۲	۱/۱	۱/۱۵
AF277574	۱/۸۷	۱/۲۷	۱/۵۲	۱/۲۳	۱/۳۲	۱/۳۴	۱/۴۲
AF277575	۱/۲۴	۰/۹۶	۱/۲۱	۱/۱۴	۱/۷۶	۱/۴۶	۱/۲۹
AF277576	۱/۲۲	۱/۳۶	۰/۲۵	۱/۴	۰/۶	۰/۹۸	۰/۹۷

۷-۴-۲- تعادل هاردی - واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی نواحی مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون X^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که کلیه نمونه ها به جز نمونه های پایزه تالاب در جایگاههای AF277576 و EF144125، نمونه های خشکروید در جایگاه EF144125، گرگانرود و کورا در جایگاه AF277576 انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ ($P \leq 0/05$)، ($P \leq 0/001$) را نشان دادند (جدول ۱۰-۲). بررسی تعادل هاردی - واینبرگ

در تمامی نواحی مورد بررسی برای هر جایگاه ($P < 0.001$) انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند (جدول ۱۱-۲).

جدول ۱۱-۲- بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در نواحی مختلف, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.05$ *, ns : عدم معنی داری، prob: احتمال، df: درجه آزادی

جایگاه	AF277573	AF277574	AF277575 5	AF277576	AY318777	AY318778	AY318779	AY318780	EF144125
تایپ ۱	df	۵۵	۱۵	۶	۳	۳	۶	۲۸	۱
	X ²	۱۷۶/۱۳	۱۰۵/۷	۷۰	۷/۲۲	۳۶/۵۵	۳۵	۱۲۵/۹	۰/۵۸
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۶۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۴۴
	sig	***	***	***	ns	***	***	***	ns
تایپ ۲	df	۶۶	۲۱	۱۵	۳	۶	۶	۱۰	۳
	X ²	۱۷۶	۹۴/۴۳	۱۰۵	۲۷/۴۲	۷۰/۲۲	۳۵	۶۸/۳۶	۶۵/۸۸
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	sig	***	***	***	***	***	***	***	***
خیزکود	df	۲۸	۲۱	۳	۳	۶	۶	۱۵	۶
	X ²	۱۰۳/۵۳	۱۴۳/۹	۸/۴۱	۶۲/۳۵	۴۴/۳۶	۳۹/۸۲	۱۱۵/۴۶	۵۵/۶۵
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳
	sig	***	***	*	***	***	***	***	ns
تنگابن	df	۵۵	۲۱	۱۵	۳	۶	۶	۶	۳
	X ²	۱۷۰/۶۴	۱۱۰/۹	۸۸/۲۸	۲۳	۳۶/۲۴	۳۵	۵۲/۹۸	۲۸/۵۶
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	sig	***	***	***	***	***	***	***	***
گرگانرود	df	۲۱	۱۵	۱۵	۶	۶	۶	۶	۳
	X ²	۹۳/۷۲	۸۰/۸۶	۹۶/۳۲	۸/۷	۴۱/۴۲	۲۲/۰۲	۲۳/۰۷	۹۵/۵۸
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۹	۰/۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵
	sig	***	***	***	ns	***	***	***	*
کورا	df	۵۵	۲۱	۲۸	۱	۳	۳	۱۰	۱۰
	X ²	۱۱۹/۵	۱۱۲/۸	۱۳۲/۹	۱/۵	۴۷/۹	۳۱/۶	۱۰۲/۴	۴۹/۹
	pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۲۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	sig	***	***	***	ns	***	***	***	***

جدول ۱۲-۲- نتایج آزمون χ^2 برای تعادل هاردی-واینبرگ در سطح جایگاهها برای همه نمونه ها

معنی داری بودن	احتمال $p \leq 0.00$	χ^2	درجه آزادی (df)	جایگاه	
***	۰/۰۰	۱۳۹/۹	۴۶/۶	AF277573	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۱۰۸/۹	۱۹	AF277574	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۸۳/۴۸	۱۳/۶	AF277575	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۲۱/۷	۳/۱۶	AF277576	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۴۶/۱۲	۵	AY318777	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۳۱/۹۴	۵/۵	AY318778	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۸۱/۳۷	۱۲/۵	AY318779	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۴۹/۷	۷/۳	AY318780	کل نمونه ها
***	۰/۰۰	۳۶/۳۷	۴/۳	EF144125	کل نمونه ها

۸-۴-۲- فاکتور F_{st} ، R_{st} و جریان ژنی

بر اساس تست F_{st} نمونه های تمام مناطق نمونه برداری اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P \leq 0.01$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کورا است. بیشترین اختلاف ژنتیکی ($F_{st}=0.217$) بین نمونه های رودخانه گرگانرود و خشک‌رود و کمترین میزان اختلاف ژنتیکی ($F_{st}=0.086$) بین نمونه های رودخانه تنکابن و گرگانرود به دست آمد. همچنین میزان تمایز نمونه های بهاره و پاییزه تالاب انزلی نیز قابل توجه ($F_{st}=0.15$) می باشد.

جدول ۱۳-۲- میزان Fst محاسبه شده برای نواحی نمونه برداری (اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان میدهد)

کوردا	گرگانرود	تنکابن	خشکروود	تالاب انزلی بهاره	تالاب انزلی پاییزه	LD.I
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	تالاب انزلی پاییزه
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۱۵	تالاب انزلی بهاره
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۱۶۷	۰/۱۱۸	خشکروود
۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۱۸۴	۰/۱۰۱	۰/۱۶۲	تنکابن
۰/۰۱	۰	۰/۰۸۶	۰/۲۱۷	۰/۱۰۴	۰/۲۰۴	گرگانرود
۰	۰/۱۶۳	۰/۱۱۲	۰/۱۹۴	۰/۱۱۸	۰/۱۸۲	کوردا

بر اساس تست Rst نیز نمونه های تمام مناطق نمونه برداری اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P \leq 0/01$) که حاکی از وجود جمعیت های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کوردا است. بیشترین اختلاف ژنتیکی ($Rst = 0/271$) بین نمونه های بهاره تالاب انزلی و نمونه های تنکابن و کمترین میزان اختلاف ژنتیکی ($Rst = 0/026$) بین نمونه های رودخانه تنکابن و پاییزه تالاب انزلی به دست آمد. همچنین بین نمونه های بهاره و پاییزه تالاب انزلی نیز تفاوت وجود دارد.

جدول ۱۴-۲- میزان Rst محاسبه شده برای نواحی نمونه برداری (اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان میدهد)

کوردا	گرگانرود	تنکابن	خشکرد	تالاب انزلی بهاره	تالاب انزلی پاییزه	LD.I
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	تالاب انزلی پاییزه
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۰۶۴	تالاب انزلی بهاره
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۰۸۹	۰/۰۶۲	خشکرد
۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰/۲۱۴	۰/۲۷۱	۰/۰۲۶	تنکابن
۰/۰۱	۰	۰/۱۶۵	۰/۱۳۶	۰/۰۴۴	۰/۱۴۳	گرگانرود
۰	۰/۱۲	۰/۱۳۳	۰/۱۹۵	۰/۱۹	۰/۲۶۵	کوردا

تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۲ منطقه و ۶ ناحیه ، منطقه اول ناحیه رودخانه کوردا و منطقه دوم (نواحی تالاب انزلی (نمونه های بهاره و پاییزه)، خشکرد، تنکابن، گرگانرود) و بر اساس تست AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) در سطح احتمال ۰/۰۱ (P≤۰/۰۱) ، اختلاف بین نمونه های هر ناحیه (P≤۰/۰۱ و ۸۳٪) ، اختلاف بین مناطق نمونه برداری (P≤۰/۰۱ و ۱۴٪) ، اختلاف بین نواحی (P≤۰/۰۱ و ۳٪) محاسبه شد.

جدول ۱۵-۲- جدول آنالیز واریانس اختلاف بین مناطق نمونه برداری ، بین نواحی و بین افراد مختلف

احتمال	درصد اختلاف	
۰/۰۱	٪۳	اختلاف بین مناطق نمونه برداری
۰/۰۱	٪۱۴	اختلاف بین نواحی نمونه برداری
۰/۰۱	٪۸۳	اختلاف بین افراد مختلف در هر ناحیه نمونه برداری هر ایستگاه نمونه برداری

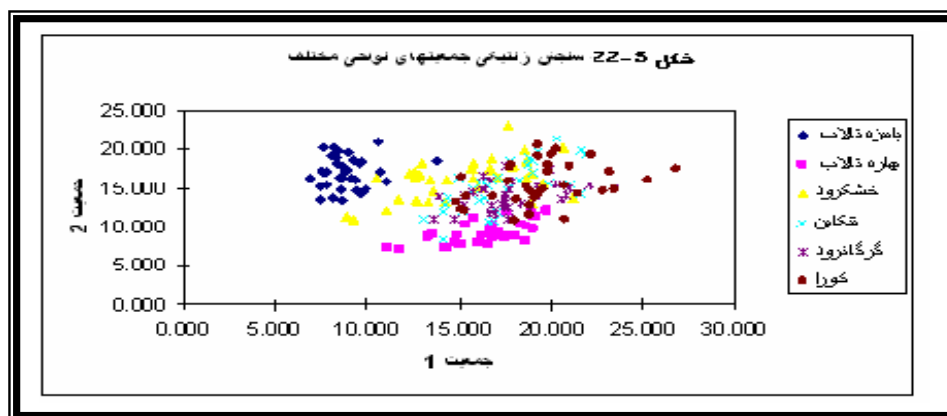
بر اساس محاسبه انجام شده تعداد ماهی سفید مهاجرین نواحی نمونه برداری ، حداقل مهاجرت (۱/۵) بین نواحی گرگانرود و خشکرد و حداکثر مهاجرت بین نواحی گرگانرود و تنکابن صورت گرفته است و متوسط میزان مهاجرت بین منطقه جنوبی خزر و رودخانه کوردا (Nm=۲/۶۹) و بین نواحی بخش خزر جنوبی (Nm=۲/۷۹) میباشد و این امر بیانگر اینست که تعداد ماهی مولد مهاجرت کننده در بخش جنوبی دریای خزر بیش از مهاجرت به رودخانه کورامی باشد.

جدول ۱۶-۲- تعداد ماهیان مهاجر بین نواحی مورد بررسی (بالای قطر)، میزان تمایز (Fst) بر اساس فراوانی اللی (زیر قطر)

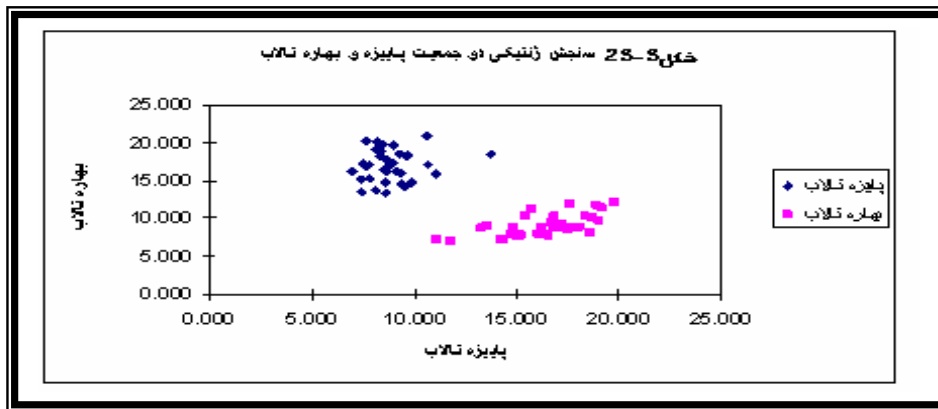
کوردا	گرگانرود	تنکابن	خشکرو د	انزلی بهاره	انزلی پاییزه	LD.I
۲/۰۷	۱/۶	۲/۳۹	۳/۶۲	۲/۵۸	۰	تالاب انزلی پاییزه
۳/۴۴	۳/۵۶	۴/۱۱	۲/۲۶	۰	۰/۰۸۸	تالاب انزلی بهاره
۱/۹۹	۱/۵	۲/۰۷	۰	۰/۱	۰/۰۶۵	خشکرو
۳/۶	۴/۳	۰	۰/۱۰۷	۰/۰۵۷	۰/۰۹۴	تنکابن
۲/۲۷	۰	۰/۰۵۶	۰/۱۴۴	۰/۰۶۶	۰/۱۳۲	گرگانرود
۰	۰/۰۹۹	۰/۰۶۵	۰/۱۱۱	۰/۰۶۸	۰/۱۰۷	کوردا

۹-۴-۲- نمودارهای سنجش جفت جمعیتها

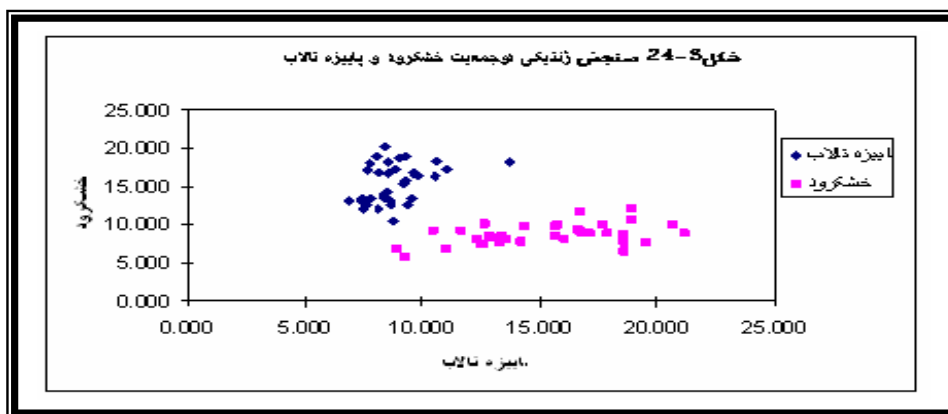
نمودارهای سنجش ژنتیکی جمعیتها بصورت جفت آورده شده است. این نقشهها نمایشی از درجه تفکیک ژنتیکی جمعیتها را میسازند و روش مناسبی برای اندازه گیری اختلاف میان جمعیتها به کمک نمودار و بر اساس تستهای سنجش میباشند و اعداد نمایش داده شده روی محور بر حسب درجه تمایز است.



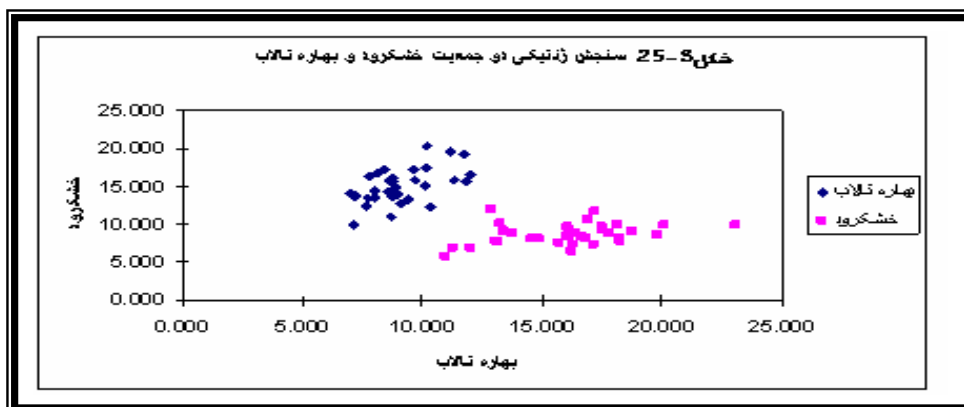
شکل ۱۱-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی تمام جمعیتهای نواحی مختلف



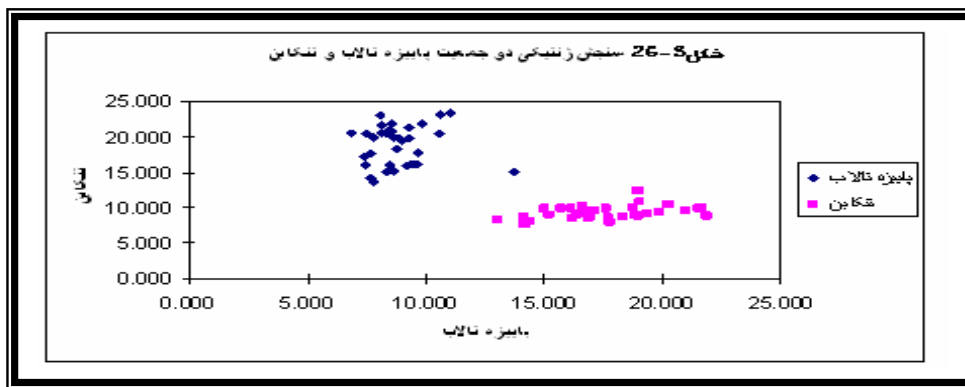
شکل ۲-۱۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت پاییزه و بهاره تالاب



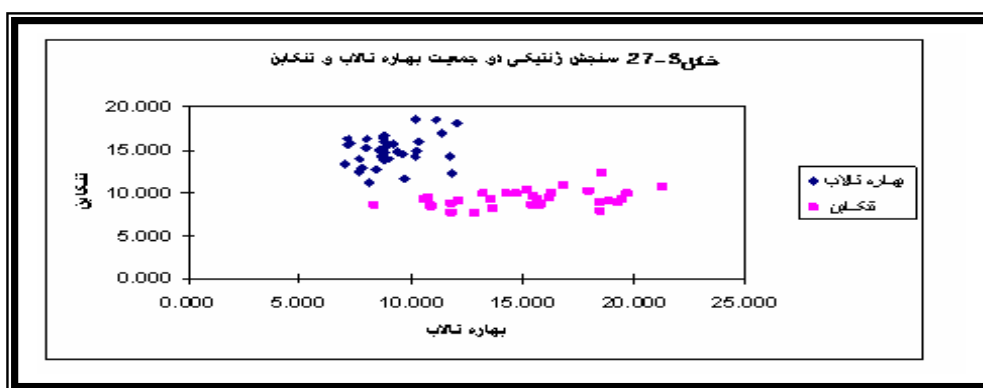
شکل ۲-۱۳- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت پاییزه تالاب و خشکروید



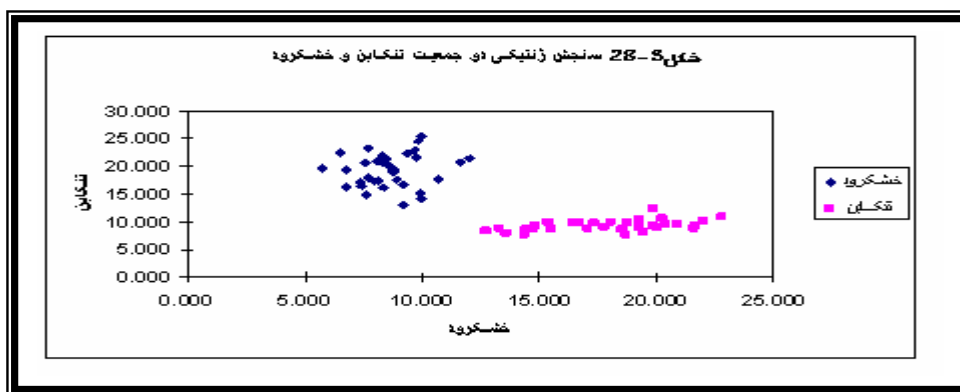
شکل ۲-۱۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت بهاره تالاب و خشکروید



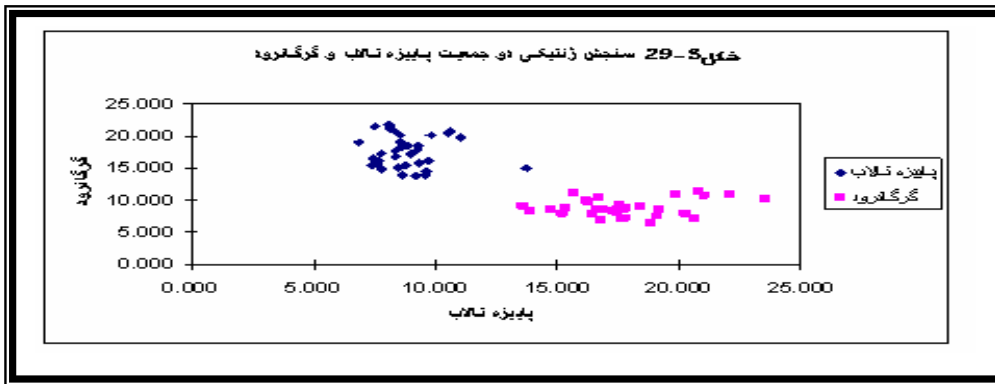
شکل ۱۵-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت پاییزه تالاب و تنکابن



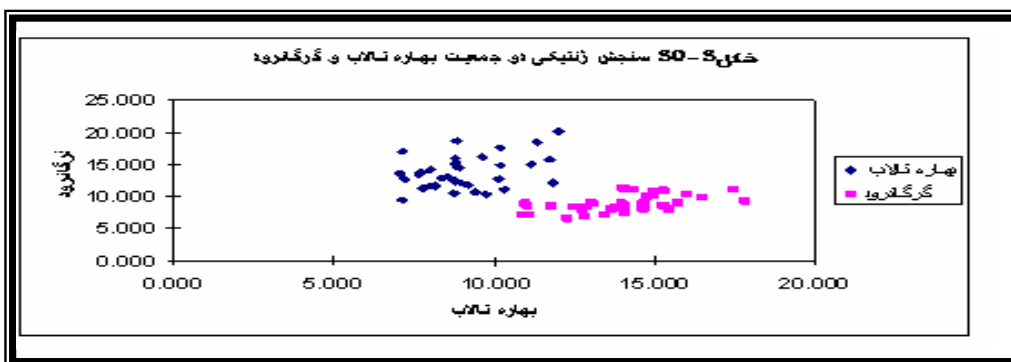
شکل ۱۶-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت بهاره تالاب و تنکابن



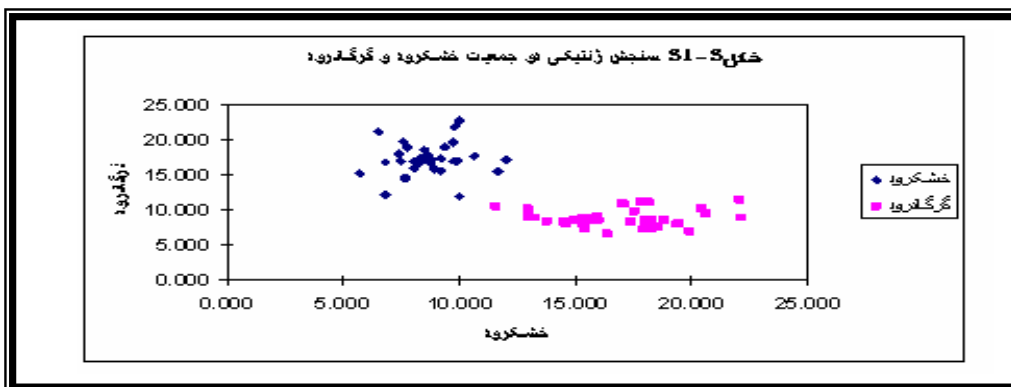
شکل ۱۷-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت تنکابن و خشکرو



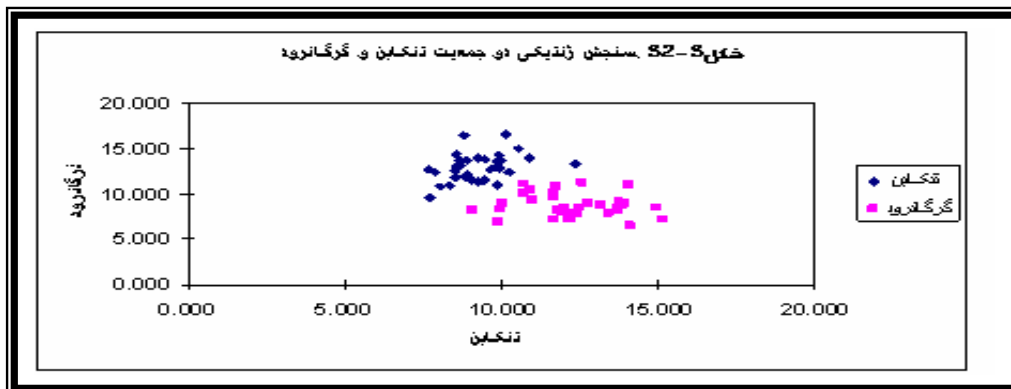
شکل ۱۸-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت پاییزه تالاب و گرگانرود



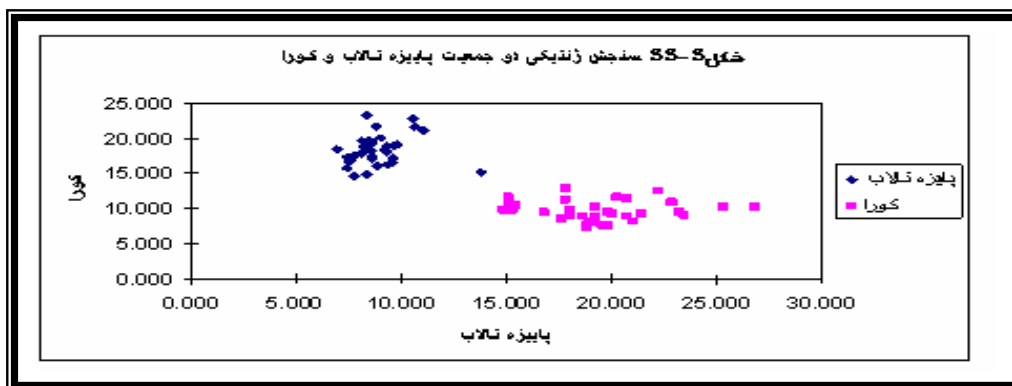
شکل ۱۹-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت بهاره تالاب و گرگانرود



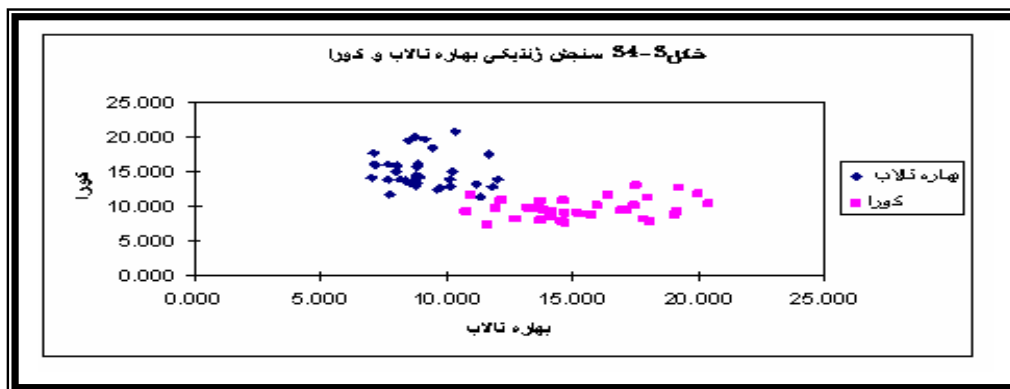
شکل ۲۰-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت خشکروود و گرگانرود



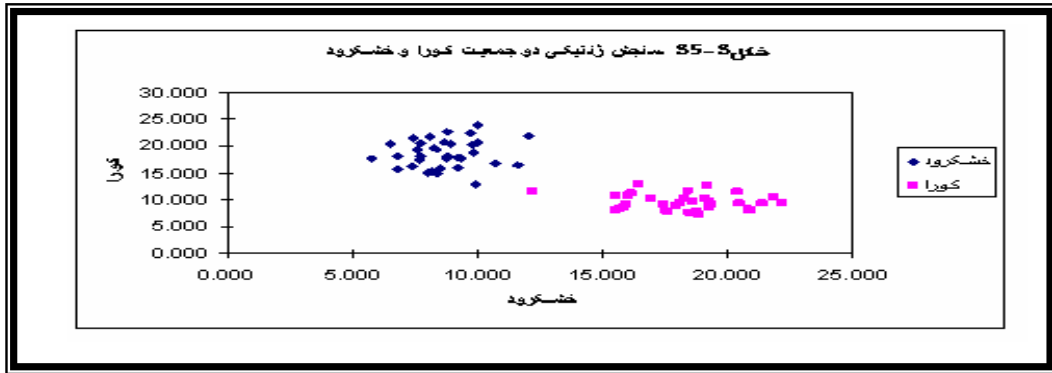
شکل ۲۱-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت تنکابن و گرگانرود



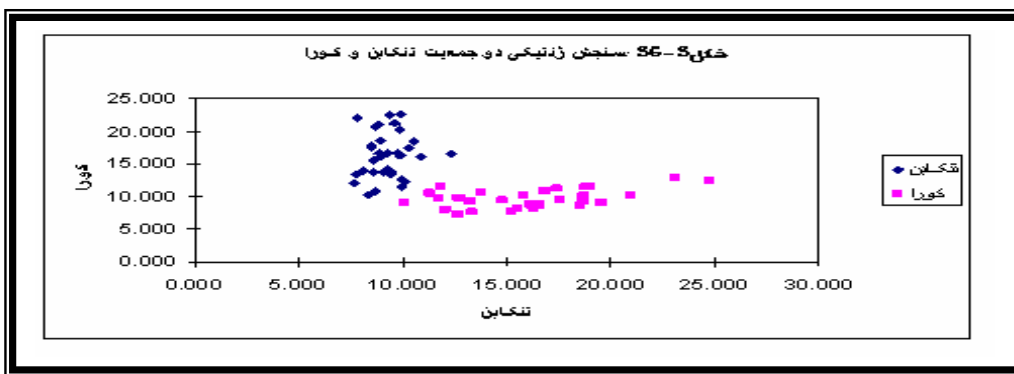
شکل ۲۲-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت پاییزه تالاب و کورا



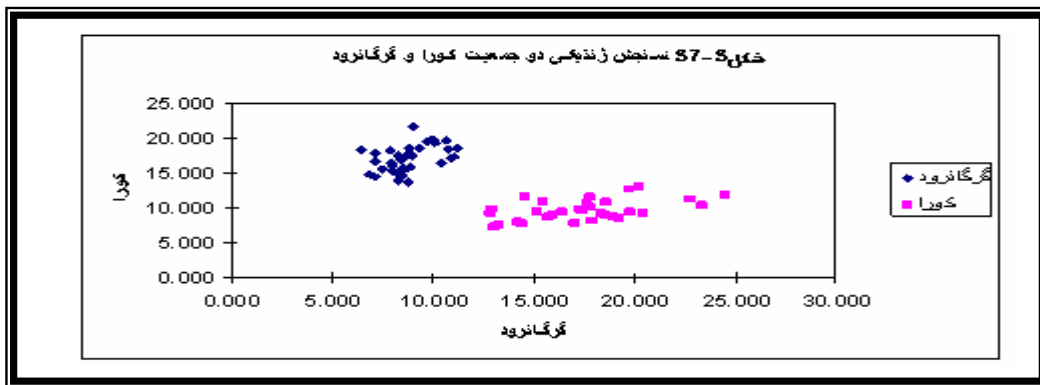
شکل ۲۳-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت بهاره تالاب و کورا



شکل ۲۴-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت کورا و خشک‌رود



شکل ۲۵-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت تتکابن و کورا



شکل ۲۶-۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت کورا و گرگانرود

۱۰-۴-۲- شباهت و فواصل ژنتیکی

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei(1972) بوسیله نرم افزار GeneAlex محاسبه شده و در جداول ۱۷-۲ آمده است. همانطوریکه ملاحظه می شود بر اساس معیار Nei(1972) بیشترین

فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود با نمونه های پاییزه تالاب و خشکروود (۰/۶۴۶) و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود و تنکابن (۰/۲۳۷) وجود دارد. بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود و تنکابن (۰/۷۸۹) و کمترین شباهت میان نمونه های گرگانرود با نمونه های پاییزه تالاب و خشکروود (۰/۵۲۴) وجود دارد.

جدول ۱۷-۲- ماتریس فواصل ژنتیکی (زیر قطر) و شباهت ژنتیکی (بالای قطر) (Nei, 1972)

کوردا	گرگانرود	تنکابن	خشکروود	بهاره تالاب	پاییزه تالاب	LD.I
۰/۵۵	۰/۵۲۴	۰/۵۸۹	۰/۷۵۶	۰/۶۴۳	۰	پاییزه تالاب
۰/۷۱	۰/۷۶۱	۰/۷۳۷	۰/۶۳۱	۰	۰/۴۴۲	بهاره تالاب
۰/۵۶	۰/۵۲۴	۰/۵۶۲	۰	۰/۴۶۱	۰/۲۸۵	خشکروود
۰/۷۰	۰/۷۸۹	۰	۰/۵۷۷	۰/۳۰۵	۰/۵۲۹	تنکابن
۰/۶۱	۰	۰/۲۳۷	۰/۶۴۶	۰/۲۷۳	۰/۶۴۶	گرگانرود
۰	۰/۴۸۳	۰/۳۴۸	۰/۵۸۸	۰/۳۳۹	۰/۵۸۶	کوردا

۵-۲- بحث

گوناگونی ژنتیکی بعنوان صفات ماندگار یک گونه با مرگ جاندار ناپدید نمی‌شود بلکه به نسل‌های بعد منتقل می‌گردد و بعنوان عوامل پایدار و اسناد محکمی در مطالعات رده بندی محسوب می‌شوند. دانستن ساختار ژنتیکی آبریان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌نماید. یکی از راههای بررسی ساختار ژنتیکی آبریان، استفاده از ژنتیک جمعیت‌ها بوده و شناسایی تحولات درون گونه ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می‌باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبریان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه ای، سیستماتیک و طبقه بندی آنها می‌باشد (Rezvani Gilkolaei, 1997)

۱-۵-۲- وضعیت آلی و آلل‌های اختصاصی

در این مطالعه طبق جدول ۴-۲، ۹ جفت آغازگر ریز ماهواره بررسی شده در ماهی سفید پلی مورف گزارش شدند که جزئیات محاسباتی آن آورده شده است. در هنگام شمارش الگوی بانندی تمامی جایگاه‌ها یک یا دو باند را نشان دادند که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است یا به عبارتی انحصاری و اختصاصی بودن آغازگرها موجب شد که در هر فرد تنها یک یا دو باند (در فرد هتروزیگوت دو باند و در فرد هموزیگوت یک باند) بدست آید.

در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه های تالاب انزلی و کورا با میانگین ۵/۷۷ آلل و کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه های منطقه تنکابن با میانگین ۵/۲۲ آلل می‌باشد همچنین بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه های منطقه تالاب انزلی (پائیزه) با میانگین ۴/۲ آلل و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه های منطقه خشک‌رود با میانگین ۳/۰۸ آلل می‌باشد، که علت این پدیده احتمالاً به خاطر جریان ژنی بالا، برون زادآوری، عدم تخریب زیستگاه های طبیعی منطقه تالاب انزلی و کورا نسبت به تنکابن و خشک‌رود می‌باشد که با گذشت زمان موجب افزایش آلل و افزایش تنوع ژنتیکی در ذخایر این مناطق گردیده است و نیز به این دلیل که مهاجرت مولدین ماهی سفید به رودخانه تنکابن در مقایسه با سایر رودخانه ها بالا می‌باشد و تخم استحصالی و لارو تولیدی آن در سایر رودخانه ها رهاسازی می‌شود در

صورتیکه تخم و لارو بدست آمده از مولدین ماهی سفید سایر رودخانه ها در رودخانه تنکابن رهاسازی نمی شود لذا سایر رودخانه ها شانس بیشتری برای برخورداری از تنوع ژنتیکی نسبت به رودخانه تنکابن دارند. میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل اطلاق می شود؛ هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و در نتیجه تنوع ژنتیکی بالاتر ولی تمایز ژنتیکی میان مناطق مزبور کمتر است.

در مقایسه جایگاه های ۹ گانه مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۳ آلل در جایگاه ژنی AY318779 و کمترین تعداد آلل مشاهده شده ۲ آلل در جایگاه ژنی AY318780 می باشد همچنین بیشترین تعداد آلل موثر ۸/۸۸ آلل در جایگاه ژنی AY318779 و کمترین تعداد آلل موثر ۱/۳۵ آلل در جایگاه ژنی AF277576 می باشد. جایگاه ژنی AY318779 تعداد آلل بالاتری نشان داد که علت این پدیده احتمالاً به خاطر جهش پذیری بالای این جایگاه ژنی و یا وجود آلل های نول می باشد که به اشتباه رتبه دهی شده اند.

در میان مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاه های ۹ گانه میانگین تعداد آللی مشاهده شده ۵/۰۷ و میانگین تعداد آللی موثر ۳/۳۸ می باشد که قابل قیاس با نتایج دیگران می باشد (جدول ۴-۴)

بر اساس داده های فراوانی آللی جایگاه های مختلف ریز ماهواره ای پلی مورفیک مجموعاً ۹ آلل اختصاصی مشاهده گردید که حداکثر آن در نمونه های تالاب انزلی با ۴ آلل و حداقل آن در نمونه های منطقه خشک رود با ۱ آلل دیده می شود. علت احتمالی این پدیده بسته بودن دریای خزر و میزان جریان ژنی پایین و فرصت کافی برای ظهور آلل های اختصاصی می باشد. فراوانترین آلل اختصاصی منحصر به فرد در جایگاه ژنی AY318778 در جمعیت نمونه های کورا مربوط به ال ۱۰ و کمترین فراوانی آلل اختصاصی منحصر به فرد در همین جایگاه مربوط به آلل ۹ می باشد.

آلل های اختصاصی مشاهده شده به دلیل فراوانی پایین قابل ملاحظه نیستند و نمی توان آنها را کاملاً اختصاصی فرض نمود و از آنها برای تشخیص مطمئن این جمعیت ها استفاده کرد. معمولاً در مطالعات ساختار جمعیتی بدلیل کوچک بودن اندازه نمونه و چند شکلی فراوان ریز ماهواره ها نبایستی بدنبال آلل های اختصاصی گشت. تعداد زیاد آلل های اختصاصی در تالاب انزلی به آن معنی است که جمعیت به سرعت توسعه یافته و آلل های جدید در میان جهش های جدید برخاسته اند. تعداد آلل اختصاصی کمتر در نمونه های خشک رود

احتمالاً نشانه کاهش جمعیت این گونه در اثر تنگناهای شدید جمعیتی، تخریب زیستگاه ها، تکثیر مصنوعی و تعداد کم جمعیت اولیه موثر می باشد.

وجود آلل های اختصاصی که بر اساس جهش و پس از مهاجرت به مکان های جدید ایجاد شده اند نشانه وضعیت مناسب اکولوژیکی در هر یک از زیستگاه های جدید (در آن زمان) بوده است و نشان دهنده وجود گونه های بومی منطقه است (Kalinowski, 2005).

در بررسی حاضر دامنه تعداد آللی مشاهده شده در جایگاه های ژنی ۱۲-۲ محاسبه گردید در حالی که Anger و همکاران در سال ۱۹۹۵ در مطالعه جایگاه های ژنی ریز ماهواره ای *Salvelinus fontinalis* در پارک ملی Manricie کانادا به طور متوسط ۱۱ آلل؛ Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه ریز ماهواره ای جمعیت های Merlangius در مناطق شمال شرقی آمریکا با استفاده از روش ریز ماهواره، متوسط تعداد آلل در جایگاه های ژنی مورد مطالعه را ۱۹/۶۲؛ Beacham, Dempson در سال ۱۹۹۷ در بررسی ریز ماهواره ای ساختار جمعیت *salmo salar* تعداد آلل را ۶؛ shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ در بررسی ریز ماهواره ای شگک ماهی اطلس *Clupea harengus* تعداد آلل در جایگاه های ژنی را ۴۱-۱۸؛ Avise, Dewoody در سال ۲۰۰۰ متوسط تعداد آلل را در ماهیان دریایی ۲۰/۶، در ماهیان آب شیرین ۷/۵ و در ماهیان آنا دراموس ۱۱/۳؛ بارتفی و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آنالیز ژنتیکی دوگله مولد *Cyprinus carpio* در مجارستان، با استفاده از روش ریز ماهواره متوسط آلل را ۴ و Heckel و همکاران در سال ۲۰۰۲ تنوع ژنتیکی را در دو جمعیت آنادراموس و آب شیرین *Gasterosteus aculeatus* با استفاده از روش ریز ماهواره بررسی کردند و تعداد ۶-۲ آلل در جایگاه های ژنی مورد مطالعه را در جمعیت آب شیرین و تعداد ۱۴-۵ آلل را در جمعیت آنا دراموس مشاهده کردند.

Wirgin و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی تنوع ژنتیکی *Asipenser oxyrinchus* (تاسماهی آتلانتیک) با استفاده از روش ریز ماهواره تعداد آلل در جایگاه های ژنی مورد مطالعه را ۷-۴؛ Aurelle و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ژنتیکی *Coris julis* دامنه آللی در لوکوس ها را بین ۴۲-۳ آلل؛ salguerio و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی ساختار ژنتیکی *Anaocypris hispanica* در پرتغال دامنه آللی در جایگاه های ژنی را ۳۸-۱ با میانگین ۱۴/۴ و دامنه آللی در جمعیت ها را ۱۳-۸؛ Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی جمعیت های *Acipenser sinensis* تعداد الل در هر جایگاه ژنی را ۱۵-۴ آلل با میانگین ۷ آلل؛ Cui و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه

Takifugu rubripes در سواحل چین میانگین آلی در هر جایگاه ژنی را ۱۱/۷ و دامنه آلی را ۲۵-۵ و charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* در سواحل اروپا تنوع آلی را ۱۳-۱۱/۶۷ بدست آوردند.

Islam, Alam در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی جمعیت های وحشی و پرورشی رودخانه ای *Catla catla* با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریز ماهواره میانگین تعداد آلل مشاهده شده در داخل و بین جمعیت های هجری را پایین تر از جمعیت های رودخانه اعلام کردند؛ به نظر آنها کاهش در اختلاف آلی جمعیت های پرورشی ممکن است به علت اثر موسس (بنیانگذار) و رانش ژنتیکی باشد زیرا ممکن است جمعیت موسس با تعداد کمی از مولدین بنا شود؛ افزایش تنگناهای ژنتیکی و آمیزش های خویشاوندی در ذخایر هجری با گذشت زمان سبب کاهش آلی می گردد.

Skoala و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) پرورش و وحشی با استفاده از دوازده نشانگر ریز ماهواره با دقت بالایی توانستند نمونه های وحشی را از نمونه های پرورشی تشخیص دهند و میانگین آلی در تمامی نژادهای پرورشی را بطور قابل ملاحظه ای پایین تر از جمعیت های وحشی بدست آوردند که می تواند ناشی از تعداد کم مولدین موسس یا رانشی ژنتیکی در افزایش تولید نسل در برنامه های تولید مثلی باشد. به از دست رفتن واریانس ژنتیکی یا هنگامی که یک جمعیت با تعداد کمی مولد بنیان گذاشته شود اثر موسس، (بنیانگذار) گویند. (امینی، ۱۳۷۴)

کیوان شکوه و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه جمعیت کلمه *Rutilus rutilus* تعداد آلل را ۷/۵؛ قاسمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه جمعیت های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) متوسط تعداد آلل را در جمعیت های ایرانی ۳/۹ و در جمعیت آذری ۷/۴؛ kitanishi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه ساختار جمعیتی *oncorhynchus masou* با استفاده از روش ریز ماهواره تعداد آلل را ۶/۲۳؛ Menezes و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه تنوع ژنتیکی *katsuwonus* با استفاده از روش ریز ماهواره تعداد آلل را ۷-۳۰، صفری در سال ۱۳۸۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی شیب دریای خزر *Acipenser nudiventris* با استفاده از روش ریز ماهواره تعداد آللهای مشاهده شده و موثر را به ترتیب ۱۹، ۱۱/۵۶ ریحانی در سال ۱۳۸۷ در مطالعه جمعیتی ماهی کلمه انزلی و خلیج گرگان متوسط تعداد آلل موثر را ۴/۸ بدست آوردند.

سالاری در سال ۱۳۸۷ در مطالعه جمعیتی ماهی سوکلا متوسط تعداد آلل موثر را ۱۲/۳۷ تخمین زده و علت کاهش الل را تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس های زیست محیطی، تخریب زیستگاه های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش های خویشاوندی نسبت داد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می شود. در جدول ۵-۴ میانگین تنوع آلی بدست آمده در بررسی حاضر با نتایج حاصل از سایر گونه های ماهیان دیگر جهت مقایسه و تایید صحت نتایج آورده شده است.

سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه نسبت به گونه دیگر و در جمعیت های مختلف یک گونه که در هر منطقه می باشد متفاوت است ولی بطور متوسط تعداد آلل در هر جایگاه ژنی در ماهیان آب شور (۲۰/۶) بیشتر از ماهیان آب شیرین (۷/۵) و در ماهیان آنا دراموس (۱۱/۳) بینابین آب شور و شیرین است (Dewoody and Avise, 2000).

در بررسی حاضر میانگین تعداد آلی مشاهده شده ۵/۵۸ و تعداد آلل موثر برای کل مناطق ۴/۴۹ بدست آمد که پایین بودن میانگین حاضر میانگین تعداد آلی مشاهده شده از متوسط تعداد آلل در هر جایگاه ژنی در ماهیان آنا دراموس در مطالعه Avise, Dewoody احتمالاً بدلیل استفاده از تعداد کم مولدین جهت تکثیر مصنوعی در کارگاه ها، محدودیت مهاجرتها (جریان ژنی) و در نتیجه آمیزش های خویشاوندی و آللهای نول نسبت داد که موجب محدود شدن جریان ژنی بین آنها و کاهش تنوع آلی می شود.

جدول ۱۸-۲- تعداد اللهای مشاهده شده در گونه های مختلف

رفرنس	متوسط آلل در هر لوکوس	گونه
Shaw <i>et al.</i> , 1999	۱۸-۴۱	<i>Clupea harengus</i>
Dewoody & Advise <i>et al.</i> , 2000	۷/۵	ماهیان آب شیرین
	۲۰/۶	ماهیان آب شور
	۱۱/۳	ماهیان آنادراموس
Salgueiro <i>et al.</i> , 2003	۱۴/۴	<i>Anaocypris hispanica</i>
Beacham <i>et al.</i> , 2004	۱۲/۷	<i>Oncorhynchus nerka</i>
Watts <i>et al.</i> , 2004	۵/۵	<i>Pleuronectes platessa</i>
Agular <i>et al.</i> , 2005	۶	<i>Esox lucius</i>
Pruett <i>et al.</i> , 2005	۲-۱۵	<i>Rachycentron canadum</i>
Dahle <i>et al.</i> , 2006	۴-۳۳	<i>Gadus morhua</i>
Ghasemi <i>et al.</i> , 2007	۳/۸-۷/۴	<i>Abramis brama</i>
Kitanishi <i>et al.</i> , 2008	۶-۲۳	<i>Oncorhynchus masou</i>
Menezes <i>et al.</i> , 2008	۷-۳۰	<i>Katsuwonus pelamis</i>
صفری، ۱۳۸۵	۱۱/۵۶	<i>A. nudiventris</i>
خوش خلق، ۱۳۸۵	۱۴	<i>A. gueldenstatii</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	۴/۸	<i>Rutilus rutilus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	۱۲/۳۷	<i>Rachycentron canadum</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	۲-۱۳	<i>Rutilus frissi kutum</i>

۲-۵-۲- هتروزیگوسیتی

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد (Beardmore *et al.*, 1997). ریز ماهواره ها شاخص حساسی در اندازه گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری های

همخون هستند بنابراین برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت ها مناسب می باشند (Alarcon *et al.*, 2004).

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه های ۹ گانه بین ۱- ۰/۰۸۶ با میانگین ۰/۵۲ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی AF277573 در نمونه های

بهاره تالاب انزلی و کمترین مقدار در جایگاه های ژنی EF277574 , EF144125 در نمونه های جمع آوری شده از منطقه کورا می باشد.

دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا تنوع ژنتیکی (He) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه های ۹ گانه بین ۰/۸۷ - ۰/۱۰۹ با میانگین ۰/۴۹ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه های AY318779 و در نمونه های جمع آوری شده از منطقه کورا می باشد. کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه های AF277576 در نمونه های خشکروید می باشد.

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جایگاه ها برای کلیه مناطق نمونه برداری ۰/۷۷ مربوط به جایگاه ژنی AF277573 و کمترین مقدار آن ۰/۳۴ مربوط به جایگاه ژنی AY318777 می باشد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در سطح جایگاه ژنی ۰/۸۴ مربوط به جایگاه ژنی AY318779 و کمترین مقدار آن ۰/۵۱ مربوط به جایگاه ژنی AY318780 می باشد. مقادیر He, Ho در سطح جایگاه ژنی بیانگر آن است که سطح تغییر پذیری هر جایگاه ژنی متفاوت از یکدیگر می باشد.

در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس ها به غیر از AY318778 , AF277573 ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود (جدول ۱۹-۲) کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی و از دست دادن تنوع ژنتیکی در نمونه ها است؛ علت آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس های زیست محیطی، تخریب زیستگاه های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیطی طبیعی، محدودیت مهاجرت ها (جریان ژنی) و آمیزش های خویشاوندی می باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و افت هتروزیگوسیتی در ذخایر گردیده است.

جایگاه های ژنی AY318778 , AF277573 هتروزیگوسیتی بالاتری نشان داد و این امر بوسیله سایر لوکوس ها تایید نشد که بیانگر آن است که سطح تغییر پذیری (میزان جهش پذیری) این جایگاه ژنی متفاوت از بقیه می باشد و یا احتمالاً به خاطر عدم جدا سازی مناسب باندها در هنگامیکه تفاوت فقط به اندازه یک جفت باز بوده رخ داده است و یا به خاطر وجود آلل های نول می باشد که به اشتباه رتبه دهی شده اند. لازم به ذکر است که آلل های نول اغلب در آغازگرهای غیر اختصاصی دیده می شود.

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه های ناحیه تالاب انزلی دیده شد که نشانه بالا بودن تنوع و مناسب بودن ساختار جمعیت در این ناحیه نسبت به جمعیت های سایر نواحی نمونه برداری است. می توان علت آنرا به فرصت بیشتر برای تکثیر طبیعی، عدم تخریب زیستگاه های طبیعی، بالا بودن میزان جریان ژنی (N_m) برون زاد آوری و ... تفسیر نمود. لازم به ذکر است که هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بیشتر باشد تنوع ژنتیکی بیشتر ولی اختلاف ژنتیکی میان مناطق مورد نظر کمتر خواهد بود.

کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۳۴) در نمونه های مناطق کورا دیده شد که علت آن عدم بهره برداری بهینه از منابع شیلاتی و احتمالاً پایین بودن میزان جریان ژنی (N_m) و تخریب زیستگاه های طبیعی ناشی از توسعه تاسیسات و صنایع حاشیه این رودخانه می باشد. این در حالی است که Anger و همکاران در سال ۱۹۹۵ در مطالعه لوکوسهای ریز ماهواره ای *Salvelinus fontinalis* در پارک ملی manricie کانادا هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۷۱؛ RiCo و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه ریز ماهواره ای جمعیت های *Merlangius merlangus* در مناطق شمال شرقی امریکا با استفاده از روش ریز ماهواره، سطح هتروزیگوسیتی را ۰/۲۴-۰/۶۸؛ Dempson, Beachman در سال ۱۹۹۷ در بررسی ریز ماهواره ای ساختار جمعیتی *Salmo salar* میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۶۹؛ shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ در بررسی ریز ماهواره ای شگک ماهی اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) سطح هتروزیگوسیتی را حدود ۰/۹-۰/۹۳؛ o'Reilly و همکاران در سال ۲۰۰۰ در بررسی ریز ماهواره ای ساختار جمعیتی *Dissostichus eleginoides* سطح بالایی از هتروزیگوسیتی (۰/۵۸-۱)؛ Advise, Dewoody در سال ۲۰۰۰ تنوع ژنتیکی را در ماهیان دریایی ۵/۷۹، در ماهیان آب شیرینی ۰/۴۶ و در ماهیان آنادراموس رقمی بینابین ماهیان دریایی و آب شیرین با تنوع ۰/۶۸؛ Appleyard و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی ریز ماهواره ای تن ماهی چشم درشت (*thunnus obesus*) سواحل اقیانوس هند با استفاده از روش ریز ماهواره، هتروزیگوسیتی را ۰/۵۲-۰/۹۲؛ Adams, Hutchiu در سال ۲۰۰۲ در بررسی ریز ماهواره ای ساختار *Salvelinus fontinalis* در دریاچه های حوضه آبریز Indian Bay با استفاده از روش ریز ماهواره سطح بالایی از هتروزیگوسیتی (۰/۲۷-۰/۶) را نشان می دهد که این رقم نسبت به دامنه گزارشات دیگر همین گونه (۰/۸۹۲-۰/۶۲) بسیار بالاست.

Bartfi و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آنالیز ژنتیکی دو گله مولد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مجارستان، با استفاده از روش ریز ماهواره میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۲۶؛ Heckel و همکاران در سال ۲۰۰۲ تنوع ژنتیکی را در دو جمعیت آنادراموس و آب شیرینی *Gasterosteus aculeatus* با استفاده از روش ریز ماهواره بررسی کردند و تنوع ژنی را در جمعیت آب شیرین ۰/۷۶-۰/۵۲ و در جمعیت آنادراموس ۰/۹۲-۰/۴۶ مشاهده نمودند. Wirgin و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی تنوع ژنتیکی *Asipenser oxyrinchus* (تاسماهی آتلانتیک) با استفاده از روش ریز ماهواره هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۶۴-۰/۴۴؛ Aurelle و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ژنتیکی *Coris julis* در مدیترانه، دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار را بین ۰/۵۳ تا ۰/۵۸؛ Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ارزیابی تنوع ژنتیکی *Acipenser sinensis* با استفاده از روش ریز ماهواره، هتروزیگوسیتی را ۰/۵۴ اعلام نمودند و علت کمبود هتروزیگوسیتی را اندازه کوچک جمعیت ندانستند زیرا نمونه ها مربوط به ماهیانی هستند که قبل از ساخته شدن سد بر روی رودخانه یانگ تسه هنگامی که به جمعیت به اندازه کافی بزرگ بود متولد شده بودند و هموزایگوسیتی بالا را به وجود آلهای صفر، تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) و تقسیمات جمعیتی نسبت دادند.

Watts و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی ژنتیکی *Pleuronectes platessa* در میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را به ترتیب ۰/۳۸۲ و ۰/۳۹۴؛ Jug و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه *Salmo marmoratus* در دریاچه آدریاتیک دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار را ۰/۰۶ الی ۰/۷۲ و دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۱۲ الی ۰/۶۵ محاسبه نمودند. Cui و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی تنوع ژنتیکی *T.pseudommus*، *T.tubripes* در سواحل چین با استفاده از ۹ جایگاه ژنی ریز ماهواره دامنه شاخص تنوع ژنتیکی را ۰/۶۴۶ تا ۰/۹۴۷ بدست آوردند، شاخص تنوع ژنتیکی نشان می دهد که کاهش معنی داری بین جمعیت های پرورشی در مقایسه با جمعیت های وحشی دیده می شود؛ دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر در مورد کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت های پرورشی، ذکر شده است. کاهش تنوع ژنتیکی در ذخایر پرورشی بر روی ذخایر وحشی نیز می تواند فشار وارد نماید و آمادگی آنها را برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی افزایش داده و در نتیجه در آینده کاهش در اندازه جمعیت دیده می شود.

Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا ۲۰ آغازگر ریز ماهواره را در ماهی سوکلای خلیج مکزیک واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند. Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ژنتیکی *Pollachius pollachius* در سواحل فرانسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۶۷۸ الی ۰/۷۴۱؛ Lecentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه پلی مورفیسم ریز ماهواره در اردک ماهی (*Esox lucius*) شمال ایتالیا و شرق اروپا دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۳۸ الی ۰/۷۶؛ کیوان شکوه و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه جمعیت کلمه (*Rutilus rutilus*) میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۶؛ قاسمی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه جمعیت های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) میزان هتروزیگوسیتی را در جمعیت های ایرانی ۰/۳۵ و در جمعیت آذری ۰/۷ گزارش کرده و پایین بودن هتروزیگوسیتی در جمعیت های ایرانی را به استفاده از تعداد والدین کم در تکثیر مصنوعی و وجود آللهای نول نسبت دادند. kitanishi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* با استفاده از روش ریز ماهواره میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۷۳-۰/۶۶ برآورد نمودند.

menezes و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه تنوع ژنتیکی *Katsuwonus pelamis* با استفاده از روش ریز ماهواره میزان هتروزیگوسیتی را ۱-۰/۵۳؛ صفری در سال ۱۳۸۵ تنوع ژنتیکی ماهی شیب دریای خزر (*Acipenser nudiventris*) را با استفاده از روش ریز ماهواره ۰/۸۵ با دامنه ۱-۰/۳۷؛ خوش خلق در سال ۱۳۸۵ دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تاسماهی ایرانی را ۰/۸۶-۰/۴ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۳-۰/۸۳ و در تاسماهی روسی ۰/۷۹-۰/۹؛ نوروزی در سال ۱۳۸۶ دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ازون برون را ۱-۰/۲۳۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۵۷-۰/۵۴۳؛ ریحانی در سال ۱۳۸۷ در مطالعه جمعیتی ماهی کلمه انزلی و خلیج گرگان میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۷؛ سالاری در سال ۱۳۸۷ در مطالعه جمعیتی ماهی سوکلا میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۶۵۵ تخمین زد و علت پایین بودن هتروزیگوسیتی را به تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس های زیست محیطی، تخریب زیستگاه های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش های خویشاوندی نسبت داد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می شود و همچنین وجود آللهای نول را موثر دانست.

در این مطالعه میزان متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۴۹ به دست آمد که علت پایین بودن میزان هتروزیگوسیتی نسبت به مطالعه Advise , Dewoody در سال ۲۰۰۰ احتمالاً به دلیل استفاده از تعداد کم مولدین جهت تکثیر مصنوعی در کارگاه ها، آمیزش خویشاوندی و اللهای نول مرتبط می باشد. در مقایسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه های پاییزه و بهاره در تالاب انزلی، هتروزیگوسیتی بالاتری در نمونه های پاییزه (۰/۶۰۶) نسبت به بهاره (۰/۵۷۱) مشاهده گردید که باید مد نظر کارشناسان تکثیر و بازسازی ذخایر قرار گیرد. تاکنون کارشناسان بخشهای مربوطه فقط به نژاد بهاره این گونه توجه و در جهت احیای آن تلاش می نمودند. در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار حدود ۳ میلیون بچه ماهی نژاد پاییزه با وزن ۳-۴ گرم توسط پژوهشکده آبهای داخلی در انزلی تولید و وارد تالاب گردید. با توجه به اینکه نژاد پاییزه این ماهی کمتر دچار دستکاری شده، به نظر می رسد که استفاده از این مولدین پاییزه در کاهش بیشتر تنوع این گونه و پی آمدهای آن موثر می باشد. تنوع آلی با حساسیت بیشتری نسبت به هتروزیگوسیتی می تواند اختلاف ژنتیکی را اندازه گیری کند زیرا تنگنای ژنتیکی همانند وقایعی که موجب کاهش تعداد آلل می شود (بویره نمونه های کمیاب) بدون داشتن اثر قابل مشاهده روی هتروزیگوسیتی هنگامی که اندازه نمونه ها مشابه هستند، دیده می شود. ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف آبزیان ممکن است به طور قابل ملاحظه ای بین گونه ها بسته به اهمیت نسبی رانش، جریان ژنی، انتخاب، مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلند مدت همچون تجمع افراد و جمعیت ها بعد از یخبندان تغییر کند. در میان ماهیان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین تری را نسبت به ماهیان آب شیرینی نشان می دهند در حالیکه ماهیان آب شیرین تنوع ژنتیکی پایین و تمایز ژنتیکی بالاتری را نسبت به ماهیان دریایی نشان می دهند و این تمایز به اندازه بزرگ جمعیت موثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیط های دریایی و اندازه کوچک جمعیت موثر و جریان ژنی محدود در جمعیت های آب شیرین نسبت داده می شود (Norris et al., 1999).

جدول ۱۹-۲ - هتروزایگوسیتی مشاهده شده در گونه های مختلف

رفرنس	Ho	He	گونه
Greg <i>et al.</i> , 1999	۰/۸۱	۰/۸۴	<i>Illex argentinus</i>
Shaw <i>et al.</i> , 1999	۰/۹	۰/۹۳	<i>Clupea harengus</i>
Dewoody & Advise <i>et al.</i> , 2000	۰/۴۶	-	ماهیان آب شیرین
	۰/۷۹	-	ماهیان آب شور
	۰/۶۸	-	ماهیان آنادراموس
William <i>et al.</i> , 2001	۰/۸۳	۰/۸۷	<i>Gadus morhua</i>
Beacham <i>et al.</i> , 2004	۰/۷۲	۰/۷۱	<i>Oncorhynchus nerka</i>
Watts <i>et al.</i> , 2001	۰/۳۸۲	۰/۳۹۴	<i>Pleuronectes platessa</i>
Alam <i>et al.</i> , 2005	۰/۴۸	۰/۵۴	<i>Catla catla</i>
Jaime <i>et al.</i> , 2005	۰/۸۷۲	۰/۸۸۳	<i>Solea senegalensis</i>
Lundrigan, 2005	۰/۶۵۳	۰/۷۱۲	<i>Salvelinus alpinus</i>
Pruett <i>et al.</i> , 2005	۰/۱۹۸-۰/۸۴۵	۰/۰۴۳-۰/۹۵۷	<i>Rachycentron canadum</i>
Charrier <i>et al.</i> , 2006	۰/۶۷۸	۰/۷۴۱	<i>Pollachius pollachius</i>
Dahle <i>et al.</i> , 2006	۰/۱۹۸-۰/۸۴۵	۰/۸۵	<i>Gadus morhua</i>
Kitanishi <i>et al.</i> , 2008	۰/۶۶-۰/۷۳	۰/۷-۰/۸	<i>Oncorhynchus masou</i>
Menezes <i>et al.</i> , 2008	۰/۵۳-۱	۰/۶۴-۱	<i>Katsuwonus pelamis</i>
صفری، ۱۳۸۵	۰/۸۵	۰/۸۶	<i>A. nudiventris</i>
خوش خلق، ۱۳۸۵	۰/۷۶-۰/۹	۰/۶۲	<i>A. gueldenstatii</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	۰/۵۴	۰/۷۱	<i>Rutilus rutilus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	۰/۶۵۵	۰/۸۷۴	<i>Rachycentron canadum</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	۰/۴۹	۰/۶۴۶	<i>Rutilus frissi kutum</i>

۳-۵-۲- تعادل هاردی- واینبرگ

رابطه ای که پیشبینی های ژنوتیپی اخلاف را بر حسب فراوانیهای گامتی (اللی) خزانه ژن والدینی بیان می کند، قانون هاردی- واینبرگ نامیده می شود. اگر جمعیتی با شرایطی که مبنای این رابطه اند منطبق شود، طی نسلهای پی در پی تغییری در فراوانیهای گامتی یا زایگوتی آن رخ نخواهد داد. چنانچه جمعیتی در ابتدا به حالت عدم تعادل باشد برای اینکه به حالت تعادل ژنتیکی در آید یک نسل آمیزش اتفاقی کفایت می کند و تا زمانی که شرایط هاردی- واینبرگ برقرار است، جمعیت در حال تعادل باقی خواهد ماند (فراوانیهای گامتی یا زایگوتی

آن تغییری نمی کند). وجود جمعیت بزرگ با آمیزش اتفاقی، عدم انتخاب (selection)، عدم مهاجرت (gene flow)، عدم وجود فشار جهش و میوز معمولی در برقراری حالت تعادل موثر می باشند.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی مناطق ۹ گانه در این تحقیق، تمامی لوکوس های مورد بررسی خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند و تنها نمونه های منطقه تالاب (پائیزه) در جایگاه های ژنی AF277576، EF144125 و خشکروود در جایگاه EF144125 و گرگانرود و کورا در جایگاه AF277576 در تعادل بودند (جدول ۴-۷).

چنین مشاهداتی در مطالعاتی که بر روی ماهیان دیگر انجام گردیده است نیز گزارش شده است بطوری که Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ در بررسی ترکیب ذخایر *Merlangius merlangus* در آتلانتیک شمالی، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در ۳ جایگاه ژنی از ۴ جایگاه ژنی مورد مطالعه مشاهده نموده و علت آن را برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی^{۱۱} نتیجه گیری کردند. Reilly and Ward در سال ۱۹۹۷ در تعیین ساختار جمعیتی ماهی دنداندار (*Dissostichus eleginoides*) به جز یک ترکیب جایگاه - جمعیت ($P=۰/۰۳۸$) انحرافی از تعادل هاردی واینبرگ بین گروهها مشاهده نکردند و اعلام کردند که تعداد نمونه بیشتری برای ارزیابی ساختار جمعیت مورد نیاز است. Appleyard و همکاران در سال ۲۰۰۲، در مطالعه ساختار ژنتیکی تن ماهی چشم درشت (*Thunnus obesus*) انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در ۱۴/۰ جمعیتها به ازای کل جایگاهها مشاهده کرد و علت این عدم تعادل را احتمالاً مربوط به خطای نمونه گیری دانست.

Beacham و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ساختار جمعیت *Oncorhynchus nerka* عدم تعادل هاردی-واینبرگ فقط در یک جایگاه ژنی مشاهده کردند.

Israel و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی پراکنش ژنتیکی نمونه های تاس ماهی سبز در نمونه های رودخانه کلمبیا هیچ گونه انحرافی از تعادل هاردی-واینبرگ را مشاهده نکرده و عدم تعادل معنی دار در نمونه های خلیج سان پابلو را ناشی از آن می دانند که نمونه ها از یک ذخیره نیستند. Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی *Acipenser sinensis* با استفاده از ۴ جفت آغازگر ریز ماهواره انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را ناشی از آلل های پوچ دانستند.

^۱. Out Breeding

Aguilar و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی ژنتیکی جمعیت اردک ماهی شمال از ده جایگاه ژنی ترانوکلئوتیدی ریز ماهواره در یازده جمعیت استفاده کردند و انحراف معنی دار از تعادل هاردی- واینبرگ در هفت جایگاه ژنی جمعیت سبز، چهار جایگاه ژنی جمعیت قرمز، سه جایگاه ژنی جمعیت طلایی اردک ماهی شمال را گزارش کردند. Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی- واینبرگ را به علت افزایش هوموزیگوس، آلل های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و کافی نبودن نمونه ها ارتباط دادند. در بررسی قاسمی (۲۰۰۷) انحراف از تعادل مشاهده شده در نمونه های ماهی سیم به وجود اللهای نول و آمیزش خوشاوندی مولدین (drift) در کارگاههای تکثیر نسبت داده شد. کیوان شکوه و همکاران در سال ۲۰۰۷ انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) را به وجود اللهای نول نسبت دادند.

Kitanishi و همکاران در سال ۲۰۰۸ انحراف از تعادل مشاهده شده در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* را به خطای نمونه برداری نسبت دادند.

Menezes و همکاران در سال ۲۰۰۸ انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت های *Katsuwonus pelamis* را به وجود اللهای نول و اشتباهات الل خوانی و بالا بودن هتروزیگوسیتی در لوکوسهای ریز ماهواره ای نسبت دادند. در بررسی صفری در سال ۱۳۸۵ انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در تمام مناطق مختلف نمونه برداری به ازای هر جایگاه ژنی ($P < 0.001$) مشاهده شد و این عدم تعادل را میتوان به تکامل غیر هم جهتی که در جمعیت های مختلف برای یک جایگاه خاص در طول زمان در اثر تفاوت های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است یا کوچک بودن اندازه جمعیت نسبت داد.

خوش خلق در سال ۱۳۸۵ با استفاده از روش ریز ماهواره در تاسماهی ایرانی در تمام جایگاه ها انحراف از تعادل را به مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و تلاقی خویشاوندی (به ویژه در تاسماهی ایرانی) که عمده بچه ماهیان ناشی از تکثیر مصنوعی می باشند و همچنین خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت ها و تعداد کم نمونه ها در بعضی از مناطق اعلام کرد.

نوروزی در سال ۱۳۸۵ با استفاده از روش ریز ماهواره در ازون برون در تمام مناطق انحراف از تعادل را ناشی از آلل های نول، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و مخلوط شدن جمعیت ها اعلام کرد.

ریحانی در سال ۱۳۸۷ در مطالعه بر روی ماهی کلمه، عدم مشاهده تعادل هاردی واینبرگ را به وجود اللهای نول، رانش ژنتیکی، غیر کافی بودن نمونه‌ها نسبت داد.

سالاری در سال ۱۳۸۷ در مطالعه ژنتیکی با استفاده از روش ریزماهواره بر روی ماهی سوکلا، عدم مشاهده تعادل هاردی واینبرگ را به وجود اللهای نول، رانش ژنتیکی، مخلوط شدن جمعیت‌ها، غیر کافی بودن نمونه‌ها، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری نسبت داد.

در بررسی حاضر، در اکثر مناطقی که میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده پایین تر از هتروزایگوسیتی مورد انتظار بود عدم تعادل هاردی واینبرگ مشاهده شد. عدم مشاهده تعادل هاردی واینبرگ در این مطالعه می تواند ناشی از روش رتبه دهی به باندهای فریب دهنده یا حضور اللهای نول باشد که هموزیگوسها را جایگزین هتروزیگوسها می کند. در واقع وجود اللهای نول در ماهیان پدیده ای معمول است.

وجود عدم تعادل همراه با هتروزایگوسیتی بالا نشاندهنده وجود ساختار زیر جمعیت در منطقه نمونه برداری می باشد اما در این بررسی هیچ یک از مناطق در تمامی جایگاهها در تعادل نبودند.

همچنین رانش ژنتیکی، مخلوط شدن جمعیتها، غیر کافی بودن نمونه ها ، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری ، آمیزش های خویشاوندی و وجود جهش های محلی در جایگاه های ریز ماهواره ای که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزیگوت ها همانند هموزیگوت ها می شود را می توان از دلایل عدم تعادل هاردی - واینبرگ اعلام کرد.

در بررسی حاضر، انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در تمام مناطق مختلف نمونه برداری به ازای هر جایگاه ژنی ($P < 0.001$) مشاهده شد. این عدم تعادل را همچنین می توان به تکامل غیر هم جهتی که در نمونه های مناطق مختلف برای یک جایگاه ژنی خاص در طول زمان در اثر تفاوت های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است نسبت داد این امر موجب می گردد جایگاه مورد نظر برای کل جمعیت های ادغام شده از تعادل هاردی واینبرگ انحراف داشته باشد، همچنین کوچک بودن اندازه جمعیت نیز در این امر موثر است. چنین ساختاری را Islam, Alam در سال ۲۰۰۵ در *Catla catla* ; Ayllon و همکاران در سال ۲۰۰۶ در *Salmo salar* ; Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در *Pollachius pollachius* ; Porta و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه ژنتیکی بر

Yamamoto ; *Anaocypris* میلادی بر روی و همکاران در سال ۲۰۰۳ *Soela senegalensis* ; Salguerio

hispanica و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه ژنتیکی بر

Heist , Schrey ; *Salvenius leucomaenis* در سال ۲۰۰۷ در *Scaphirhynchus albus* انحراف از تعادل را در مطالعات

خود مشاهده نمودند.

در جدول ۲-۲۰ تعادل هاردی- واینبرگ در بررسی حاضر با نتایج حاصل از سایر گونه های ماهیان مقایسه

گردیده است.

جدول ۲-۲۰- مقایسه تعادل هاردی- واینبرگ در بررسی حاضر با نتایج حاصل از سایر گونه های ماهیان

رفرنس	تعادل هاردی- واینبرگ	گونه
Alarcon <i>et al.</i> , 2004	عدم انحراف	<i>Sparus aurata</i>
Beachham <i>et al.</i> , 2004	عدم انحراف	<i>Oncorhynchus nerka</i>
Yue <i>et al.</i> , 2004	انحراف معنی دار	<i>Scleropages formosus</i>
Alam <i>et al.</i> , 2005	انحراف معنی دار	<i>Catla catla</i>
Pruett <i>et al.</i> , 2005	انحراف معنی دار	<i>Rachycentron canadum</i>
Charrier <i>et al.</i> , 2006	انحراف معنی دار	<i>Pollachius pollachius</i>
Dahle <i>et al.</i> , 2006	انحراف معنی دار	<i>Gadus morhua</i>
Porta <i>et al.</i> , 2006	انحراف معنی دار	<i>Soela senegalensis</i>
Yamamoto <i>et al.</i> , 2006	انحراف معنی دار	<i>Salvenius leucomaenis</i>
Ghasemi <i>et al.</i> , 2007	انحراف معنی دار	<i>Abramis brama</i>
Keyvan shokooh., 2007	انحراف معنی دار	<i>Rutilus rutilus</i>
Kitanishi <i>et al.</i> , 2008	انحراف معنی دار	<i>Oncorhynchus masou</i>
Menezes <i>et al.</i> , 2008	انحراف معنی دار	<i>Katsuwonus pelamis</i>
صفری، ۱۳۸۵	انحراف معنی دار	<i>Acipenser nudiventris</i>
خوش خلق، ۱۳۸۵	انحراف معنی دار	<i>A. gueldenstadtii</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	انحراف معنی دار	<i>A. stellatus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	انحراف معنی دار	<i>Rutilus rutilus</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	انحراف معنی دار	<i>Rachycentron canadum</i>

۴-۵-۲- میزان F_{st} و R_{st} , جریان ژنی

بر اساس تعاریف، یک جمعیت گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولید مثلی از گروه‌های دیگر همان گونه جدا هستند اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیتها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیتها) به عنوان گونه مطرح نمی‌گردند. در حقیقت رفتارهای تولید مثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولید مثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت می‌باشد (صفری، ۱۳۸۵).

در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه برداری کرد، معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم پوشانی نسلی هستند بنابراین اطلاعات ژنتیک جمعیت اغلب افراد را از نسل‌های مختلف بررسی می‌کند. وقتی نمونه برداری در جایی در بیش از یک زمان صورت می‌گیرد راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی تست تمایز بین نمونه‌هاست (Viard *et al.*, 1997).

نکته مهم در ریزماهواره نرخ جهش بالا در جایگاه‌های ریزماهواره است و از الگوی جهش نیز نباید غفلت کرد. روش تغییر در ریزماهواره‌ها تعیین کننده وضعیت آماری است که می‌تواند منعکس کننده مهاجرت یا زمان انشعاب باشد. اگر الگوی جهش در ریزماهواره کاملاً شناخته شود امکان تعیین شاخص آماری برای تمایز فاصله آللی تابع مهاجرت یا زمان انشعاب بین جمعیتها وجود دارد. مدل‌های مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است اما هیچ یک از مدل‌های ارائه شده به طور کامل مناسب برای جایگاه‌های ریزماهواره نیستند. در نتیجه هر دو روش برآورد مرسوم در تمایز (F_{st}) و برآورد کننده تمایز مخصوص ریزماهواره (R_{st}) به طور معمول در مطالعاتی که از مارکرهای ریزماهواره استفاده می‌گردد، گزارش می‌شوند. F_{st} و R_{st} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان، نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییر پذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Meffe and Carool, 1997).

در این بررسی، نتایج بدست آمده از F_{st} (جدول ۴-۱۰) اختلاف بین کلیه مناطق نمونه برداری را نشان می‌دهد ($P \leq 0/01$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کورا است و حداکثر آن (۰/۲۱۷) بر اساس تست AMOVA بین نمونه‌های رودخانه گرگانرود و خشکرود

مشاهده شد. حداقل F_{st} (۰/۰۸۶) بر اساس تست AMOVA بین نمونه‌های رودخانه تنکابن و گرگانرود مشاهده شد.

محاسبه F_{st} برحسب فراوانی (جدول ۴-۱۳) حداکثر میزان آن را (۰/۱۴۴) بین نمونه‌های خشک‌رود و گرگانرود که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۱/۵) است مشاهده می‌شود. حداقل F_{st} (۰/۰۵۶) بر حسب فراوانی بین نمونه‌های گرگانرود و تنکابن که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴/۲۸) است مشاهده شد.

نتایج بدست آمده از R_{st} (جدول ۴-۱۱) اختلاف بین کلیه مناطق نمونه برداری را نشان می‌دهد ($P \leq 0/01$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کورا است و حداکثر میزان اختلاف آن ($R_{st}=0/271$) بین نمونه‌های بهاره تالاب انزلی و نمونه‌های تنکابن و کمترین میزان اختلاف ژنتیکی ($R_{st}=0/026$) بین نمونه‌های رودخانه تنکابن و پاییزه تالاب انزلی به دست آمد. همچنین بین نمونه‌های بهاره و پاییزه تالاب انزلی نیز تفاوت مشاهده شد.

در کل عنوان شده که تفسیر مقدار R_{st} و F_{st} مشکل است. برای مثال مقدار F_{st} همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ زیرجمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیرجمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است. زمانی که F_{st} بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان‌دهنده جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. به هر حال دادن یک معنی بیولوژیکال به این داده‌ها سخت و گمراه کننده است. برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Tevfic, 2005).

اگرچه در بررسی ذخایر (*Merlangius merlangus*) ماهی Whiting توسط Rico و همکاران در سال ۱۹۹۵ میزان F_{st} بطور واضح بالاتر از صفر تخمین زده شده ولی به جهت تخمین نسبتاً پایین آن تمایز ژنتیکی بین مناطق با فاصله جغرافیایی زیاد مشخص نشده است.

Anger و همکاران در سال ۱۹۹۵ در بررسی تقسیمات زیرجمعیت brook charr (*Salvelinus fontinalis*) در ۵ دریاچه میزان G_{st} را در لوکوسهای مورد مطالعه ۰/۵۲، ۰/۳۲، ۰/۸۳، ۰/۸۴ ($P \leq 0.001$) تعیین کردند و ۵ جمعیت مجزا در نظر گرفتند.

Shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ در مطالعه شک ماهی اطلس (*Clupea harengus*) میزان Fst میان جمعیتها را ۱ الی ۳ درصد تخمین زدند که این میزان اختلاف مشاهده شده بین جمعیتها را نشان نمی داد بنابراین از شاخص دیگری بنام Rst استفاده کردند که میزان آن ۲ الی ۲۷ درصد بود و عدم معنی دار بودن اختلاف بین جمعیت هرینگهای بهار تخم ریز نروژ و هرینگهای بالسفجورد را ناشی از مهاجرت برای تغذیه این ماهیان دانستند.

Smith و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه آنالیز ژنتیکی جمعیت تاسماهیان سفید (*Avcipenser transmontanus*) در رودخانه Fraser تمایز مکانهای درون هر گروه را در سطح ($P \leq 0/05$) بی معنی، در حالیکه تفاوت میان گروهها را در سطح ($P \leq 0/05$) معنی دار اعلام کردند و تفاوت میان گروهها را ناشی از رژیم های هیدرو جغرافیائی و تغذیه ای که به عنوان سد مهاجرتی برای تاسماهی سفید است بیان کردند و تاس ماهیان سفیدی که در قسمت بالایی Fraser و Nachako وجود دارد کمتر رشد می کند و باید فاصله زیادی را برای تغذیه طی کند و احتمالاً باید زمان بیشتری را در زیر یخ زمستانه با متابولیسم پایین داشته باشند و میزان Fst ($P \leq 0/01$) بزرگتر از صفر بود که نمایانگر جدایی جمعیتها (*Acipenser oxyrinchus*) سواحل آتلانتیک و خلیج مکزیک آمریکای شمالی می باشد.

Adams و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی ساختار Brook charr (*Salvelinus fontinalis*) میزان Rst را $0/052$ ($P \leq 0/001$) تعیین و اعلام کردند که علی رغم وجود سد فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه های حوزه آبریز خلیج هند هر دریاچه جمعیت تولید مثلی مجزایی دارد که این را به شرایط هیدرو جغرافیایی نه به فاصله جغرافیایی نسبت دادند.

Appleyard و همکاران در سال ۲۰۰۲ میزان Fst در لوکوسهای مورد مطالعه را $0-0/01$ (بطور متوسط $0/002$) تخمین زده و نتوانستند فرضیه یک نوع وهم شکل بودن (Panmictic) جمعیت تن ماهی چشم درشت (*obesus*) را در اقیانوس هند رد کنند. در تصدیق این یافته باید اشاره کرد که Show و همکاران در سال ۲۰۰۲ تعداد کمی هاپلو تیپهای از تن ماهی چشم درشت آتلانتیک را در بررسی mtDNA ای تن ماهی چشم درشت اقیانوس هند مشاهده کرد که علت وجود آن را ماهیانی که در راه بازگشت به آتلانتیک تخم ریزی کرده باشند دانست و اعلام کرد اینها نمی توانند ساختار ژنتیکی جمعیت پان میکتیکی اقیانوس هند را بر هم بزنند و تن ماهی چشم درشت آتلانتیک را کاملاً متمایز دانست. Beacham و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تعیین جمعیتی افراد

Sokey salmon (*Oncorhynchus nerka*) میزان Fst را ۰/۰۶ تخمین زدند و ۸۹٪ از افراد مورد بررسی در دریاچه ها به یک دریاچه و ۹۶٪ افراد مورد بررسی در رودخانه ها به یکی از دو رودخانه تعلق داشتند.

Herwerden و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی تنوع ریزماهواره ای و ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus*) در مناطق صخره ای Great barrier در ۶ مکان نمونه برداری از سه ناحیه جغرافیایی تنوع ژنتیکی داخل مکانها ۹۹/۷۴٪ (P≤۰/۰۲۳)، بین مکانها ۱۵٪ (P≤۰/۱۷۶)، میان نواحی ۰/۱٪ (P≤۰/۰۲۲۴۷) برآورد نمود که بین نمونه های داخل هر مکان اختلاف معنی دار بین مکانها و میان نواحی اختلاف معنی دار نبود و *L. miniurus* به عنوان یک ذخیره ژنتیکی مشخص در GBR وجود داشته است و مهاجرت بین نواحی نمونه برداری وجود دارد. نتایج ایشان مشابه نتایج این بررسی میباشد. به دلیل اینکه فراوانی هر هاپلوטיפ در بررسی حاضر یک است لذا در تست AMOVA بیشترین تنوع مربوط بین افراد به دست آمده است.

Brightte و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان Fst را در میان جمعیت های اردک ماهی (*Esox lucius*) ۰/۵۱ بدست آوردند و توانستند جمعیت های شمال آمریکا و جنوب اروپا را کاملاً از هم جدا کنند.

Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار Fst و فاصله جغرافیایی را مشاهده نکردند و ساختار ژنتیکی ضعیف این ماهی را نشان دهنده جریان ژنی بالا بین مولدین اعلام کردند.

کیوان شکوه و همکاران در سال ۲۰۰۷ جمعیت های کلمه تالاب انزلی و خلیج گرگان را متفاوت از هم تشخیص داده و عنوان نمودند جمعیت کلمه سواحل جنوبی خزر یک جمعیت پانمیکتیک نمی باشد.

Kitanishi و همکاران در سال ۲۰۰۸ وجود جمعیت های متفاوت *Oncorhynchus masou* در رودخانه Atsuta را به رفتار این گونه و بازگشت به زادگاه مادری آن نسبت دادند.

Menezes و همکاران در سال ۲۰۰۸ خطای نمونه برداری و از طرفی نوع رفتار این ماهی را علت عدم وجود جمعیت های متفاوت *Katsuwonus pelamis* در غرب هند و سواحل ژاپن دانست.

در بررسی صفری در سال ۱۳۸۵ با در نظر گرفتن دو منطقه نمونه برداری: منطقه شمال (ناحیه رودخانه اورال) و منطقه سواحل جنوبی دریای خزر (نواحی انزلی، کیاشهر، سفیدرود، نوشهر، بابلسر، گرگان)، اختلاف بین مناطق نمونه برداری (P≤۰/۰۵ و ۳۲٪)، اختلاف بین نواحی (P≤۰/۰۵ و ۴٪) مشاهده شد. خوش خلق در سال

۱۳۸۵ در بررسی تاسماهی ایرانی سه جمعیت مستقل تاسماهی ایرانی (جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود، جمعیت تاسماهی ایرانی منطقه ترکمنستان و جمعیت تاسماهی ایرانی ناحیه سه شیلاتی). گزارش کرد. نوروزی در سال ۱۳۸۶ با استفاده از روش ریزماهواره در مطالعه جمعیت‌های ازون برون دامنه F_{st} را ۰/۰۲۸ تا ۰/۰۶۳ و دامنه R_{st} با احتمال ۹۹ درصد ۰/۰۴۱ تا ۰/۴۳۹ اعلام کرد. قاسمی در سال ۲۰۰۷ ماهی سیم آذربایجان و ایران را از هم جدا نمودند. در بررسی ریحانی در سال ۱۳۸۷ میزان F_{st} بین نمونه های کلمه ایران و آذربایجان را ۰/۰۶۴ تخمین زدند.

در بررسی سالاری در سال ۱۳۸۷ سه جمعیت مستقل ماهی سوکلا (جمعیت ماهی سوکلای ناحیه بوشهر، بندر عباس و چابهار) در میان نمونه‌های مورد بررسی نشان داد.

در بررسی حاضر تفاوت مشاهده شده بین جمعیتها ($P \leq 0/01$) احتمالاً به فواصل جغرافیایی بین مناطق مرتبط است. تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۲ منطقه و ۶ ناحیه، منطقه اول ناحیه رودخانه کورا و منطقه دوم (نواحی تالاب انزلی (نمونه های بهاره و پاییزه)، خشکرو، تجن، تنکابن، گرگانرود) و بر اساس تست AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) در سطح احتمال ۹۹٪ اختلاف بین نمونه های اختلاف بین نمونه های هر ناحیه ($P \leq 0/01$ و ۸۳٪)، اختلاف بین مناطق نمونه برداری ($P \leq 0/01$ و ۱۴٪)، اختلاف بین نواحی ($P \leq 0/01$) محاسبه شد.

در (جدول ۴-۱۳) مقادیر F_{st} و جریان ژنی (Nm) در بررسی حاضر با نتایج حاصل از دیگر مطالعات جهت مقایسه آورده شده است.

وجود تفاوت بین نمونه های بهاره و پاییزه تالاب انزلی ($F_{st}=0/15$) نیز تصدیق کننده وجود نژادهای بهاره و پاییزه این ماهی در این تالاب و دریای خزر می باشد که لازم است در بازسازی ذخایر به نژادهای پاییزه توجه بیشتری گردد. بر اساس محاسبه انجام شده تعداد ماهی سفید مهاجرین نواحی نمونه برداری، حداقل مهاجرت (۱/۵) بین نواحی گرگانرود و خشکرو و حداکثر مهاجرت بین نواحی گرگانرود و تنکابن صورت گرفته است و متوسط میزان مهاجرت بین منطقه جنوبی خزر و رودخانه کورا ($Nm=2/69$) و بین نواحی بخش خزر جنوبی ($Nm=2/79$) میباشد و این امر بیانگر اینست که تعداد ماهی مولد مهاجرت کننده در بخش جنوبی دریای خزر

بیش از مهاجرت به رودخانه کورامیباشد. در جدول ۲۱-۲ مقادیر Nm و Fst (جریان ژنی) در بررسی حاضر با نتایج حاصل از سایر گونه های ماهیان مقایسه گردیده است.

جدول ۲۱-۲- مقایسه مقادیر Fst و جریان ژنی (Nm) در بررسی حاضر با نتایج حاصل از دیگر مطالعات

رفرنس	Nm	Fst	گونه
Alarcon et al., 2004	۶/۷	۰/۰۳۶	<i>Sparus aurata</i>
Watts et al., 2001	۱۲/۹	۰/۰۱۹	<i>Pleuronectes platessa</i>
Alam et al., 2005	۲۲/۲-۱۱/۳	۰/۰۰۶-۰/۰۲۲	<i>Catla catla</i>
Yamamoto et al., 2006	۰/۷-۰/۶	۰/۲۵۸-۰/۲۸۳	<i>Salvenius leucomaenis</i>
Lucentini et al., 2006	۰/۴-۲۴/۸	۰/۰۱-۰/۴۱	<i>Esox lucius</i>
نوروزی، ۱۳۸۶	۸/۷-۳/۷	۰/۰۲۸-۰/۰۶۳	<i>A. stellatus</i>
خوش خلق، ۱۳۸۵	۲۲/۵-۷/۶	۰/۰۱۱-۰/۰۳۲	<i>A. gueldenstadti s</i>
صفری، ۱۳۸۵	۸/۷-۰/۳	۰/۰۰۴-۰/۴۸	<i>Acipenser nudiventris</i>
ریحانی، ۱۳۸۷	۱۸/۱۹	۰/۰۳	<i>Rutilus rutilus</i>
سالاری، ۱۳۸۷	۳/۷-۶/۳۴	۰-۰/۰۶۳	<i>Rachycentron canadum</i>
شجاعی، ۱۳۸۸	۰/۱۰۸-۰/۲۰۴	۰/۵۶-۰/۱۴۴	<i>Rutilus frissi kutum</i>

۲-۵-۵- شباهت و فاصله ژنتیکی

در بررسی صفری در سال ۱۳۸۵ بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های نواحی گرگان و سفیدرود (۰/۸۵۳) و کمترین شباهت میان نمونه های نواحی سفیدرود و کیاشهر (۰/۳۲۷) مشاهده شد.

در بررسی ریحانی در سال ۱۳۸۷ بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های انزلی و خلیج گرگان (۰/۹۸۵) و کمترین میان نمونه های انزلی و روسیه (۰/۷۶۵) مشاهده شد.

در بررسی سالاری در سال ۱۳۸۷ بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های مناطق دیر و بریس وجود داشت. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های مناطق بندر عباس و بندر لنگه وجود داشت. در مطالعه حاضر

بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود با نمونه های پاییزه تالاب و خشکرو (۰/۶۴۶) و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های گرگانرود و تنکابن (۰/۲۳۷) وجود دارد. با توجه به میانگین (۰/۴۴)، فاصله ژنتیکی بین نمونه های مناطق مختلف قابل توجه به نظر می رسد. Shaklee و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Thorpe و Sol-Cave در سال ۱۹۹۴ فاصله ژنتیکی برای جمعیت های هم گونه به طور میانگین ۰/۰۵ (۰/۰۰۲-۰/۰۷) ، برای گونه های هم جنس به طور میانگین ۰/۳ (۰/۰۳-۰/۶۱) و برای جنس های با خانواده مشترک بین ۰/۵۸ تا ۱/۲۱ می باشد. فاصله ژنتیکی به دست آمده در رنج گونه های هم جنس نشان دهنده انشقاق ژنتیکی آنها می باشد .

۶-۲- نتیجه گیری نهایی

با توجه به ارزیابی مقادیر به دست آمده از فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی- واینبرگ، ماهی سفید دریای خزر در مناطق مختلف نمونه برداری به نظر می رسد که در سواحل جنوبی دریای خزر بیش از یک جمعیت ماهی سفید وجود دارد. همچنین نتایج آنالیز آماری، جدایی جمعیت کورا را از جمعیت ماهی سفید نواحی جنوبی خزر نشان داد ولی به جهت اینکه حداکثر و حداقل تمایز بین نمونه های سواحل ایران به دست آمد و تمایز نمونه های کورا در رنج این حداکثر و حداقل بود همچنین با توجه به اینکه آذربایجان نقشی در تکثیر این ماهی ندارد صحبت در مورد وجود جمعیت ماهی سفید کورا احتیاج به مطالعات بیشتری دارد.

جمعیت ماهی سفید تالاب انزلی دارای وضعیت بهتری نسبت به سایر جمعیت ها می باشد زیرا دارای تنوع ژنتیکی بالاتری بوده و این امر سبب افزایش سازگاری با تغییرات ناگوار زیست محیطی می گردد. کاهش اختلاف ژنتیکی منجر به کاهش پتانسیل ژنتیکی و کاهش سازگاری با تغییرات محیطی می شود، بنابراین نظارت بر هر تغییر در ساختار ژنتیک جمعیت های این گونه ضروری است.

کمترین مقدار تنوع ژنتیکی در نمونه های جمعیت کورا دیده شد که علت آن تخریب زیستگاه های طبیعی ناشی از توسعه تاسیسات و صنایع حاشیه این رودخانه می باشد. وجود دخالت های انسانی و فعالیت های مدیریتی در دهه های اخیر در این گونه غالب بر فعالیت های طبیعت شده است، در حقیقت گسترش حمل و نقل زیاد نمونه ها بین مکان های مختلف می تواند ساختار طبیعی جمعیت را تحت تاثیر قرار دهد. فشار صید توسط انسان می تواند جمعیت های محلی این گونه و تنوع آنها را متاثر کند.

با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش فرض های معلوم می توان جمع بندی کرد که نشانگرهای ریز ماهواره ای ابزار بسیار توانمندی برای بررسی تنوع درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی می باشند و برتری های انکار ناپذیری را در این رابطه دارا می باشند. در حقیقت این مطالعه به هدف اصلی خود یعنی ارزیابی کارآمدی ریز ماهواره ها برای مطالعه ژنتیک جمعیتی بر روی جمعیت های ماهی سفید نائل گردیده است و علی رغم تخریب زیستگاه، فشار صیادی، آلودگی های شدید زیست محیطی و کاهش شدید ذخایر ماهی سفید در خزر هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی نسبتاً بالا بوده و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد.

این مطالعه مدارک و شواهد اولیه را برای وجود جمعیت های متمایز نشان می دهد و با توجه به برنامه درست اقدام شیلات ایران در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی سفید در سواحل جنوبی خزر در ایران بهتر است برای مدیریت این ذخایر، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود. اگر برنامه های مدیریتی ذخیره سازی تمامیت ژنتیکی افراد را در برداشته باشند در این صورت جمعیت حفظ می شود، اما استفاده از افراد سایر جمعیت ها ممکن است تمایز ژنتیکی بین جمعیت ها را به خطر بیاندازند؛ افراد باقی مانده از یک جمعیت باید به شدت محافظت شوند و برای حفاظت در هنگام گرفتن ژن باید از تعداد زیاد مولدین استفاده کرد و هنگامی می توان از جمعیت های این گونه محافظت کرد که در مدیریت به ساختار جمعیت محلی شامل برنامه های دقیق ذخیره سازی و مشکلاتی همانند کاهش زیستگاه های و صید بی رویه توجه شود.

۲-۷-۲- پیشنهادات

۲-۷-۱- پیشنهادات اجرایی

۱- بر اساس نتایج به دست آمده بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که باید هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود و از جابجایی ماهیان صید شده به سایر مناطق به منظور تکثیر مصنوعی جلوگیری شود.

۲- با توجه به متفاوت بودن نژاد بهاره و پاییزه این ماهی و بالا بودن هتروزیگوسیتی نژاد پاییزه پیشنهاد می گردد در بازسازی ذخایر و تکثیر مصنوعی، از نژاد پاییزه این گونه استفاده شود.

۳- به منظور افزایش تنوع و حفاظت ژنتیکی این گونه در کارگاههای تکثیر مصنوعی از بیشترین تعداد مولد استفاده شود.

۲-۷-۲- پیشنهادات پژوهشی

۱- از آنجا که حداکثر و حداقل تمایز بین نمونه های سواحل ایران به دست آمد و تمایز نمونه های کورا با سایر نمونه ها در رنج این حداکثر و حداقل بود همچنین با توجه به اینکه آذربایجان نقشی در تکثیر این ماهی ندارد توصیه میگردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت این گونه تعدادی نمونه از داخل رودخانه کورا صید شود و با تعداد پرایمر بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

۲- با توجه به توانایی بالای روش ریزماهواره توصیه میگردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت سایر آبزیان این روش مورد استفاده قرار گیرد.

۳- از آنجائیکه تا کنون پرایمرهای اختصاصی ریزماهواره این گونه کلون و شناسائی نشده است پیشنهاد میگردد پرایمرهای اختصاصی این گونه مورد مطالعه و طراحی قرار گیرد.

۴- پیشنهاد میگردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت از تعداد نمونه و پرایمر بیشتری استفاده گردد.

۵- از آنجا که الکتروفورز عمودی با ارتفاع ژل بیشتر، توانایی بالاتری در جداسازی و تفکیک باندهای نزدیک به هم را دارد، پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی از الکتروفورز عمودی با ارتفاع ژل بیشتر استفاده گردد.

Abestrac:

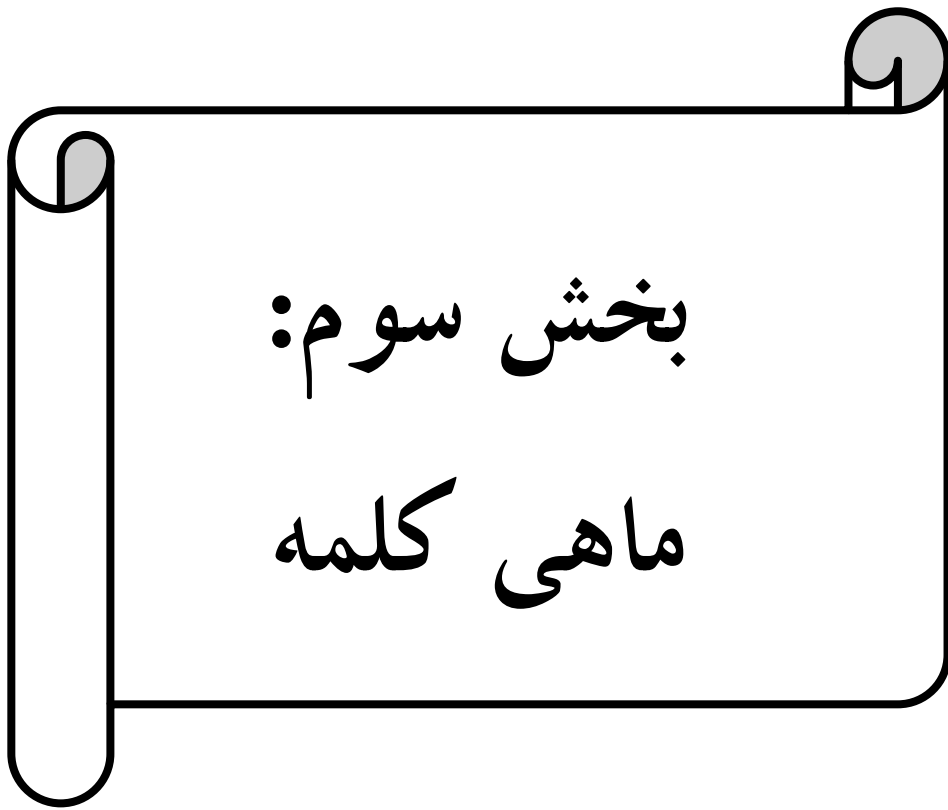
In order to carry out genetic variation studies, 210 fish were caught from 3 different regions of the Iranian coastline (Khoshkrud, Tonekabon, Gorganrud) and 1 region in Azerbaijan (Waters of the Caspian Sea close to Kura River mouth) during 2008-2009. Genomic DNA was extracted of fin using the phenol-chloroform. The quantity and quality of DNA from samples were assessed by spectrophotometer and 1% agarose gel electrophoresis.

PCR was carried out using 15 paired microsatellite primers. PCR products were separated on 8% polyacrylamide gels that were stained using silver nitrate. Molecular weight calculate using UVTech software. The recorded microsatellite genotypes were used as input data for the GENALEX software version 6 package in order to calculate allele and genotype frequencies, observed (H_o) and (H_e) expected heterozygosities and to test for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. Genetic distance between two populations was estimated from Nei standard genetic distance and genetic similarity index (Nei, 1972). Genetic differentiation between populations was also evaluated by the calculation of pairwise estimates of F_{st} and R_{st} values. From 15 SSR markers were used in this investigation, 9 of them were polymorph. Average of expected and observed heterozygosity was 0.54 and 0.49 respectively. Significant deviations from Hardy-Weinberg expectations were observed in all of location except Anzali lagoon- autumn in AF277576 and EF144125, Khoshkrud in EF144125 and Gorganrud and Kura in AF277576. Using F_{st} and R_{st} there was significant difference between locations ($P \leq 0.01$). According to F_{st} , the highest population differentiation ($F_{st} = 0.217$) was between Gorganrud and Khoshkrud that have the lowest N_m and the lowest ($F_{st} = 0.086$) was between Gorganrud and Tonekabon that have the highest N_m . Using R_{st} the highest population differentiation ($R_{st} = 0.271$) was between Tonekabon and spring Anzali lagoon and the lowest ($R_{st} = 0.026$) was between Tonekabon and Autumn Anzali lagoon. Also the difference between Spring Anzali lagoon and Autumn Anzali lagoon was noticeable ($F_{st} = 0.15$). AMOVA analysis with consideration of 2 sampling regions (Iran and Azerbaijan) and 7 sampling locations (Iran: Khoshkrud, Tonekabon, Gorganrud, Spring Anzali lagoon and Autumn Anzali lagoon; Azerbaijan: the Kura mouth) revealed that almost all of the variance in data namely 83% ($P \leq 0.01$) was within locations, Genetic variances among locations was 14% ($P \leq 0.01$) and among regions was 3% ($P \leq 0.01$).

The genetic distance was the highest (0.646) between Gorganrud and Autumn Anzali lagoon populations, whereas the lowest distance (0.237) was between Gorganrud and Tonekabon River.

Result obtained from the present study show that at least 2 different population of *Rutilus frisii kutum* are found in the Caspian sea, which are including the Kura river population and the southern Caspian sea samples and it appears that there is more than one population in southern Caspian sea that should be attantioned in artificial reproduction Center and stoke rebilding.

Keyword: *Rutilus frisii kutum*, populations Genetic, Caspian sea, microsatellite, Iran, Azerbaijan



چکیده

ماهی کلمه یکی از مهمترین گونه های تجاری دریای خزر محسوب می شود که علی رغم اهمیت آن اطلاعات کمی در خصوص روابط ژنی و تنوعات آن در سطح مولکولی در دسترس است در این تحقیق ساختار ژنتیکی ۹۰ نمونه ماهی کلمه از مناطق جنوب دریای خزر (نواحی خلیج گرگان و تالاب انزلی) و شمال دریای خزر (ناحیه دلتای ولگا) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها بوسیله سالیکن و تورهای گوشگیر جمع آوری گردید و پس از استخراج DNA به روش فنل - کلروفورم و ارزیابی کمیت و کیفیت آن با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر مایکروساتیلایت در شرایط استاندارد با PCR تکثیر گردید که در ۴ جفت از پرایمرها حالت پلی مورفیسم مشاهده شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۵) و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۷) بود. آنالیز تنوع ژنتیکی بیشترین اختلاف را بین نمونه های هر ناحیه ۹۳٪ ($P \leq 0/01$)، اختلاف بین مناطق ۷٪ ($P \leq 0/01$)، و اختلاف بین نواحی نمونه برداری را صفر درصد نشان داد ($P \geq 0/01$). بیشترین شباهت ژنتیک بین نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان و کمترین شباهت میان نمونه های بندرانزلی و دلتای ولگا مشاهده گردید. نتایج بدست آمده از F_{st} ، اختلاف معنی داری بین نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان نشان نداد ولی اختلاف نمونه های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P \leq 0/05$). لذا بر اساس نتایج بدست آمده از تست F_{st} به نظر می رسد نمونه های ماهی کلمه نواحی منطقه جنوب دریای خزر مربوط به یک جمعیت بوده و از نمونه های شمالی آن جدا می باشد. با در نظر گرفتن این حقیقت که این گونه پس از تکثیر در دریای خزر رها می شود کنترل و نظارت منظم برای جلوگیری از دست رفتن پلی مورفیسم موجود به علت مشکلات تخمیزی به اشکال مختلف ضروری است.

کلمات کلیدی: مایکروساتیلایت، ساختار جمعیتی، ماهی کلمه، دریای خزر

کلمه دریای خزر با نام علمی (*Rutilus rutilus caspicus* (Berg., 1912)، جز یکی از مهمترین گونه های تجاری محسوب می شود و دارای سه گروه مستقل شمالی، ترکمنی و آذربایجانی (کورا) در دریای خزر می باشد که تراکم کلمه خزر شمالی در دلتای ولگا و در منطقه اورال-امینسک است، در حالیکه تراکم کلمه ترکمنی و آذربایجان به ترتیب در مصب رودخانه اترک و خلیج قزل آقاچسک می باشد. کلمه ترکمنی در جنوب شرقی دریای خزر زندگی کرده و برای تولید مثل به رودخانه اترک، گرگانرود، خلیج گرگان و تالاب گمیشان مهاجرت می نماید ولی کلمه آذربایجان در قسمت های غرب و جنوب غربی دریای خزر زیست کرده و برای تخمیزی به رودخانه های منتهی به تالاب انزلی، کورا و شلمان رود و به مقدار کم به قسمت های جنوب شرقی دریای خزر مهاجرت می کند.

در سال های اخیر به علت صید بی رویه، تخریب زیستگاه ها و بستر های تخمیزی در لیست گونه های در معرض انقراض قرار گرفته است (Kiabi et al., 1999)، بطوریکه بر اساس آمار صید تهیه شده از مرکز تحقیقات شیلات استان گیلان، میزان صید ماهی کلمه در سال ۱۳۷۸ نسبت به سال ۱۳۷۷، در استان گلستان ۳۹٪ و در استان گیلان ۴۶٪ کاهش نشان داده است. ماهی کلمه بر طبق طبقه بندی IUCN از گونه های در معرض تهدید محسوب شده است (IUCN., 1994). هدف مدیریت شیلاتی، حداکثر برداشت پایدار ذخایر ماهیان می باشد که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می باشد. در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه ها، جمعیت ها، نژادها، با استفاده از صفات مرفومتريک و مریستیک مثل طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی، صورت می گرفت. اما با توجه به حساسیت بالای صفات مرفومتريک و مریستیک به تغییرات محیطی و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان، از طرفی محدود بودن تفسیر داده های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها (Adams., 2002)، پیشرفت علم استفاده از مارکرهای مولکولی مثل Microsatellite, RAPD, AFLP, RELP, Allozyme که متأثر از فاکتورهای محیطی نمی باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Rayman., 1991).

تعاریف متفاوتی از ذخایر در منابع مختلف ذکر شده است ولی به طور کلی می توان ذخایر را چنین تعریف کرد: ذخایر به مجموعه ای از افراد نزدیک به هم در یک گونه که در یک مکان خاص زیست کرده و از لحاظ

ژنتیکی از سایر جمعیت های متعلق به همان گونه قابل تشخیص هستند اطلاق می شود (پورکاظمی و همکاران ۱۳۸۳). هر فرد به عنوان یک خزانه ژنتیکی محسوب می شود پس جمعیت ها در حقیقت مجموعه متنوعی از ژنها هستند که عواملی همچون فاصله نسل ها در این ماهیان، صید بی رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاه ها منجر به کاهش اندازه جمعیت های موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می گردد. که این امر خطر انقراض را افزایش می دهد.

با توجه به موارد یادشده و همچنین اهمیت ماهی کلمه در تغذیه فیل ماهی و ارزش شیلاتی آن پژوهش حاضر با هدف آشکار ساختن ارتباط ژنی در بین جمعیت های کلمه خلیج گرگان، تالاب انزلی و دلتای ولگا بر اساس نشانگر ریزماهواره Microsatellite به اجرا در آمده است.

اهداف تحقیق حاضر تعیین تنوع ژنتیکی ماهی کلمه در مناطق مختلف نمونه برداری و شناخت جمعیت های احتمالی این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر و مقایسه با نمونه های دلتای ولگا و همچنین معرفی مارکر های ژنتیکی مربوط به ماهی کلمه می باشد.

۳-۲- کلیات:

۳-۲-۱- بیولوری ماهی کلمه

۳-۲-۱-۱- رده بندی ماهی کلمه

رده بندی ماهی کلمه به صورت زیر می باشد:

- 1-Kingdom:Animal
- 2-Phylum:Chordata
- 3-Subphylum:Vertebrata
- 4-Superclass:Pices
- 5-Class:Osteichthy
- 6-Subclass:Actinopetrygii
- 7-Superorder:Teleostei
- 8-Order:Cypriniformis
- 9-Family:Cyprinidae
- 10-Genus:*Rutilus*
- 11-Species:*rutilus*



شکل ۱-۱ ماهی کلمه

۲-۱-۲-۳- نامهای متداول

قبل از دانشمندانی چون پالاس^۱ و برگ^۲ این ماهی به نام علمی *Cyprinus rgislagine* معروف بوده است. در سال ۱۷۸۶ پالاس این ماهی را *Rutilus rutilus* ویژه ای فرض نمود. اشتباه پالاس وقتی اصلاح شد که یاکوولر^۳ در سال ۱۸۷۳ نزدیکی بین کلمه و *Rutilus rutilus* را که زمانی خود بنام علمی *Cyprinus rutilus* معروف گردیده بود ثابت کرد. کسلر^۴ نیز قبل از آن کلمه را با نام علمی *Leuciscus rutilus* معرفی نموده بود. بالاخره در سال ۱۹۱۲ پراوردین^۵ نیز این موضوع را تأیید کرد و تاکنون ماهی کلمه این نام علمی خود را حفظ نموده است. در میان صیادان و مردم استان مازندران این ماهی با نام های مختلف معروف است. اهالی شرقی تر یعنی حوالی بندر ترکمن، بندر گز، گهرباران بیشتر این ماهی را با نام تلاجی می شناسند، اهالی و صیادان محمودآباد و نور نیز این ماهی را کاملاً

^۱Pallas

^۲Berg

^۳Yakouler

^۴Kessler

^۵Pravdin

تحت عنوان تلاجی می شناسند، مردم غرب استان مثل شهرهای نوشهر، چالوس و تنکابن این ماهی را کلمه می نامند. بعضاً با نام ماهی چشم قرمز نیز یاد می شوند.

۲-۲-۳- ریخت شناسی گونه

طول کل این ماهی در شرایط زیستی مطلوب حداکثر به ۴۰ سانتیمتر می رسد ولی معمولاً در قره سو ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر است.

ارتفاع باله مخرجی ۹ تا ۱۴ درصد و طول سر ۲۰ الی ۲۳ درصد، از طول بدن می باشد ارتفاع باله پشتی ۱۶ تا ۲۳ درصد، طول ساقه دمی همواره بیش از ارتفاع سر است. طول باله سینه ای ۱۵ تا ۱۹ درصد، طول باله شکمی ۱۶ تا ۱۸ درصد، طول باله پشتی ۱۲ تا ۱۶ درصد، طول باله مخرجی ۱۰ الی ۱۴ درصد و ارتفاع باله پشتی ۱۶ تا ۲۲ درصد از طول بدن می باشد.

باله پشتی دارای پایه ای کوتاه و از پایین باله سینه ای شروع می شود و دارای ۳ شعاع سخت غیر منشعب و ۱ الی ۹ شعاع منشعب می باشد. باله مخرجی دارای پایه ای طویل تر و شامل ۳ شعاع سخت و غیر منشعب و ۱۰ الی ۱۱ شعاع منشعب است. عرض بدن ۲۳ الی ۳۶ درصد طول بدن را تشکیل می دهد. دهان نسبتاً کوچک، مورب و تقریباً انتهایی و فاقد سیبلیک است و نوک شکاف دهان بالای حاشیه تحتانی چشمها قرار دارد و حفره دهان نیمه هلالی می باشد.

دندان های حلقی یک ردیفی است و ۶ دندان سمت چپ و ۵ دندان سمت راست است (۵-۶) ندرتاً ۵-۵ و ۶-۶ نیز گزارش شده است.

فلس ها از نوع سیکلوئید و نسبتاً بزرگ می باشد و با توجه به اینکه این ماهی در سواحل جنوب شرقی دریای خزر دارای مهاجرت جهت تخم ریزی به رودهایی چون قره سو و گرگان رود، می باشد و در این زمان از تغذیه کمتر برخوردار می باشد، دواير رشد در فلس ها نزدیک تر می شود لذا از روی دواير رشد می توان به سن این ماهی پی برد. خط جانبی تا انتهای بدن ادامه دارد و در ناحیه شکم انحنا دارد. تعداد فلس ها در روی خط جانبی در منابع مختلف، به صورت های متفاوت بیان شده ولی عمدتاً ۴۸-۴۴ عدد است.

معمولاً ۳-۴،۵ سری از فلس ها در زیر خط جانبی می باشند و ۷-۸،۵ سری از فلس ها در بالای خط جانبی می باشند.

تعداد کمان های آبششی در هر آبشش ۴ عدد و هر کمان آبششی دارای حدود ۱۰ خار آبششی است. تعداد مهره های پشتی معمولاً بین ۳۰ تا ۴۱ عدد و در اکثر موارد ۳۹ عدد است و مهره های دوم و سوم به آسانی جدا می شوند.

رنگ ماهی: پشت ماهی متمایل به آبی یا ترکیبی از رنگهای سبز و قهوه ای است. باله های شکمی و مخرجی به رنگ نارنجی تا قرمزپررنگ هستند. باله های سینه ای و دمی متمایل به قرمز ولی قسمت فوقانی باله دمی تیره می باشد. پهلوها نقره ای اما در ماهیان بزرگتر متمایل به زرد است رنگ عنیبه چشم از زرد تا قرمز متغیر است و معمولاً دارای یک خال تیره (قرمز) در زیر مردمک چشم می باشد. عمدتاً ماهیانی که صید می شوند ۴-۵ سال سن دارند ولی سن آنها تا ۱۲ سال نیز گزارش شده است ماده ها در شرایط مساوی بزرگتر از نرها هستند.

۳-۲-۳- پراکنش جغرافیایی ماهی کلمه

این گونه از توان سازگاری بالایی برخوردار است و در رودخانه ها و دریاچه های نواحی پست زندگی می کند. اصولاً آبهای با جریان بطئی را ترجیح می دهد اما در نهلهایی با جریان سریع مشاهده گردیده است. درجات حرارت بالا و پایین را تحمل می کند و در آبهای با مقادیر نسبتاً اندک اکسیژن به زندگی خود ادامه می دهد در نتیجه در سراسر اروپا در کانال ها و آبهای راکد ایجاد شده توسط بشر همانند گودالهای شنی و دریاچه های مصنوعی، منتشر گردیده است. این ماهی آبهای لب شور را نیز تحمل می کند و در مناطق با سالینیته پایین در بالتیک زندگی می کند. کلمه در شرایط مناسب تا دوازده سال زندگی می کند.

این گونه به استثناء شبه جزیره لیبول، ایتالیا، یونان، نروژ و اسکاتلند در سایر نقاط اروپا متداول می باشد.

در سواحل ایران نیز دو منطقه برای ماهی کلمه مساعدتر است یکی مرداب انزلی و دیگری خلیج گرگان، حداکثر عمق خلیج گرگان ۶-۷ متر است و عمق متوسط آن در ایستگاههای مطالعاتی ۱،۶ متر بوده که بخوبی جوابگوی نیاز کلمه خواهد بود.

۴-۲-۳- صید

با توجه به ممنوعیت صید به روش دام گستر، اکنون در سواحل جنوبی دریای خزر پره مهمترین وسیله صید این ماهی است. قطر چشمه تورها برابر ضوابط و مقررات شیلات ۲۸-۳۰ میلیمتر است لذا ماهیان نابالغ براحتی از چشمه تور عبور نموده و در دراز مدت این امید می رود که ذخایر این ماهی در دریای خزر بخصوص سواحل جنوبی افزایش یابد.

صیادان کهن سال در بندرترکمن میزان صید این ماهی را در گذشته بسیار دور به مراتب بیش از امروز ذکر می کنند آمار نیز بیانگر صید بالای ماهی کلمه در گذشته است بطوری که در سال ۱۳۱۴-۱۵ صید کلمه در خلیج گرگان ۲۶۸۱ تن، معادل ۸۵,۶٪ کل صید کلمه در سواحل ایران و در سال ۱۳۲۳-۲۴ صید این ماهی در خلیج گرگان ۲۰۰۳ تن، معادل ۹۴,۹٪ کل صید کلمه در سواحل ایران بوده است. همه ساله صید این ماهی تقریباً کاهش داشته بطوری که از سال ۱۳۵۷ تا ۱۳۶۲ در سواحل ایران فقط ۳۱۷ کیلوگرم صید ماهی کلمه ثبت شده است.

۵-۲-۳- مهاجرت

بطور کلی دو نوع مهاجرت برای کلمه شناخته شده است:

۱- مهاجرتی که برای تولید مثل از دریا به رودخانه ها صورت می گیرد: بنظر می رسد درجه حرارت آب و طول روز در این نوع مهاجرت نقش داشته باشند.

بطور کلی ماهی های کلمه که در قسمت شمالی دریای خزر زیست می کنند در فصل تخمیزی، زمانی که دمای آب کمتر از ده درجه سانتی گراد است به رودهایی چون ولگا، اورال، امبا و ترک مهاجرت می کنند و در سواحل جنوبی به رود اترک و رودهای گرگانرود، قره سو، تالار لاریم، شلمانرود و مرداب انزلی مهاجرت می کنند. در هنگام مهاجرت به رودخانه ابتدا ماهیان بزرگتر وارد رودخانه می شوند در اواخر فصل تخمیزی نرها در رودخانه در اکثریت هستند.

۲- مهاجرت برای زمستان گذرانی: در اواخر تیر ماه، ماهیان کلمه در دسته های متفرق در آبهای دور از ساحل در اعماق ۶-۵ متر پدیدار می گردند. در ماههای شهریور و مهر به سواحل نزدیک می شوند. در ابتدا دسته های

متفرق هستند ولی از مهر ماه این دسته ها بهم می پیوندند و گله های متراکم، بزرگ و انبوهی را تشکیل می دهند. این گله ها به آهستگی به دلتای رودها نزدیک می شوند. هنگامیکه به عمق یک الی یک و نیم متر رسیدند به شکل توده های انبوهی در گودیها به خواب زمستانی فرو می روند و نهایتاً در حوالی اسفند ماه وارد رودخانه می شوند.

دو نوع مهاجرت نیز برای نوزاد ماهی کلمه شناخته شده است:

الف: لاروها در غروب بالا می آیند و در حوالی سپیده دم پایین می روند.

ب: در غروب پایین می روند و در سپیده دم صعود می کنند.

هدف از مهاجرت عمودی این است که خطر صید نوزادان را به حداقل می رساند

۶-۲-۳- مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۶-۲-۳- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

Anger و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از ۴ لوکوس مایکروساتلایتی به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی آزاد جویباری (*Salvelinus fontinalis*) در پنج دریاچه که به فاصله ۳ تا ۲۳ کیلومتر از یکدیگر در پارک ملی Manricie کانادا قرار دارند پرداختند و تنوع ژنتیکی بالایی را بین جمعیتها مشاهده کردند.

Rico و همکاران (۱۹۹۵) به بررسی ساختار ژنتیک ماهی Whiting (*Merlangius merlagu*) در ۵ منطقه در شمال شرقی آمریکا با استفاده از ۶ لوکوس مایکروساتلایتی پرداختند ایشان انحراف از تناسب ژنوتیپی هاردی-واینبرگ را در سه لوکوس و سطح بالای هموزیگوسیتی را در هر ۵ منطقه مشاهده کردند و تمایز ژنتیکی پایین در این بررسی را ناشی از مهاجرت بین مناطق دانستند. بر اساس پراکنش فراوانی تمام آللهای مایکروساتلایتی که به صورت دو به دو مورد مقایسه قرار گرفتند نتایج بررسی نشان داد که جمعیتهای ماهی Whiting در منطقه شمال شرقی آتلانتیک تفاوت و تنوع جغرافیایی از خود نشان می دهند.

Beacham و همکاران (۱۹۹۸) به بررسی ساختار جمعیتی ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) در رودخانه Conne نیوفلاند در طی ۴ سال نمونه برداری و مصبهای Twillick Brook و Bernald Brook در طی دو سال نمونه برداری،

با استفاده از ۴ لوکوس مایکروساتلایتی پرداختند. مطالعه فوق قادر نبود جمعیت‌های احتمالی را از هم جدا کند ولی جمعیت رودخانه Conne را کاملاً از جمعیت‌های مصب‌ها متفاوت تشخیص داد.

O' Reilly و همکاران (۱۹۹۹) به بررسی ساختار جمعیتی ماهی دندان دار (*Dissostichus eleginode*) در سواحل شرقی و غربی آمریکای جنوبی با استفاده از ۱۱ لوکوس مایکروساتلایتی پرداختند و به ناهمگونی نمونه‌ها در دو منطقه پی بردند.

Shaw و همکاران (۱۹۹۸) از دو تکنیک RFLP و ریزماهوره، برای ارزیابی جمعیت‌های شگ ماهی اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد که نشانگر ریز ماهواره، برای تعیین جمعیت بهتر از RFLP است اما اطلاعات کمتری در مورد سطح اختلاف جمعیت‌ها ارائه می‌دهد. وی عدم اختلاف بین گروه‌های مختلف را ناشی از مهاجرت تغذیه ای دانست.

Susnik و همکاران (۲۰۰۱) که به ساختار جمعیت Grayling (*Thymallus thymalus*) در رودخانه Soca در اسلوانی با استفاده از ۵ لوکوس مایکروساتلایتی پرداختند و نتوانستند با این روش جمعیت‌های Adriatic و Denubian را در این رودخانه مشخص کنند.

Smith و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از آلوزایم‌ها و ۸ لوکوس مایکروساتلایتی به بررسی ساختار جمعیتی ماهی دندان دار (*Dissostichus eleginoides*) در بخش جنوبی اقیانوس اطلس، آرام و هند پرداختند داده‌های آلوزایمی تمایز ژنتیکی کمی را در بین ماهیان دندان دار اقیانوس اطلس جنوبی نشان داد و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را تایید کرد لکن داده‌های مایکروساتلایتی تنوع ژنتیکی مشخصی را نشان داده و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را رد کرد.

Ruzzante و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ۵ لوکوس مایکروساتلایتی به بررسی ساختار جمعیتی روغن ماهی آتلانتیک (*Gadus morhua*) در لابرادر نیوفلاند پرداختند و به این نتیجه رسیدند که کادهای ساکن خلیج گیلبرت لابرادر از نظر ژنتیکی از کادهای دور از ساحل شمال شرقی نیوفلاند و نزدیک ساحل خلیج Trinity قابل تشخیص می‌باشد.

Adams و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از تکنیک‌های Capture & Recapture و Microsatellite به بررسی ساختار جمعیتی قزل آلاهی رودخانه‌ای (*Salvalinus fontinallis*) دریاچه‌های حوضه آبریز خلیج هند پرداختند و اظهار

داشتند که علی رغم عدم وجود موانع فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه‌ها، هر دریاچه جمعیت تولید مثل مجزائی دارد. حتی داده‌های نشانه گذاری هم دلالت بر مهاجرت جزئی و عدم مهاجرت بین دریاچه‌ها و همچنین مشاهده کردند که سطح هتروزیگوسیتی جمعیت‌های این گونه در این منطقه نسبت به سایر مناطق بالاتر است.

Appleyard و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر ماهی تن (*Thunnus obesus*) در سواحل شرقی و غربی اقیانوس هند با استفاده از روش مایکروساتلایت و mtDNA پرداختند با توجه به نتایج بدست آمده، جدائی جمعیتی شرق و غرب اقیانوس هند را ضعیف اعلام کردند و نتوانستند فرضیه پان میکتیکی جمعیت ماهی تن چشم درشت را در اقیانوس هند رد کنند.

Herwerden و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از ۸ لوکوس مایکروساتلایتی به بررسی تنوع و ساختار جمعیتی Red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) در ۶ منطقه از ۳ ناحیه جغرافیائی (Great Barrier Reef) پرداختند. داده‌ها فقط یک جمعیت را مشخص کرد. آنها اظهار داشتند که بعید به نظر می‌رسد ذخایر ژنتیکی مشخص در GBR موجود باشد.

Birgitte و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ۶ لوکوس مایکروساتلایتی به آنالیز ۱۰ جمعیت اردک ماهی شمال (*Esox Lucius*) از اروپا و شمال آمریکا پرداختند و تنوع ژنتیکی بسیار پایین اردک ماهی شمال در داخل جمعیت‌های اروپایی را به جهت کاهش جمعیت موثر در مقیاس زمانی چند هزار ساله که در رابطه با حوادث عصر یخبندان و بعد آن می‌باشد نسبت دادند.

Smith و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از ۴ لوکوس مایکروساتلایتی و روش PCR-RFLP به مطالعه ساختار ژنتیکی تاس ماهی سفید در شاخه اصلی رودخانه Fraser و یکی از انشعابات فرعی آن، رودخانه Nechko، پرداختند. اطلاعات به دست آمده حاکی از وجود چهار منطقه جغرافیائی زیستی در رودخانه Fraser می‌باشد (ناحیه پایینی و پایین Hell's Gate، ناحیه میانی بین Hell's Gate و کیلومتر ۵۵۳ رودخانه Fraser می‌باشد، بالاتر از تلاقی Nechko و ناحیه رودخانه Nechako) که این مناطق به علت وجود موانع مهاجرتی تاس ماهی سفید می‌باشند. مطالعه mtDNA ۹ ترکیب هاپلو تپیی را نشان می‌دهد و تنها اختلاف نوکلئوتیدی بین Nechako و منطقه بالائی Fraser وجود دارد.

دو روش بکار رفته نتایج یکسانی را نشان می‌دهند با این تفاوت که مارکر مایکروساتلایت تنوع بالاتری را نشان می‌دهد.

Wirgian و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی جمعیت‌های زیرگونه تاس ماهی اطلس با استفاده از روشهای مایکروساتلایتی و تعیین توالی mtDNA پرداختند. هر دو روش سطح بالائی از تنوع ژنتیکی را در ماهیان سواحل اطلس نشان داد و در نمونه‌های کانادائی تنوع ژنتیکی وجود نداشت. آنها اظهار داشتند موتاسیون و تغییرات تکاملی در جایگاههای Microsatellite بیشتر از mtDNA می‌باشد. هر دو روش بطور واضح جمعیت‌ها را تفکیک می‌کند اما آنالیز Microsatellite تفاوت جغرافیائی بین جمعیت‌های سواحل جنوبی آمریکا را بخوبی نشان می‌دهد. Zhou و همکاران (۱۹۹۹) به مطالعه تغییر پذیری ذخایر مولدین تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis* Gray) در طی ۳ سال نمونه برداری در رودخانه یانگ تسه در ۴ لوکوس مایکروساتلایتی پرداختند. تمایز ژنتیکی مشخصی بین نمونه‌هایی که در طی سالهای متفاوت جمع آوری شده بود گزارش نشد و نتیجه‌گیری گردید که فقدان تنوع در بین گروههای سالهای متفاوت میتواند حاکی از ثابت ماندن تنوع و پایداری ژنتیکی در حیوانات با طول عمر طولانی باشد.

Zhou و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) ۲۵ پرایمر مایکروساتلایت تاس ماهی دریاچه‌ای را استفاده کردند که ده پرایمر به خوبی تنوع را نشان داد. میزان تنوع ژنتیکی بالائی در نمونه‌های بالغ و جوان بدست آوردند. این روش تنوع بالائی را نسبت به آلوزایم‌ها و RAPD در جمعیت رودخانه یانگ تسه نشان داد.

Norris و همکاران (۱۹۹۹) پراکنش ژنتیکی و وجود تنوع ژنتیکی بین و درون ۳ جمعیت ماهی آزاد پرورشی و ۴ جمعیت وحشی را در منطقه ایرلند و نروژ با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره مورد آنالیز قرار دادند و میزان بالایی از چند شکلی را در همه جمعیت‌ها مشاهده کردند. به طوری که میزان متوسط تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۱۷/۵ و ۰/۷ بدست آوردند. ماهی آزاد پرورشی تنوع ژنتیکی کمتری را نسبت به نوع وحشی در رابطه با تنوع آلی از خود نشان داد ولی از لحاظ هتروزیگوسیتی تفاوت چندانی نداشتند.

Banks و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از نشانگر ریز ماهواره، وجود ۵ زیر جمعیت مجزا را در ماهیان آزاد چینوک با استفاده از آنالیز داده‌های مایکروساتلایت در ناحیه مرکزی کالیفرنیا نشان دادند.

۲-۶-۲-۳- مطالعات انجام شده در ایران

Rezvani Gilkoliaie در سال ۱۹۹۷ با استفاده از روش RAPD به مطالعه گونه‌های خاویاری دریای خزر پرداخت و تفاوت معنی داری در جایگاه‌های ژنی RAPD گروه‌های فیل ماهی متعلق به مناطق غربی و شرقی جنوب دریای خزر مشاهده کرد. در این مطالعه اینگونه نتیجه گرفته شد که تاس ماهی ایرانی و فیل ماهی دریگ کلاستر قرار دارند. ماهی شیپ و اوزون برون در کلاستر جداگانه دیگر قرار گرفتند و تاس ماهی روس خویشاوندی نزدیکی با فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی داشت.

Rezvani Gilkoliaie در سال ۲۰۰۰ مطالعاتی بر روی تنوع میتوکندری جمعیت‌های تاس ماهی روسی در جنوب دریای خزر انجام داده، از روش RFLP و ژن ND5/6 استفاده کرد و نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در پراکنش هاپلوتیپ‌ها در شرق و غرب سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که دلیل آن را پراکنش ژنتیکی عنوان نمودند.

قرائی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RAPD به تشخیص مولکولی دو گونه تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) و تاس ماهی روسی (*A. guldenstaedtii*) پرداخت. با استفاده از این روش تاس ماهی ایرانی به عنوان یک گونه مستقل از تاس ماهیان روسی تفکیک گردید.

کیوان شکوه (۱۳۸۱) امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی با استفاده از روش PCR-RAPD را مورد بررسی قرار داد لکن با استفاده از این روش نتوانست جنسیت این ماهی را تشخیص دهد و نتایج نشان داد که احتمالاً کروموزوم‌های جنسی در فیل ماهی وجود نداشته و در صورت موجود بودن نقاط متمایز بسیار کمی بر روی کروموزوم‌های مذکور قرار دارد.

عطائی (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی در رودخانه سفید رود، جنوب شرقی و غربی دریای خزر را با استفاده از PCR-RFLP مورد بررسی قرار داد. نتایج مطالعات فوق مشخص کرد که جمعیت‌های مورد مطالعه همگن بودند.

قاسمی (۱۳۸۲) به مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش RFLP پرداخت. نتایج بررسی نشان داد که جمعیت ماهی شیپ رودخانه اورال از سواحل جنوبی دریای خزر متفاوت بوده و آنزیم *Cfr13I* به عنوان یک مارکر مولکولی جهت تمایز این دو

جمعیت معرفی گردید ولی جمعیت‌های احتمالی سواحل جنوبی دریای خزر به خوبی از جمعیت‌های شمالی قابل تفکیک نبودند.

شعبانی (۱۳۸۴) با بررسی دو ناحیه D-LOOP و ND5/6 در روی میتوکندری توانست ازون برون ولگا و حوضه جنوبی خزر را از هم جدا کند و آنزیم برش دهنده *HinfI* با ژنوتیپ C را به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی ماهیان رودخانه سفید رود و آنزیم برش دهنده *MboI* با ژنوتیپ B یا C و آنزیم *HaeIII* با ژنوتیپ B را بعنوان مارکر مولکولی ازون برون رودخانه ولگا معرفی نمود. ولی اختلاف معنی داری بین نمونه‌های جمع آوری شده در بخش جنوبی دریای خزر مشاهده نگردید.

اردلان در سال ۱۳۸۱ به مطالعه فیلوژنی *Panilarus homarus*, *P. polyphagus*, *Thenus orientalis*, *Scyllarides squammosus* از خرچنگهای دراز دریائی آبهای ایران با استفاده از روش PCR-RFLP پرداخت و بالا بودن میزان χ^2 ($\chi^2=72$) نشان دهنده آن دانست که این روش روش مناسبی جهت جدا نمودن گونه‌های مختلف از یکدیگر می‌باشد و کلیه کلادیوگرامهای حاصل از آنالیز داده‌های ریختی و مولکولی با روش Exhaustive تک نیائی بودن این گونه را تایید کرد.

محمدی (۱۳۸۱) با استفاده از مطالعات ریختی (مورفومتريک و مریستیک) و مولکولی به روش PCR-RFLP ساختار جمعیتی شاه میگوی دریای عمان (*Panilarus homarus*) در سواحل استانهای سیستان و بلوچستان را مورد بررسی قرار داد. مطالعات مولکولی ناهمگنی ژنتیکی را بین مناطق مختلف نمونه برداری نشان نداد. مطالعات ریختی با نتایج حاصل از مطالعات مولکولی سازگار بود اگر چه از نظر ریختی به نظر می‌رسد که نمونه‌های مورد مطالعه هیبرید بین دو زیر گونه از گونه *Panilarus homarus* باشند. اما مطالعات مولکولی با مقایسه هاپلوتیپ‌ها نشان داد که این نمونه‌ها دارای شباهت بیشتری به زیر گونه *Panilarus homarus mejasculpta* می‌باشد.

اسدیان (۱۳۸۲) انگل لرنه آسپیریناسه آ و انگل لرنه آفارینگودینی را با استفاده از روش RAPD مورد ارزیابی قرار داد و اعلام نمود که لرنه آفارینگودینی یک گونه مستقل از لرنه آسپیریناسه آ می‌باشد.

خارا (۱۳۸۳) با بررسی ناحیه‌ای در میتوکندری با طول ۳۵۰۰ جفت باز توانست جمعیت وارداتی سیم از آذربایجان را از جمعیت‌های بومی جدا کند با استفاده از این روش میزان تنوع درون گونه‌ای جمعیت سیم تالاب انزلی و دریای خزر صفر بود و در نمونه‌های ارس خیلی پایین بود که دلیل آن کاهش ذخایر این گونه عنوان گردید.

۳-۳- مواد و روشها

۳-۳-۱- نمونه برداری

در این بررسی پس از مطالعه اولیه و تعیین ایستگاه ۳-۵ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله سینه‌ای و باله پشتی ۹۰ عدد از ماهیهای کلمه صید شده در صیدگاه های شیلات استان گلستان (خلیج گرگان ۳۰ عدد)، صیدگاه های استان گیلان (بندر انزلی ۳۰ نمونه) و همچنین نمونه های ماهی کلمه رودخانه ولگا (۳۰ نمونه) که در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری موجود بودند استفاده شد. نمونه برداری به وسیله سالیک و تورهای گوشگیر در ایستگاههای مختلف صورت گرفت. پس از برش قطعه کوچکی از باله، درون میکروتیوپ های حاوی الکل اتیلیک مطلق قرار داده شد و در آنها محکم بسته شد.

۳-۳-۲- استخراج DNA و الکتروفورز

استخراج DNA و الکتروفورز مشابه بخش ۱، انجام می گیرد و PCR با استفاده از پرایمرهای آمده در جدول زیر با ترکیب محلول واکنش و برنامه حرارتی وزمانی دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر به اجرا درآمده است.

۳-۳-۳- انتخاب پرایمر (آغازگر)

بعد از مطالعه توالی ژنومی این گونه توسط جستجوی اینترنتی در بانک ژن ده جفت پرایمر بطور ۱۸-۲۴ باز برای دوسر ژن طراحی و سپس مورد آنالیز کامپیوتری با نرم افزار و قرار گرفت و نهایتاً به شرکت برای سنتز سفارش داده شد.

رقیق کردن پرایمرها براساس OD و اطلاعات داده شده در کاتالوگ پرایمرها صورت گرفت. غلظت پرایمرها براساس نانومول داده شده بود، ابتدا پودر

جدول 1-3- مشخصات پرایمر های مورد استفاده در جایگاههای مختلف مایکروساتلایتی ماهی کلمه (Thomas et al., 2004)

دمای اتصال °C	توالی پرایمر	نام پرایمر
60	F: 5' -GCA GGA GCG AAA CCA TAA AT-3' R: 5'-AAA CAG GCA GGA CAC AAA GG-3'	SYP2
60	F: 5'-CAC GGG ACA ATT TGG ATG TTT TAT-3' R: 5' -AGG GGG CAG CAT ACA AGA GAC AAC-3'	SYP4
53	F: 5' -ATT TTT AGG AGT GAT GTT CAG CAT-3' R: 5' -CAA GTG TGT CAT TGA GGA AGT GAG-3'	SYP5
57	F: 5' -TTA CAC AGC CAA GAC TAT GT-3' R: 5' -CAA GTG ATT TTG CTT ACT GC-3'	SYP6
61	F: 5' -GTC CAG ACT GTT CAT CAG GAG-3' R: 5'-GAG GTG TAC ACT GAG TCA CGC-3'	MFW1
63	F: 5' -CAC ACC GGG CTA CTG CAG AG-3' R: 5' -GTG CAG TGC AGG CAG TTT GC-3'	MFW2
62	F: 5' -AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC-3' R: 5' -CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA-3'	CA1
63	F: 5' -GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC-3' R: 5' -TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG-3'	CA2
59	F: 5' -TTG AGT GGA TGG TGC TTG TA-3' R: 5' -GCA TTG CCA AAA GTT ACC TAA-3'	CA3
60	F: 5' -GTG AAG CAT GGC ATA GCA CA-3' R: 5' -CAG GAA AGT GCC AGC ATA CAC-3'	CA4

۴-۳-۳- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

مواد مورد استفاده: آنزیم DNA Taq پلیمرز، $MgCl_2$ در غلظت ۵۰mM، PCR Buffer در غلظت $10 \times$ ، آب مقطر تزریقی، DNA ژنومی استخراج شده، پرایمرهای ماکروساتلایتی برای هر نمونه یک و یال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید، سپس ترکیبات طبق جدول ۲-۳ با مقادیر مشخص شده به آن اضافه و توسط سمپلر خوب بهم زده و به مدت ده ثانیه سانتریفیوژ گردید تا محتویات لوله ها ته نشین شود.

۵-۳-۳- بهینه کردن PCR و پروفیل‌های حرارتی آن

برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید (جدول ۳-۳). در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) غلظت $MgCl_2$ ، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs بهینه سازی گردید.

در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ تا ۸ درجه سانگراد انتقال می‌دهیم تا برای آزمایش‌های بعدی که شامل انتقال بر روی ژل آگارز ۲٪ برای سنجش وجود و کیفیت محصول PCR و پلی‌اکریل آمید به منظور ایجاد باندهای مورد نظر می‌باشد در دسترس باشد. پس از آزمایش‌های فوق، محصولات PCR را به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال می‌دهیم.

۲- ثبت تصاویر و سنجش وزن مولکولی محصول PCR و امتیازدهی باندها و آنالیز آماری مطابق بخش ۱ به اجرا در آمده است.

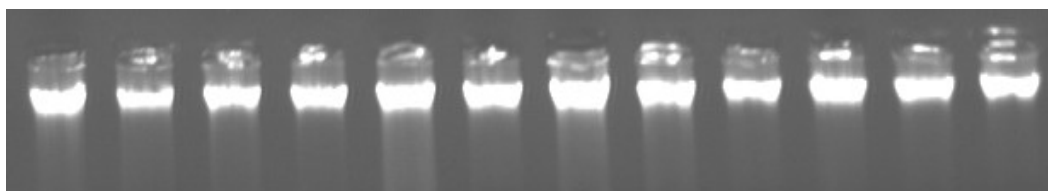
۴-۳- نتایج

۴-۳-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کمیت و کیفیت DNA به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

۴-۳-۱-۱- روش الکتروفورزی

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA های استخراج شده از باله ماهی کلمه به روش فنل- کلروفورم از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشند. البته اندکی آلودگی RNA نیز در نمونه های DNA استخراجی مشاهده شد. (شکل ۳-۱)



شکل ۳-۲۷- نمونه های استخراج DNA از ماهی کلمه به روش فنل- کلروفورم بر روی ژل آگارز ۱٪

۴-۳-۱-۲- اسپکتروفتومتری DNA

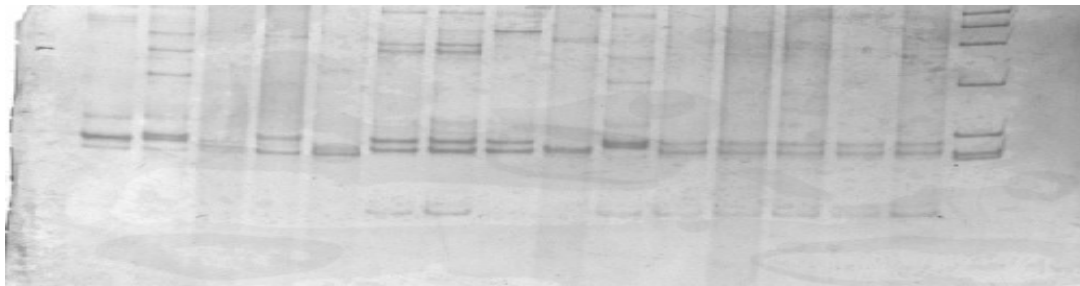
میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm بوسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت می باشد. نمونه هایی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی بر اساس فرمول محاسبه شده در کلیه ۹۰ نمونه بین ۱۵۰-۲۵۰ ng/l بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA، در غلظت ۱۰۰ ng/l مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۴-۳- نتایج حاصل از PCR

محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد که نتایج زیر به دست آمد که در هر ژل آورده شده به ترتیب از چپ به راست ۵ نمونه از ایستگاه خلیج گرگان، ۵ نمونه از بندر انزلی و ۵ نمونه از دلتای ولگا می باشد و در انتهای ژل مارکر تزریق شده است.

۱-۲-۴-۳- جایگاه Lco3

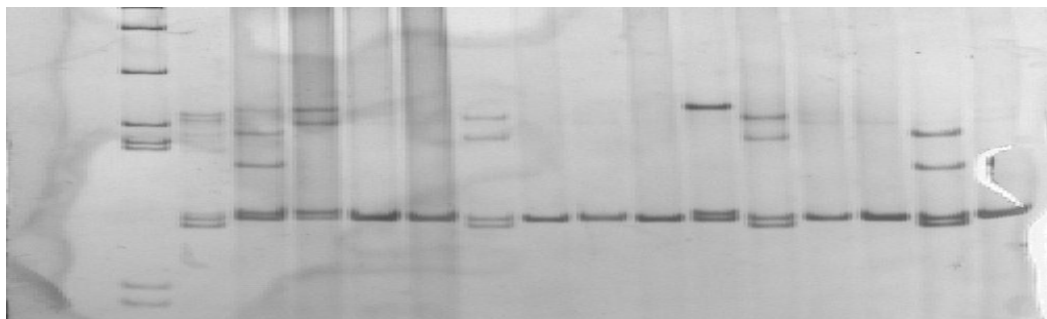
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۰ درجه سانتی گراد مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۹۰ نمونه مورد مطالعه ۵ الی و دامنه اندازه الی بین ۲۵۶-۲۸۴ جفت باز بود (شکل ۲۸-۳).



شکل ۲۸-۳ محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از پرایمر Lco1 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۲-۲-۴-۳- جایگاه Lco2

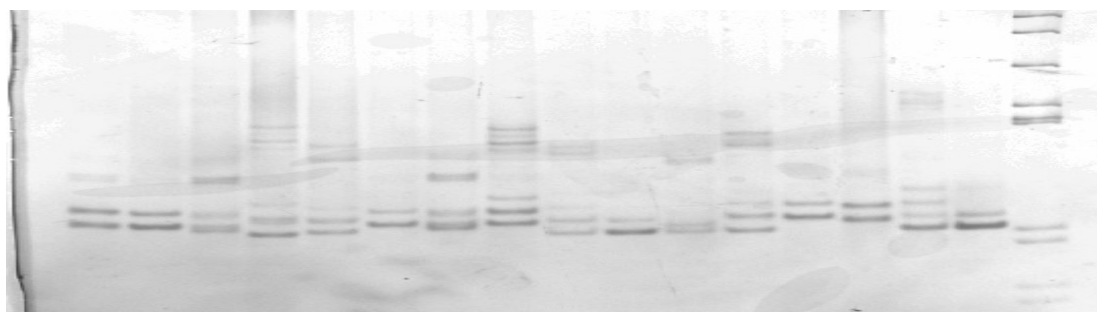
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۵۷ درجه سانتی گراد مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۹۰ نمونه مورد مطالعه ۵ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۰۴-۱۲۰ جفت باز بود (شکل ۲۹-۳).



شکل ۲۹-۳ محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از پرایمر Lco2 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۳-۴-۲-۳- جایگاه Ca1

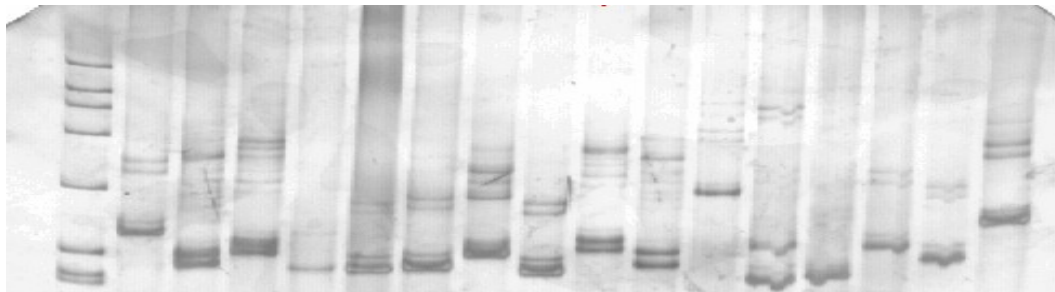
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۲ درجه مناسب ترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۹۰ نمونه مورد مطالعه ۸ الی و دامنه اندازه الی بین ۱۰۰-۱۲۸ جفت باز بود (شکل ۳۰-۳)



شکل ۳۰-۳ محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از پرایمر Ca1 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

۳-۴-۲-۴- جایگاه Ca2

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای ۶۳ درجه سانتی گراد مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمده و تعداد الی مشاهده شده برای این جایگاه در ۹۰ نمونه مورد مطالعه ۱۴ الی و دامنه اندازه الی بین ۲۲۸-۲۹۶ جفت باز بوده است (شکل ۳۱-۳)



شکل ۳-۳۱ محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از پرایمر Ca2 پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

در مجموع از ۱۰ جفت پرایمر مایکروساتیلیتی بررسی شده، ۴ جایگاه ژنی تولید باندهای پلی مورفیسم نمودند.

جدول ۳-۴ خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاههای پلی مورف

نام جایگاه	توالی	محدوده باندی (جفت باز)	دمای اتصال درجه سانتی گراد	تعداد ال مشاهده شده
Lco3	F: 5'-GCA GGA GCG AAA CCA TAA AT- 3' R: 5'-AAA CAG GCA GGA CAC AAA GG- 3'	۲۸۴-۲۵۶	۶۰	۵
Lco5	F: 5'-TTA CAC AGC CAA GAC TAT GT- 3' R: 5'-CAA GTG ATT TTG CTT ACT GC- 3'	۱۲۰-۱۰۴	۵۷	۵
Ca1	F: 5'-AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC- 3' R: 5'-CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA- 3'	۱۲۸-۱۰۰	۶۲	۸
Ca2	F: 5'-GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC- 3' R: 5'-TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG- 3'	۲۹۶-۲۲۸	۶۳	۱۴

۳-۴-۳- الهای پلی مورف (چند شکلی)

مطابق با تعریف پلی مورف بودن (فراوانی الی کمتر از ۹۹ درصد است)، تمام جایگاه های مورد آنالیز پلی مورف هستند. فراوانی الی جایگاههای مورد مطالعه در جدول ۳-۴ آمده است. در لوکوس Lco3 حداکثر فراوانی الی ۱/۰۵ مربوط به ال A و حداقل فراوانی ۰/۱۱۷ مربوط به ال C میباشد. در لوکوس Lco5 حداکثر فراوانی ال ۱/۴۶ مربوط به ال B و حداقل فراوانی ۰/۰۸۴ مربوط به ال E است. در لوکوس CA1 حداکثر فراوانی الی ۰/۹ مربوط به ال C و حداقل فراوانی ۰/۰۶۷ مربوط به ال A می باشد. در لوکوس CA2 حداکثر فراوانی الی ۰/۵۱۷ مربوط به ال A و حداقل فراوانی ۰/۰۳۳ مربوط به ال B می باشد. اندازه و فراوانی الیها در چهار جایگاه مختلف پلی مورفیک در ماهی کلمه در جداول ۳-۵ و ۳-۶ آمده است.

جدول ۵-۱۳ اندازه های آن (جفت باز) در چهار جایگاه مختلف پلی مورفیک در ماهی کلمه

جایگاه -ال	Lco3	Lco5	Ca1	Ca2
A	۲۵۶	۱۰۴	۱۰۰	۲۲۸
B	۲۶۸	۱۰۸	۱۰۴	۲۳۶
C	۲۷۲	۱۱۲	۱۰۸	۲۴۰
D	۲۷۶	۱۱۶	۱۱۲	۲۴۴
E	۲۸۰	۱۲۰	۱۱۶	۲۴۸
F			۱۲۰	۲۵۲
G			۱۲۴	۲۵۶
H			۱۲۸	۲۶۰
I				۲۶۴
J				۲۶۸
K				۲۷۲
L				۲۷۶
M				۲۸۰
N				۲۸۴

جدول ۶-۳ فراوانی الی در ۴ جایگاه مختلف پلی مورفیک در ماهی کلمه

جایگاه - ال	Lco3	Lco5	Ca1	Ca2
A	۱/۰۵۰	۰/۴۰۱	۰/۰۶۷	۰/۱۰۰
B	۰/۸۵۰	۱/۴۶۷	۰/۳۸۴	۰/۰۳۳
C	۰/۱۱۷	۰/۶۵۱	۰/۹۰۰	۰/۱۰۰
D	۰/۳۱۷	۰/۴۰۰	۰/۲۱۷	۰/۳۳۶
E	۰/۶۶۷	۰/۰۸۴	۰/۴۰۰	۰/۱۳۳
F			۰/۶۸۳	۰/۲۳۳
G			۰/۲۰۰	۰/۱۶۷
H			۰/۱۵۰	۰/۲۷۳
I				۰/۱۵۰
J				۰/۱۰۰
K				۰/۳۵۰
L				۰/۵۱۷
M				۰/۰۸۳
N				۰/۰۸۳

۴-۳-۴- تعداد ال واقعی (na) و موثر (ne)

معیار دیگری که برای تعیین میزان چند شکلی (پلی مورفیسم) جایگاهها استفاده می شود تعداد ال واقعی و موثر است. بیشترین تعداد ال مشاهده شده در جایگاه Lco3 و مربوط به نمونه های ناحیه خلیج گرگان (۱۳ ال) و کمترین مقدار آن در جایگاه Ca2 و مربوط به نمونه های دلتای ولگا می باشد (۱۴ ال). در مقایسه نواحی مورد مطالعه و با در نظر گرفتن تمامی جایگاهها، بیشترین و کمترین تعداد ال مشاهده شده به ترتیب مربوط به ناحیه خلیج گرگان (۷/۷۵ ال) و دلتای ولگا و بندرانزلی (۷ ال) می باشد. در میان نواحی نمونه برداری در جایگاههای چهارگانه بیشترین و کمترین تعداد ال موثر (۸/۹) و (۲/۶۹) به ترتیب در جایگاه Lco3 ناحیه انزلی و در جایگاه Ca2 ناحیه دلتای ولگا است. در میان مناطق نمونه برداری در جایگاههای چهار گانه، بیشترین و کمترین تعداد ال موثر ۵/۴۱ ال و ۴/۲۴ ال به ترتیب در نواحی خلیج گرگان و دلتای ولگا مشاهده شد (جدول ۷-۳).

جدول ۲-۳ تعداد الی واقعی و موثر ۴ جایگاه بررسی شده در ماهی کلمه

دلتای ولگا n=30		بندر انزلی n=30		خلیج گرگان n=30		جایگاه الی
na	ne	na	ne	na	ne	
۱۲	۸/۱	۱۱	۸/۹	۱۳	۸/۲۵	Lco3
۵	۲/۱	۵	۳/۵	۵	۳/۷۷	Lco5
۷	۳/۸۸	۷	۳/۶	۸	۵/۶۴	Ca1
۴	۲/۶۹	۵	۳/۶	۵	۴	Ca2
۷	۴/۲۴	۷	۴/۹	۷/۷۵	۵/۴۱	MEAN

۵-۴-۳-نوع ژنتیکی

نوع ژنتیکی درون جمعیتی با معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، برای هر ناحیه در هر جایگاه و به ازای هر جایگاه در تمامی نواحی مورد مطالعه قرار گرفت و دامنه Ho در بین نواحی نمونه برداری در جایگاههای چهارگانه ۰/۸۹-۰/۵۲ (۰/۷) میباشد که کمترین مقدار در نمونه های جمع آوری شده از ناحیه دلتای ولگا در جایگاه Lco5 و بیشترین مقدار از ناحیه بندر انزلی در جایگاه Lco3 می باشد. دامنه He نیز ۰/۸-۰/۲ (۰/۵) است که کمترین مقدار در جایگاه Lco5 مربوط به ناحیه خلیج گرگان ۰/۲ و بیشترین آن ۰/۸ در ناحیه دلتای ولگا مربوط به جایگاه Ca2 میباشد (جدول ۳-۸).

جدول ۳-۸ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)

برای نواحی نمونه برداری در هر جایگاه

دلتای ولگا		بندر انزلی		خلیج گرگان		جایگاه الی
Ho	He	Ho	He	Ho	He	
۰/۷۷	۰/۸۸	۰/۷	۰/۸۹	۰/۶۳	۰/۸۸	Lco3
۰/۲۳	۰/۵۲	۰/۴۳	۰/۷۱	۰/۲	۰/۷۳	Lco5
۰/۶۷	۰/۷۴	۰/۷۳	۰/۷۲	۰/۷۷	۰/۸۲	Ca1
۰/۸	۰/۶۳	۰/۷۳	۰/۷۲	۰/۶۳	۰/۷۵	Ca2

۶-۴-۳-شاخص شانون

چون حد نهایی هتروزیگوسیتی یک است و تفاوت میان مقادیر در چنین دامنه ای به خصوص برای نشانگرهای بسیار چند شکلی مثل ریزماهواره ها (که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند) به میزانی نمی باشد که اطلاعات دقیقی را بیان کند. بنابراین برای بزرگنمایی این مقادیر شاخص اطلاعات (H) shanon استفاده

شد. شاخص اطلاعات (H) shanon

برای همه ایستگاهها به ازای جایگاههای ۴ گانه محاسبه شده که نتایج حاصله را در جدول شماره ۹-۳ خلاصه گردیده است. بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه Lco3 در ناحیه خلیج گرگان (۲/۷۹) و کمترین مقدار آن جایگاه Lco5 در ناحیه دلتای ولگا (۰/۹۷۸) می باشد (جدول ۹-۳).

جدول ۹-۳ شاخص اطلاعاتی شانون Shanon index در نواحی نمونه برداری و جایگاههای مختلف

جایگاه ال	خلیج گرگان	بندرانزلی	دلتای ولگا
Lco3	۲/۲۷۹	۲/۲۶۷	۲/۲۷۸
Lco5	۱/۴۴۵	۱/۳۶۴	۰/۹۷۸
Ca1	۱/۸۹۲	۱/۵۷۴	۱/۵۷۸
Ca2	۱/۴۷۷	۱/۳۹۵	۰/۰۸۰

۷-۴-۳- تعادل هاردی - واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی نواحی مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون X^2 استفاده شد. ناحیه خلیج گرگان در جایگاه Lco3، انزلی در جایگاه Ca2 در تعادل بودند و بقیه نمونه ها در سایر جایگاهها انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند (جدول ۱۰-۳).

جدول ۱۰-۳ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در نواحی مختلف $p \leq 0/05$ *, $P \leq 0/001$ ***, ns no significant مختلف sig significant prob = احتمال. df = درجه آزادی.

Ca2	Ca1	Lco5	Lco3	df	جایگاه ناحیه
۱۰	۲۸	۱۰	۷۸	df	خلیج گرگان
۲۱/۰۰۴	۵۵/۴۸۶	۶۳/۴۴۷	۹۷/۵۷۱	X ²	
۰/۰۲۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۶۶	pro	
*	**	***	ns	sig	
۱۰	۲۱	۱۰	۵۵	df	بندر انزلی
۱۷/۶۱۷	۷۲/۴۵۰	۳۳/۳۷۳	۷۴/۱۱۹	X ²	
۰/۰۶۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۴۴	pro	
ns	***	***	*	sig	
۶	۲۱	۱۰	۶۶	df	دلتای ولگا
۲۰/۵۶۴	۴۹/۹۱۳	۳۱/۶۹۶	۱۱۷/۰۵۷	X ²	
**	***	***	***	pro	
۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	sig	

۸-۴-۳- تمایز بین مناطق نمونه برداری (Fit)^۱، نواحی هر منطقه (Fst)^۲ و نمونه های هر ناحیه (Fis)^۳

برای تعیین اختلاف بین نواحی و مناطق هر ناحیه و نمونه های درون هر منطقه از شاخصهایی همچون Fst, Fit

و Fis استفاده می شود (جدول ۱۱-۳، ۱۲-۳، ۱۳-۳).

جدول ۱۱-۳ میزان Fis محاسبه شده در نمونه های ایستگاههای نمونه برداری

جایگاه الل	خلیج گرگان	بندر انزلی	دلتای ولگا
Lco3	۰/۲۸	۰/۲۱۲	۰/۱۲۵
Lco5	۰/۷۲۸	۰/۳۹۳	۰/۵۵۱
Ca1	۰/۰۶۸	-۰/۰۱۶	۰/۱۰۲
Ca2	۰/۱۵۶	-۰/۰۱۵	-۰/۲۷۴
MEAN			۰/۱۹۷

¹- individual within the total population

²-sub population within the total population

³-individual within sub population

جدول ۱۲-۳ میزان Fst محاسبه شده برای نواحی نمونه برداری بر اساس فراوانی اللی

LD.I	خلیج گرگان	بندرانزلی	دلتای ولگا
خلیج گرگان	۰/۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۴۱
بندر انزلی		۰/۰۰	۰/۰۴۴
دلتای ولگا			۰/۰۰

جدول ۱۳-۳ میزان Fst محاسبه شده با کمک تست AMOVA برای نواحی نمونه برداری

LD.I	خلیج گرگان	بندرانزلی	دلتای ولگا
خلیج گرگان	۰	۰/۳	۰/۰۱
بندرانزلی	۰/۰۰	۰	۰/۰۱
دلتای ولگا	۰/۰۶۱	۰/۰۶۸	۰

نتایج بدست آمده از Fst، اختلاف معنی داری بین نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان نشان نداد ولی اختلاف نمونه های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P \leq 0.01$). تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۳ ناحیه و ۲ منطقه نمونه برداری، منطقه ایران (نواحی انزلی و ترکمن) و منطقه روسیه (ناحیه روسیه) و بر اساس تست AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) در سطح احتمال ۹۹٪ اختلاف بین مناطق نمونه برداری ($P \leq 0.01$ و ۷٪)، اختلاف بین نواحی هر منطقه نمونه برداری ($P \leq 0.01$) و ۰٪، اختلاف بین افراد درون ناحیه ($P \leq 0.01$) و ۹۳٪ محاسبه شد (جدول ۱۴-۳).

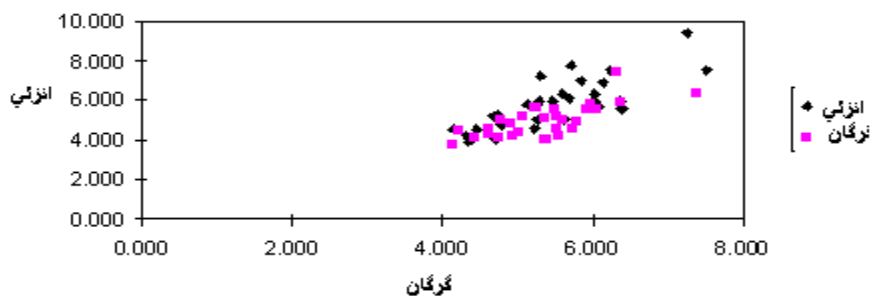
جدول ۱۴-۱۳ اختلاف بین مناطق نمونه برداری ، بین نواحی و بین افراد مختلف

احتمال	Stat	
۰/۰۱	٪۷	اختلاف بین مناطق نمونه برداری
۰/۰۱	٪۰	اختلاف بین نواحی هر منطقه نمونه برداری
۰/۰۱	٪۹۳	اختلاف بین افراد مختلف در هر ناحیه نمونه برداری

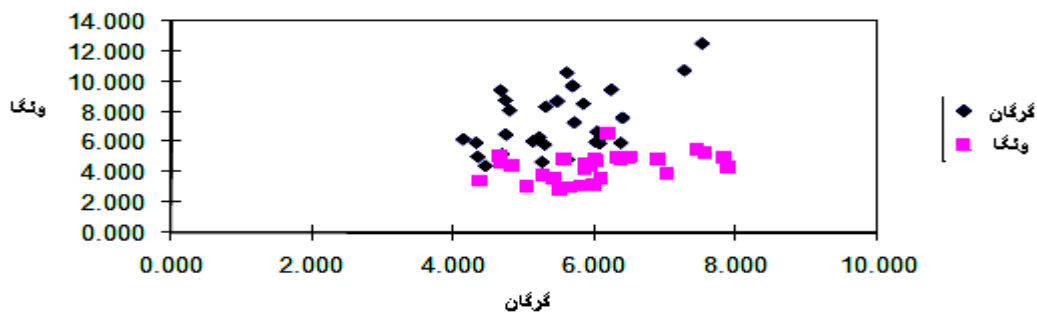
۹-۴-۳- نمودارهای سنجش جفت جمعیت‌ها

نمودارهای سنجش ژنتیکی جمعیت‌ها بصورت جفت آورده شده است. این نقشه‌ها نمایشی از درجه تفکیک ژنتیکی جمعیت‌ها را می‌سازند و روش مناسبی برای اندازه گیری اختلاف میان جمعیت‌ها به کمک نمودار و بر اساس تست‌های سنجش می‌باشند و اعداد نمایش داده شده روی محور بر حسب درجه تمایز است.

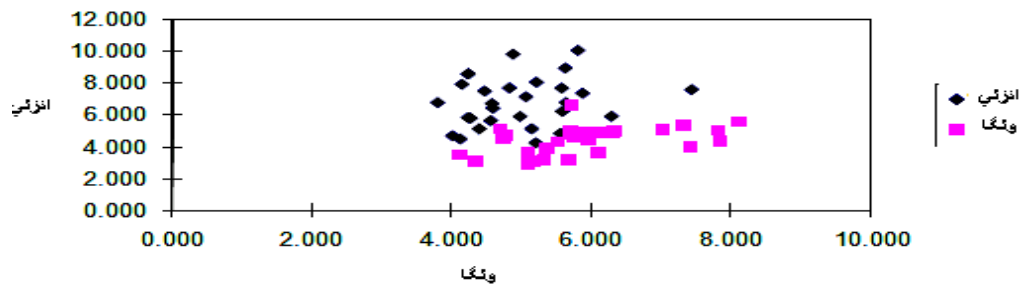
شکل ۳-۳۲. نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت بندرانزلی و خلیج گرگان



شکل ۳-۳۳. نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت خلیج گرگان و ونگا



شکل ۳-۳۴. نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت انزلی و ولگا



۱۰-۴-۳-شبهات و فواصل ژنتیکی

ماتریس فواصل و شبهات ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei, 1978) بوسیله نرم افزار GeneAlex محاسبه شده و در جدول ۳-۱۲ آمده است. بر اساس معیار (Nei, 1978) بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های بندرانزلی و دلتای ولگا (۰/۲۷) و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های انزلی و ترکمن (۰/۰۴۳) و بالطبع بیشترین شبهات ژنتیکی میان نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان (۰/۹۵۸) و کمترین شبهات بین نمونه های بندرانزلی و دلتای ولگا مشاهده گردید (۰/۷۶۵).

جدول ۳-۱۵ ماتریس فواصل ژنتیکی (زیر قطر) و شبهات ژنتیکی (بالای قطر) (Nei, 1978)

LD.I	خلیج گرگان	بندرانزلی	دلتای ولگا
خلیج گرگان		۰/۹۵۸	۰/۷۷۵
بندرانزلی	۰/۰۴۳		۰/۷۶۵
دلتای ولگا	۰/۲۵۵	۰/۲۷	

۳-۵- بحث

۳-۵-۱- هتروزیگوسیتی

در بررسی صفری (۱۳۸۵) با استفاده از روش میکروساتلایت و به کارگیری پرایمرهای به کار برده شده، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۰/۸۵) را در ماهی شیپ در مناطق مختلف نشان داد.

خوش خلق (۱۳۸۵) در مورد تاسماهی ایرانی دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در کل نمونه‌ها را بین ۰/۴-۰/۸۶ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۸۳-۰/۹۳ و در مورد تاسماهی روسی دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در کل نمونه‌ها را ۰/۷۹-۰/۹ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۳۹-۰/۸۵ بدست آورد. به نظر وی بالا بودن دامنه هتروزیگوسیتی در تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این گونه در مناطق مختلف نمونه برداری می‌باشد.

نوروزی (۱۳۸۶) در مورد ماهی ازون برون دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در کل نمونه‌ها را بین ۰/۲۳۱-۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۵۴۳-۰/۹۵۷ بدست آورد.

Skaala و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع آللی و شناسایی افراد در ماهی آزاد اتلانتیک (*Salmo salar*) پرورشی و وحشی با استفاده از آنالیز میکروساتلایت در نروژ با استفاده از ۱۲ مارکر میکروساتلایت با دقت بالایی توانستند نمونه‌های وحشی را از نمونه‌های پرورشی تشخیص دهند. در تمامی نژادهای پرورشی تنوع آللی و هتروزیگوسیتی به طور قابل ملاحظه ای پایین‌تر از جمعیت های وحشی بود که می‌تواند ناشی از اثر رانش ژنتیکی در افزایش تولید نسل در برنامه‌های تولید مثلی باشد.

Cui و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تنوع ژنتیکی *T. pseudommus* و *T. rubripes* در سواحل چین با استفاده از ۹ لوکوس میکروساتلایت توانستند سه جمعیت را از یکدیگر تفکیک نمایند. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی در این ۹ لوکوس ۰/۶۴۶ تا ۰/۹۴۷ بود، شاخص تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که کاهش معنی داری بین جمعیت‌های پرورشی در مقایسه با جمعیت‌های وحشی دیده می‌شود. دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر برای کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی ذکر شده است.

کیوان شکوه (۱۳۸۶) در بررسی تنوع ژنتیکی در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) با استفاده از روش میکروساتلایت اختلاف معنی داری در هتروزیگوسیتی های مشاهده شده در بین جمعیت نبوده ($P \geq 0.05$).

در بررسی حاضر، استفاده از روش مایکروساتلایت با استفاده از پرایمرهای بکار برده شده، سطح بالایی از تنوع (۰/۷) را در ماهی کلمه در مناطق مختلف نشان داد. همچنین تعداد آللهای مشاهده شده و موثر به ترتیب ۷/۲۵ و ۴/۸۵ می باشد.

تنوع آلی با حساسیت بیشتری نسبت به هتروزایگوسیتی می تواند اختلاف ژنتیکی را اندازه گیری کند زیرا تنگناهای ژنتیکی همانند وقایعی که موجب کاهش تعداد آلل می شود (بوئژه نمونه های کمیاب) بدون داشتن اثر قابل مشاهده روی هتروزایگوسیتی هنگامی که اندازه نمونه ها مشابه هستند، دیده می شود (Norris et al., 1999).

۲-۵-۳- تعادل هاردی-واینبرگ

Rico و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی ترکیب ذخایر *Merlangius merlangus* در آتلانتیک شمالی، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در ۳ لوکوس از ۴ لوکوس مورد مطالعه و بالا بودن مقدار هتروزایگوسیتی را در همه نمونه ها به جزء نمونه هایی که در تعادل هاردی-واینبرگ بودند مشاهده نموده و علت آن را برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی^۱ نتیجه گیری کردند.

در بررسی الگوهای جغرافیایی پراکنش ژنتیکی *Acipenser medirostris* با استفاده از ۶ لوکوس مایکروساتلایت توسط Israel و همکاران (۲۰۰۴) در ایالات متحده عدم تعادل معنی دار در نمونه های خلیج سان پابلو^۲ را ناشی از آن می داند که نمونه ها از یک ذخیره نیستند.

Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی *Acipenser sinensis* با استفاده از ۴ جفت پرایمر مایکروساتلایت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را ناشی از آلل های پوچ دانستند.

Dahle و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هوموزایگوس، آلل های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه ها می داند.

¹ Out Breeding

² San Pablo

صفری (۱۳۸۵) با استفاده از روش مایکروساتلایت در ماهی شپ انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را در تمام مناطق نمونه برداری به تکامل غیرهم جهتی که در نمونه‌های مناطق مختلف برای یک جایگاه خاص در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است نسبت داد.

خوش خلق (۱۳۸۵) با استفاده از روش مایکروساتلایت در تاسماهی ایرانی در تمام جایگاه‌ها انحراف از تعادل را به مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و تلاقی خویشاوندی (به ویژه در تاسماهی ایرانی) که عمده بچه ماهیان ناشی از تکثیر مصنوعی می‌باشند و همچنین خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها در بعضی از مناطق اعلام کرد.

نوروزی (۱۳۸۵) با استفاده از روش مایکروساتلایت در ازون برون در تمام مناطق انحراف از تعادل را ناشی از آل‌های نول، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و مخلوط شدن جمعیت‌ها اعلام کرد.

کیوان شکوه (۱۳۸۶) با استفاده از روش مایکروساتلایت در کلمه انحراف از تعادل را ناشی از وجود آل‌های صفر در دو جمعیت توضیح داد که در صورت وجود آل‌های صفر، هتروزیگوسیتی‌هایی که یک آل صفر دارند ممکن است به غلط به شکل هموزیگوسیتی برای واریانس آل که موجب نقص هتروزیگوسیتی در آن جمعیت گردد باشد.

در بررسی حاضر، انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در تمام مناطق نمونه برداری به ازای هر جایگاه ژنی ($P \leq 0.001$) مشاهده شد. این عدم تعادل را می‌توان به تکامل غیر هم در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است نسبت داد همچنین چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی از روش رتبه دهی به باندهای فریب دهنده یا وجود آل‌های نول باشد که هموزایگوس‌ها را جایگزین هتروزیگوس‌ها می‌کند. در واقع وجود آل‌های نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است. بر اساس تعاریف، یک جمعیت گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولید مثلی از گروه‌های دیگر همان گونه جدا هستند اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیت‌ها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌ها) به عنوان گونه مطرح نمی‌گردند. در حقیقت رفتارهای تولید مثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولیدمثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت می‌باشد.

نکته مهم در مایکروساتلایت‌ها نرخ جهش بالا در لوکوس‌های مایکروساتلایت است و از الگوی جهش نیز نباید غفلت کرد. روش تغییر در مایکروساتلایت‌ها تعیین کننده وضعیت آماری است که می‌تواند منعکس کننده مهاجرت یا زمان انشعاب باشد. اگر الگوی جهش در مایکروساتلایت کاملاً شناخته شود امکان تعیین شاخص آماری برای تمایز فاصله آلی تابع مهاجرت یا زمان انشعاب بین جمعیت‌ها وجود دارد. مدل‌های مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است اما هیچ یک از مدل‌های ارائه شده به طور کامل مناسب برای لوکوس‌های مایکروساتلایت نیستند. در نتیجه هر دو روش برآورد مرسوم در تمایز (F_{st}) و برآورد کننده تمایز مخصوص مایکروساتلایت (R_{st}) به طور معمول در مطالعاتی که از مارکرهای مایکروساتلایت استفاده می‌گردد، گزارش می‌شوند. F_{st} و R_{st} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییر پذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Meffe and Carool, 1997).

در کل عنوان شده که تفسیر مقدار R_{st} و F_{st} مشکل است. برای مثال مقدار F_{st} همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ زیرجمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیرجمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است. زمانی که F_{st} بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان‌دهنده جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. به هر حال دادن یک معنی بیولوژیکال به این داده‌ها سخت و گمراه کننده است. برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست (Wright, 1978; Hartl and Clark, 1978).

اما به طور معمول مقدار F_{st} به طور معقولانه ای زیر ۰/۰۵ مطرح می‌شود که محققین ممکن است ساختار بین زیر جمعیت‌ها را ضعیف تفسیر کنند در حالیکه آن نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست. نکته دیگر اینکه میزان F_{st} در اکثریت موارد به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی مورفیسم ناشی از جهش به طور موثری میزان F_{st} را تغییر می‌دهد (Wright, 1978; Charlesworth, 1998; Nagylaki, 1998; Hedrick, 1999).

تفاوت معنی دار در تفسیر R_{st} و F_{st} در تشخیص ساختار جمعیت مورد توجه است. استفاده از تستهای غیر پارامتریک وسیله ای برای ارزیابی برآورد معنی دار R_{st} و F_{st} است و معنی دار بودن آن با مقدار P تست می شود (Petit and Mayer, 1999).

خوش خلق (۱۳۸۵) در بررسی تاسماهی ایرانی بیشترین F_{st} محاسبه شده (۰/۰۳۲) بین گروه نمونه های ناحیه یک (گیلان) و سفیدرود و کمترین مقدار آن (۰/۰۱۱) بین نمونه های ناحیه چهار (گلستان) و ناحیه سه (مازندران) بدست آورد. میزان R_{st} اختلاف معنی داری بین جمعیت تاسماهی ایرانی در منطقه ترکمنستان با کلیه مناطق به غیر از ناحیه سه (مازندران) نشان می دهد و جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود اختلاف معنی داری را با نمونه های خزر شمالی و نواحی یک و دو و چهار و پنج شیلاتی نشان نمی دهد که در نتیجه سه جمعیت مستقل تاسماهی ایرانی قابل تشخیص می باشد (جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود، جمعیت تاسماهی ایرانی منطقه ترکمنستان و جمعیت تاسماهی ایرانی ناحیه سه شیلاتی).

صفری (۱۳۸۵) با استفاده از روش مایکروساتلایت در مطالعه جمعیت های شیپ رودخانه اورال و حوضه جنوبی دریای خزر بیشترین اختلاف بین نواحی نمونه برداری را ۰/۰۳۲ اعلام کرد و بر طبق نتایج به دست آمده جمعیت ماهی شیپ اورال از شیپ سواحل جنوبی دریای خزر جدا می باشد.

نوروزی (۱۳۸۶) با استفاده از روش مایکروساتلایت در مطالعه جمعیت های ازون برون دامنه F_{st} را ۰/۰۲۸ تا ۰/۰۶۳ و دامنه R_{st} با احتمال ۹۹ درصد ۰/۰۴۱ تا ۰/۴۳۹ بر اساس تست AMOVA اعلام کرد.

Shaw et al., 2002 در بررسی هرینگ اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) دامنه F_{st} را ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۴۳ و میزان R_{st} را بین ۰/۰۲۹ تا ۰/۲۷۳ بدست آورد که در تمامی موارد معنی دار بوده و مقدار R_{st} بیشتر از F_{st} بود.

Skaala et al., 2004 در بررسی *Salmo salar* مقدار F_{st} تمایز ژنتیکی معنی داری را در تمام لوکوسها نشان می داد اما فاصله ژنتیکی (Nei, 1978) و تمایز جنسی با یکدیگر در تمامی موارد هماهنگ نبودند. به طور کلی F_{st} در نژادهای پرورشی ۲ تا ۸ بار بالاتر از نژادهای وحشی بود که ممکن است به خاطر اثر موسس باشد که افراد بنا کننده یا مؤسس از نژادهای مختلف بودند.

Yue et al., 2004 در بررسی *Scleropages formosus* میانگین F_{st} و R_{st} را به ترتیب ۰/۰۴۷ و ۰/۱۰۳ بدست آوردند و مقدار R_{st} در تمامی موارد از F_{st} بیشتر بود.

Charrier و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار F_{st} و فاصله جغرافیایی را مشاهده نکردند و ساختار ژنتیکی ضعیف این ماهی را نشان دهنده جریان ژنی بالا بین مولدین اعلام کردند.

کیوان شکوه (۱۳۸۶) در بررسی خود روی ماهی کلمه سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از روش مایکروساتلایت بیان کرد میزان F_{st} بین جمعیت ها ۰/۰۷ بود و این نشانه آن است که تمایز ژنی معنی دار بود. در بررسی حاضر با در نظر گرفتن دو منطقه نمونه برداری منطقه شمال (ناحیه دلتای ولگا) و منطقه سواحل جنوب دریای خزر (نواحی خلیج گرگان و بندر انزلی)، اختلاف بین نمونه های هر ناحیه ۰/۹۳٪ و (۰/۰۵) $P \leq$ و بین نمونه های مناطق شمال و جنوب ۰/۷٪ و (۰/۰۵) $P \leq$ مشاهده شده همچنین اختلاف معنی داری بین نواحی انزلی و ترکمن مشاهده نشده است.

به طور کلی مهاجرت زیاد در ماهیان و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است از جدایی ژنتیکی جمعیت ها جلوگیری می کند (Waples, 1987).

افزایش اختلاف در مقدار F_{st} و R_{st} هنگامی رخ می دهد که تعداد افراد زیر ۴۰ تا ۵۰ فرد باشد. البته برآوردهای F_{st} و R_{st} اغلب در یک وضعیت مشخص دارای تفاوت هستند. هنگامیکه F_{st} و R_{st} از دو جنبه مجزا برآورد شده باشد اختلاف آنها زیاد شده و تجزیه و تحلیل آنها ممکن است کاملاً قابل اعتماد نباشد برای مثال هنگامی که از نمونه های کوچک با تعداد محدود لوکوس استفاده شود (Coltman et al., 1999).

مشکل اصلی F_{st} در مایکروساتلایت ها حساسیت پایین آنها به جهش نسبت به جریان ژنی یا مهاجرت است. R_{st} در مایکروساتلایت ها حساسیت بالاتری به جهش نسبت به جریان ژنی یا مهاجرت دارد و کمتر از F_{st} تمایز جمعیت را منعکس می کند. معمولاً میزان R_{st} میانگین بالاتری نسبت به F_{st} دارد زیرا در سطح تمایز جمعیت اثر جهش بیشتر از اثر مهاجرت است (Balloux et al., 2000).

این رویداد به طور عموم در مطالعات تجربی متعددی مشاهده شده است و به نظر می رسد R_{st} در جمعیت هایی که ساختار ژنتیکی بالایی دارند بهتر می تواند تمایز را منعکس کند (Lugon-Moulin et al., 1999).

در مدل جریان ژنی ماهیان الگوی جدا سازی بوسیله مسافت مشاهده شده انجام می شود و بیان می کند که جریان ژنی و فاصله جغرافیایی بین جمعیت ها رابطه معکوس با یکدیگر دارند (Barber, 1999).

۳-۶- نتیجه گیری نهایی

بر طبق نتایج به دست آمده نمونه های ماهی کلمه هر منطقه دارای اختلاف ژنتیکی بالا (۹۳٪) بودند، تفاوت ژنتیکی در بین نواحی گرگان و انزلی معنی دار نبوده ($P \geq 0.01$) در حالیکه اختلاف نمونه های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P \leq 0.05$) لذا بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می رسد نمونه های ماهی کلمه نواحی منطقه جنوب دریای خزر مربوط به یک جمعیت بوده و از نمونه های شمال آن مجزا می باشد در نتیجه ماهی کلمه دریای خزر علی رغم تخریب زیستگاه، فشار صیادی، آلودگی های زیست محیطی دارای تنوع کافی برای موضوع اصلاح نژاد و آبرزی پروری می باشد.

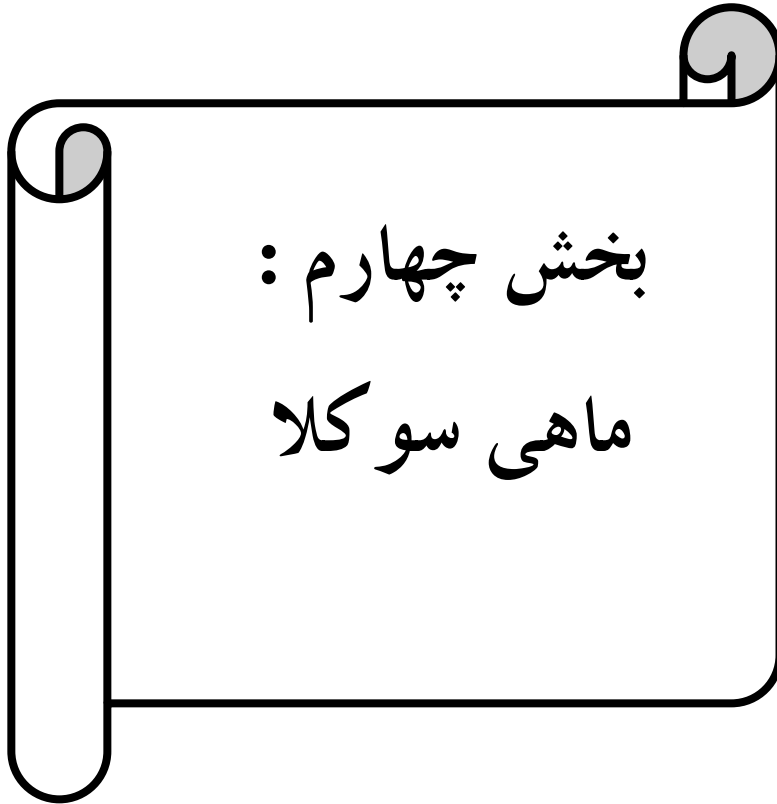
۳-۷- پیشنهادها

- ۱- با توجه به توانایی بالای روش مایکروساتلایت توصیه می‌گردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت سایر گونه‌ها، این روش مورد استفاده قرار گیرد.
- ۲- با توجه به برنامه‌های شیلاتی در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی کلمه، لازم و ضروری است برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی موجود، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود و نحوه توارث این نشانگر در نسل‌های آن مورد بررسی قرار گیرد.
- ۳- استفاده از تعداد بیشتر پرایمر در مباحث ژنتیک جمعیتی، دستیابی به جمعیت‌های نادر ژنتیکی را ساده‌تر خواهد کرد. در این خصوص، بررسی فیلوژنتیکی با تعداد بیشتر پرایمرها فاصله ژنتیکی را در صورت بروز تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشخص خواهد کرد لذا برای مطالعات ژنتیک جمعیت از تعداد پرایمر بیشتری استفاده گردد.
- ۴- علی‌رغم تخریب زیستگاه و فشار صید و کاهش شدید ذخایر ماهی کلمه در مناطق شمالی و جنوبی دریای خزر، هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی وجود دارد و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد.
- ۵- بر اساس همکاری‌های چند جانبه کشورهای حاشیه دریای خزر نمونه‌های بیشتر از دلتای ولگا، کورا و ... جمع‌آوری گردد تا مطالعات آتی جامع‌تر انجام گیرد.

Abstract

Population structure of *Rutilus rutilus caspicus* from two locations in the Iranian coastline and one location from Russia was investigated using microsatellite DNA markers. Genomic DNA from 90 specimens was extracted and seven loci with reasonable polymorphism were amplified using PCR approach. The results showed that the lowest mean number of alleles per locus (6.42) was observed in Russian and the highest (7) in Gorgan Bay. The observed heterozygosity in the Anzali Wetland (0.59) population was higher than the other populations in Iran (Gorgan Bay: 0.5) and Russian (0.52). Significant to highly significant deviations from Hardy-Weinberg expectations were found at more loci in Iranian population than Russian. Population differentiation was modest among all populations. The highest and significant (0.044 ; $p \leq 0.01$) population differentiation (F_{st}) value was between Iranian populations and Russian populations and the lowest and non-significant population differentiation (F_{st}) value was between Iranian populations (0.012 ; $p \leq 0.07$). The estimated gene flow (N_m) value between Iranian populations (Gorgan Bay and Anzali Wetland) across all the studied loci was the highest, while the N_m value between Iranian and Russian population was the lowest. The reported results could be of interest for management and conservation programmes of this species in the Caspian Sea.

Keyword: microsatellite, *Rutilus rutilus caspicus*, Genetic variation,



چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum* G.) در خلیج فارس و دریای عمان طی زمستان ۱۳۸۵ و بهار ۱۳۸۶ با استفاده از روش ریزماهواره بررسی گردید. تعداد ۱۸۴ ماهی از مناطق صیادی بوشهر، بندر دیر، بندر لنگه، بندر عباس، پزم چابهار و بریس چابهار صید و نمونه بافت باله آنها در اتانول خالص فیکس گردید و برای انجام مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید.

DNA ژنومی نمونه‌ها از بافت نرم باله ماهی به روش فنل-کلروفرم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره صورت گرفت. محصولات تکثیر شده آن با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. جهت سنجش وزن مولکولی محصول PCR بر حسب جفت باز و تعیین ژنوتیپ‌ها از نرم افزار Lab Image استفاده گردید. مقادیر مربوط به فراوانی آللی، تعداد آللهای واقعی و موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، تعادل هاردی-واینبرگ، مقادیر F_{ST} , R_{ST} و جریان ژنی بر اساس آزمون AMOVA با استفاده از نرم افزار ژنتیکی Gene Alex و Pop Gene محاسبه گردید. دندروگرام فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار ژنتیکی TFGPA ترسیم گردید.

نتایج بدست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای بررسی شده در ماهی سوکلا، ۷ جفت آنها پلی مورف و ۳ جفت آنها مونومورف بوده و ۱۱ جایگاه ژنی تولید نمودند. میانگین تعداد آللی مشاهده شده و موثر به ترتیب ۱۲/۳۵۷ و ۸/۳۱۹ می‌باشد همچنین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۶۵۵ و ۰/۸۷۴ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ مناطق بوشهر، بندر دیر، بندر لنگه و بندر عباس در تمامی جایگاه‌های ژنی مورد بررسی خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند و تنها مناطق پزم چابهار در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 و *Rca* 1B-H09 و بریس چابهار در جایگاه ژنی *Rca* 1-A04 در تعادل بودند ($P < 0.05$). بر اساس آزمون AMOVA حداکثر F_{ST} (۰/۰۶۳) بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است مشاهده شد. حداقل F_{ST} بین نمونه‌های بندر عباس با نمونه‌های بندر

لنگه که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴۶) است مشاهده گردید. میزان R_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه برداری غیر معنی دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی دار بود ($P < 0.01$). بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۸۱۵) و کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۴۳) میان نمونه‌های مناطق دیر و بريس وجود دارد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۸۵) و بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۱۹) میان نمونه‌های مناطق بندر عباس و بندر لنگه وجود دارد که با فاصله جغرافیایی کاملاً هماهنگی دارد. بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده، مناطق مختلف به دو کلاستر تقسیم شدند، کلاستر اول شامل مناطق بوشهر و دیر بوده و کلاستر دوم از آن منشعب شده و به دو گروه تقسیم شده است گروه اول شامل نمونه‌های مناطق پزم چابهار و بريس چابهار و گروه دوم شامل نمونه‌های مناطق بندر لنگه و بندر عباس می‌باشد. از این رو به نظر می‌رسد کلونی اصلی این جمعیت‌ها در ناحیه بوشهر باشد.

ماهی سوکلا در مناطق مختلف نمونه برداری در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزا است که شامل جمعیت بوشهر، جمعیت هرمزگان و جمعیت چابهار می‌باشد. آغازگرهای اختصاصی جمعیت بوشهر شناسایی گردید بطوری که با استفاده از آغازگرهای *Rca 1B-E08A*, *Rca 1B-F07*, *Rca 1B-H09* و *Rca 1-A04* و ظهور آلل‌های اختصاصی با وزن مولکولی مشخص می‌توان ماهی سوکلای منطقه بوشهر را از سایر مناطق شناسایی و تفکیک نمود.

این مطالعه مدارک و شواهد اولیه مبنی بر وجود جمعیت‌های متمایز را نشان داد حال با توجه به برنامه در دست اقدام شیلات ایران در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی سوکلا در سواحل جنوبی ایران لازم و ضروری است به منظور مدیریت بهینه ذخایر، ساختار جمعیتی آن به هنگام تکثیر مصنوعی کاملاً مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ماهی سوکلا، خلیج فارس، دریای عمان، ژنتیک جمعیت، ریزماهواره.

۴-۱- مقدمه

امروزه بیش از یک میلیون گونه جانوری و نیم میلیون گونه از گیاهان و موجودات تک سلولی مشخص شده‌اند و این در حالی است که احتمالاً ۳ تا ۱۰ میلیون و یا حتی بیشتر از آن، گونه در اکوسیستم‌های گوناگون کره زمین به حیات خویش ادامه می‌دهند. علاوه بر این، تعداد گونه‌های منقرض شده تاکنون نیم میلیارد تخمین زده شده است (Mayr and Ashlocke, 1991).

در حال حاضر، حیطه کاری ژنتیک آبزیان از شکل کلاسیک دورگه‌گیری که در اوایل قرن حاضر شروع شده بود به مباحث دیگری گسترش یافته است که از جمله مطالعات سیتوژنتیکی و دستکاری‌های کروموزومی، تغییر و کنترل جنسیت آبزیان و تولید آبزیان تک جنسی، شناخت نژادها، گونه‌ها و تخمین میزان خویشاوندی بین گونه‌ای، بیولوژی و ژنتیک مولکولی با استفاده از روش‌های مختلف مثل ریزماهواره را می‌توان نام برد. امروزه تکنیک‌های مولکولی در مطالعات زیستی از قبیل اصلاح نژاد آبزیان، تشخیص بیماری‌ها حتی قبل از بروز علائم ظاهری آن، شناخت جمعیت‌ها و نژادهای مختلف، تهیه بانک ژنی، انتقال صفات و... کاربرد بسیار زیادی پیدا کرده است (صفری، ۱۳۸۵).

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه‌های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه، تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می‌باشند ولی می‌توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان انشقاق دو گونه از یکسو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکاملی و رابطه جدی- فرزندگی و در نهایت ترسیم درخت فیلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرد. این تفاوت‌ها از دو راه بر مبنای مطالعات مولکولی قابل تشخیص‌اند، در یک روش بطور مستقیم توالی قطعه مورد نظر تعیین می‌گردد^۱ و روش دیگر آن است که این اختلافات بطور غیر مستقیم با استفاده از روش ریزماهواره آشکار گردد. بطور معمول جریان ژنی زیاد میان جمعیت‌ها موجب محدود کردن مهلت برای ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی شده و از ظهور گونه‌های جدید ممانعت می‌کند. از آنجایی که پدید آمدن گونه‌های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت‌های جدا یا نسبتاً جدا از یکدیگر می‌باشد، بنابراین بطور قطع می‌توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی و گونه زایی ارتباط برقرار نمود (Ferraris and Palumbi, 1996).

^۱ Sequencing

بیشینه برداشت پایدار ذخایر ماهیان از اهداف مدیریت شیلاتی است، که دستیابی به آن نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می‌باشد. یکی از روش‌های مورد استفاده جهت ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها بکارگیری صفات مرفومتريک و مریستیک نظیر طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی و برجسب‌های مصنوعی بوده است اما با توجه به حساسیت زیاد صفات مرفومتريک و مریستیک به تغییرات محیطی و نیز اثر منفی دستکاری هنگام نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان، و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها (Adams and Hutchings, 2003)، همگام با پیشرفت علم استفاده از نشانگرهای مولکولی مثل ریزماهوره، آلوزایم، RAPD، AFLP، RFLP که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشد جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش رایج شده است (Ryman, 1991).

ذخایر به مجموعه‌ای از افراد نزدیک به هم در یک گونه که در یک مکان خاص زیست کرده و از لحاظ ژنتیکی از سایر جمعیت‌های متعلق به همان گونه قابل تشخیص هستند اطلاق می‌شود. هر فرد به عنوان یک خزانه ژنی محسوب می‌شود پس جمعیت‌ها در حقیقت مجموعه متنوعی از ژن‌ها هستند که عواملی همچون فاصله نسل‌ها در این ماهیان، صید بی‌رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاه‌ها منجر به کاهش اندازه جمعیت‌های موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می‌گردد که این امر خطر انقراض را افزایش می‌دهد. حفاظت و نگهداری از ذخایر ژنتیکی این ماهی از طریق مدیریت ذخایر بسیار مهم است زیرا که گونه‌های ارزشمند و منحصر به فرد هر کشور به عنوان سرمایه ملی آن کشور محسوب می‌شوند (پور کاظمی و همکاران، ۱۳۸۳).

به طور کلی توصیف ژنتیکی ذخایر ماهیان، اطلاعاتی به ما می‌دهد که بازتاب ساختار ژنتیکی، بدون تأثیری از فاکتورهای محیطی می‌باشد. برای مدیریت بهینه جمعیت ماهیان، اطلاعاتی راجع به ساختار ذخایر نیاز است تا بتوان تنوع ژنتیکی جمعیت را حفظ کرد. امروزه به کمک روش‌های متفاوتی به بررسی تنوع ژنتیکی می‌پردازند که بر اساس پیشرفت‌هایی در بیولوژی مولکولی و با استفاده از نشانگرهای DNA همچون ریزماهوره^۱ می‌باشد. یک نشانگر ایده آل باید دارای جایگاه‌های با تغییر پذیری بالا، قابلیت رتبه دهی و آلل‌های همباز بوده و به طور یکنواخت در سراسر ژنوم پخش شده باشد. ریزماهوره‌ها این خصوصیات را یک جا دارند (نوروزی، ۱۳۸۶).

وجود تنوع ژنتیکی، در ذخیره ژنی هر جمعیت، ضامن بقای آن جمعیت در روند انتخاب طبیعی است. در

¹ microsatellite

جمعیت‌های کوچک به دلیل محدود بودن ذخیره ژنی، امکان رانش ژنتیکی^۱ وجود دارد که شانس بقای آن جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. دانستن میزان چندشکلی ژنتیکی در جمعیت ماهی‌ها، مثل جمعیت ماهی سوکلا، در تکثیر و پرورش این ماهی حائز اهمیت است زیرا در جمعیت‌های پرورشی و محدود، امکان تجمع یک دسته صفات بیشتر بوده که ممکن است در مقابله با شرایط نامساعد محیطی مثل بیماری‌های خاص، شانس بقا را تحت الشعاع قرار دهد (قاسمی، ۱۳۸۲).

خانواده *Rachycentridae* یکی از قدیمیترین و ابتدائی‌ترین ماهیان استخوانی می‌باشد که تنها دارای یک گونه منحصر به فرد بنام سوکلا (*Rachycentron canadum*) می‌باشد، سوکلا ماهی سطح‌زی و سریع‌الرشد و یکی از معدود ماهیانی است که در دنیا در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و آبهای گرم معتدله به غیر از شرق آرام و مدیترانه یافت می‌شود و بیشترین فراوانی را در طول سواحل اطلس جنوبی ایالات متحده و شمال خلیج مکزیک دارد. (Salari Aliabadi *et al.*, 2008; Ditty and Shaw, 1992; Turner and Rooker, 2005).

ماهی سوکلا دارای پروتئین با ارزش بالایی بوده و به جهت کیفیت گوشت بالا یکی از بهترین گونه‌ها جهت آبرزی پروری در سال‌های اخیر است، امروزه ذخایر این ماهی به جهت فشار صید بی‌رویه، صید غیر قانونی، آلودگی، ورود سموم شیمیایی مزارع به رودخانه‌ها، تخریب زیستگاه‌ها و بسترهای تخم‌ریزی به طور عمده‌ای کاهش یافته است (Benetti *et al.*, 2003).

علاوه بر گوشت سفید ماهی سوکلا از غدد جنسی، معده، روده و سر آن جهت تهیه سوپ در آسیا استفاده می‌گردد و ترکیب گوشت آن شامل ۷۴/۹ درصد آب؛ ۱۸/۹ درصد پروتئین؛ ۵/۴ درصد چربی؛ ۱/۳ درصد خاکستر و فاقد کربوهیدرات می‌باشد (Shaffer and Nakamura, 1989).

حفاظت و نگهداری از ذخایر ژنتیکی این ماهی از طریق مدیریت ذخایر بسیار مهم است زیرا که گونه‌های ارزشمند و منحصر به فرد هر کشور به عنوان سرمایه ملی آن کشور محسوب می‌شوند. تحقیق حاضر که در جهت مقایسه تنوع ژنتیکی و شناخت ذخایر ژنی آبزیان صورت گرفته از اولین تحقیقاتی است که در ایران با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته ژنتیکی (میکروستلایت) در خصوص ماهیان انجام شده است. امروزه جمعیت ماهی سوکلا در اکثر اکوسیستم‌های جهان و از جمله خلیج فارس و دریای عمان بعلت صید غیر مجاز به شدت کاهش یافته و

اندک ذخایر باقیمانده ماهیان هم به جهت تخریب بسترهای تخم‌ریزی و فشار صید بی‌رویه، صید غیر قانونی و آلودگی با مشکلاتی مواجه‌اند. لذا تکثیر طبیعی این ماهی از جمله در حوضه شمالی خلیج فارس و دریای عمان به حداقل خود رسیده است و از آنجا که طبق تصمیمات کنوانسیون^۱ CITES کشورهای مشترک در یک اکوسیستم آبی باید سهمیه سالانه برای هر یک از گونه‌های خود بر اساس نتایج گشت ارزیابی ذخایر تعیین نمایند، احتمال می‌رود در آینده تعیین سهمیه برای هر یک از گونه‌ها بر مبنای جمعیت‌های شناسایی شده صورت پذیرد. گسترش برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر ماهی سوکلا هنگامی می‌تواند مفید باشد که تنوع ژنتیکی ساختار جمعیت آن گونه درک شود زیرا این اطلاعات در انتخاب جمعیت‌های دهنده ژن در تکثیر مصنوعی در خصوص ساختار جمعیت و در امر بازسازی ذخایر ضروری به نظر می‌رسد. لذا انجام تحقیق حاضر بر اساس تکنیک مولکولی آنالیز ریزماهوره با استفاده از ژن‌های مستقر بر روی ژنوم ماهی سوکلا در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان و با اهداف کلی زیر امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر بود.

۱- شناسایی جمعیت‌های مختلف ماهی سوکلا در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان

۲- شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سوکلا در هر یک از مناطق مختلف نمونه برداری

۳- تعیین میزان تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های مختلف

با توجه به بررسی‌های اولیه این فرضیات مطرح گردید:

۱- روش ریزماهوره با استفاده از آغازگرهای موجود (مورد استفاده) کارایی لازم برای بدست آوردن تنوع

ژنتیکی و جدا سازی جمعیت‌های احتمالی ماهی سوکلا را دارد.

۲- ماهی سوکلا در هر منطقه نمونه برداری دارای تنوع ژنتیکی می‌باشد.

۳- تنوع ژنتیکی این گونه در هر یک نواحی مختلف نمونه برداری متمایز از دیگر نواحی است.

¹ Convention on International Trade Endangered Species of Funna and Flora

۴-۲- کلیات

۴-۲-۱- اهمیت و ویژگی‌های ماهی سوکلا

۴-۲-۱-۱- طبقه بندی^۱

Phylum: Chordata
Class: Osteichthyes
Superorder: Acanthopterygii
Order: Perciformes
Suborder: Percoidei
Family: Rachycentridae
Genus: *Rachycentron*
Species: *Rachycentron canadum* Goode, 1884 (Shaffer and Nakamura, 1989)

۴-۲-۱-۲- نام‌های متداول^۲

اسامی دیگر آن ماهی روغنی، کویا، خرچنگ‌خوار و ماهی لیمویی است که در ایران سه کله یا سوکلا (سکلا، سکن) نامیده شده است.

Common names: Cobia; Ling; Lemonfish; Cabio and crab-eater (U.S.A.); Bacalao; Medregal (Central and South America); Black kingfish (Australia, India, Pakistan); Runner (East-Africa); Sugi (Japan); and Sikel (Iranian) (Shaffer and Nakamura, 1989).

۴-۲-۱-۳- ریخت‌شناسی^۳ گونه

ماهی سوکلا دارای بدنی کشیده و تقریباً استوانه‌ای با سر پهن و فشرده، دهان بزرگ که فک پایین جلوتر از فک بالایی است و به علت دهان بزرگش از بالا نسبت به پهلوها پهن‌تر دیده می‌شود. رنگ این ماهی ممکن است در حالات مختلف تغییر کند، اما بطور معمول رنگ پشت خاکستری متمایل به قهوه‌ای و در طرفین دو نوار طولی نقره‌ای وجود دارد و ناحیه شکم به رنگ سفید مایل به زرد است. فلس‌ها کوچک و از نوع سیکلوئید بوده و بر روی پوستی ضخیم، روی هم قرار گرفته‌اند. اولین باله پشتی دارای ۷ تا ۹ خار آزاد و جدا از یکدیگر بدون غشای میانی است. باله دم در بالغین کاملاً هلالی شکل بوده و لبه بالایی آن طویل‌تر از لبه پایینی است، در جوان‌ها باله دم گرد می‌باشد. ظاهر کلی سوکلا وقتی که از بالا نگاه کنیم خیلی شبیه یک دلفین کوچک است و نزدیکترین وابستگی را به چسبک معمولی یا لاک‌دارند (Shaffer and Nakamura, 1989).

¹ Taxonomy

² Common Name

³ Morphology



شکل ۳۵-۴- نمای ظاهری- پهلویی ماهی سوکلای پرورشی (بالا) و دریایی (پایین)

۴-۱-۲-۴- خصوصیات عمومی

۴-۱-۲-۴-۱- شرایط محیطی مناسب برای رشد ماهی سوکلا

به طور کلی بهترین دما برای رشد ماهی سوکلا بین ۱۶/۸ تا ۳۲ درجه سانتی گراد می باشد و در این محدوده طبیعی مهاجرت سوکلا به مناطق سرد در تابستان و به مناطق گرم در زمستان قابل مشاهده است. در حالت کلی محدوده‌ی شوری آب برای سوکلا بین ۸ تا ۴۴/۵ گرم بر لیتر می باشد. حداقل میزان اکسیژنی که باعث مرگ و میر سوکلای جوان می شود ۱/۵ میلی گرم بر لیتر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد است. سوکلا عمدتاً آبهای اکسیژن دار شفاف را ترجیح می دهد اما قرار گرفتن در آبهای کدر یا آبهای غنی و پر تولید در کوتاه مدت منجر به مرگ و میر نمی شود (Franks and Brown-Peterson, 2002).

۲-۴-۱-۲-۴- تغذیه^۱ ماهی سوکلا

سوکلا از نظر عادات تغذیه‌ای خیلی شبیه چسبک معمولی است و یک تغذیه کننده فرصت طلب می‌باشد. سپرماهیان دارای مقدار زیادی ضایعات غذایی در کف دریا هستند به همین دلیل سوکلا در پشت سر سپرماهیان و کوسه‌ها حرکت و در فرصت مناسب از ضایعات غذایی آنها استفاده می‌کند. سوکلاها معمولاً در نزدیکی کف تغذیه می‌کنند اما در نزدیکی سطح آب هم به شکار طعمه می‌پردازند سوکلا یک ماهی گوشتخوار^۲ اما لاروهای سوکلا از زئوپلانکتون‌ها^۳ به ویژه پاروپایان تغذیه می‌کنند. تغذیه‌ی سوکلا ۸۰ درصد از خرچنگ و ۲۰ درصد باقی مانده از سخت پوستان و سرپایان می‌باشد، به همین دلیل به این ماهی خرچنگ خوار نیز می‌گویند (Franks and Brown-Peterson, 2002).

۳-۴-۱-۲-۴- شیوه‌های تولید مثل و سیکل زندگی ماهی سوکلا

سوکلا دو جنسی و بین جنس نر و ماده تفاوت فاحشی وجود ندارد. در سوکلاهای بالغ، جنس ماده از نظر جثه بزرگتر از جنس نر بوده و شکم جنس ماده نرم و بزرگتر از شکم سفت و ترکه‌ای جنس نر می‌باشد. زمانی که ماده بالغ می‌شود نوارهای سفید پهلوی آن مشخص تر از قبل از بلوغش می‌شوند و در طول فعالیت جفت گیری، نوارها مات و به ندرت قابل تشخیص هستند. سوکلا چندین بار در یک فصل تخم‌ریزی و زمان تخم‌ریزی آن طولانی می‌باشد. این ماهیان در طول زمان تخم‌ریزی به مناطق دور از ساحل رفته و به صورت گروهی تخم‌ریزی می‌کنند (Franks and Brown-Peterson, 2002).

۴-۴-۱-۲-۴- پراکنش جغرافیایی ماهی

۱-۴-۱-۲-۴- پراکنش جغرافیایی ماهی سوکلا

سوکلا ماهی است سطح‌زی و سریع‌الرشد و یکی از معدود ماهیانی است که در دنیا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و آب‌های گرم معتدله به غیر از شرق آرام و مدیترانه یافت می‌شود. سوکلا در قسمت غربی اقیانوس

¹ Feeding

² Carnivora

³ Zooplankton

اطلس، از استان ماساچوست تا آرژانتین، در شرق اقیانوس اطلس از جنوب موروکو تا جنوب آفریقا، در غرب اقیانوس آرام از ژاپن تا استرالیا دیده می‌شود و در خلیج مکزیک دارای بیشترین فراوانی هستند. این ماهی گونه‌ای مهاجر بوده و فراوانی آن در فصول مختلف متفاوت و در ماه‌های زمستان فراوانی این گونه در مناطق گرمسیری بیشتر است. پراکنش این ماهی در ایران در سراسر دریای عمان و بخش شرقی خلیج فارس تا بوشهر می‌باشد (سالاری علی‌آبادی و همکاران، ۱۳۸۷).

۵-۱-۲-۴- میزان صید و تکثیر و پرورش ماهی سوکلا

گوشت سوکلا سفید و در ماهی‌های بزرگ قسمت‌های مختلف بدن ساختارهای متفاوت بافتی دارد. سوکلا عمدتاً بصورت ماهی تازه عرضه می‌شود و جزء ماهیان باکیفیت تجارتي به حساب می‌آید. این ماهی به خوبی یخ زده و برای سرخ کردن مناسب است. سوکلا جزء گونه‌هایی هستند که معمولاً بدلیل رفتارهای حرکتی انفرادی، صید آنها مشکل است. سوکلا به وسیله‌ی تورهای کششی و تورهای شناور و یا به وسیله‌ی قلاب صید می‌شوند. براساس آمارهای FAO^۱ میزان صید سوکلا از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۸۶ بین ۱۱۸۵ تا ۲۷۵۱ میلیون تن بوده است. کشورهایی که سوکلا صید می‌کنند کاملاً از یکدیگر دور بوده و این امر سبب گردیده که از نظر صیادان عرضه‌ی این ماهی‌ها بسیار کمتر از گونه‌های دیگر تجلی نماید. کشورهای پاکستان، مکزیک و فیلیپین بیشترین میزان صادرات سوکلا را به خود اختصاص داده‌اند. میزان صادرات هند از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۸۶ چیزی بین ۲۰۰ تا ۸۸۰ میلیون تن برآورد شده است. این گونه جزء گونه‌های عمومی برای صیدهای تفریحی می‌باشد. جدول ۱-۱ میزان صید جهانی ماهی سوکلا را بر حسب تن نشان می‌دهد (Shaffer and Nakamura, 1989).

سوکلا توانایی تولید میلیون‌ها تخم را در هر تخم‌ریزی دارا بوده و درصد تفریخ تخم در این ماهی بالا است. قطر تخم‌ها در حدود ۱/۴ میلی‌متر بوده و معمولاً در کارگاه‌های تکثیر بعد از ۳۰ ساعت در دمای انکوباسیون ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد هچ می‌شوند. طول لاروهای تفریخ شده ۳/۴ تا ۳/۶ میلی‌متر و رنگ لاروها قهوه‌ای تیره می‌باشد. بعد از ۳ روز به ۵/۱ میلی‌متر و بعد از ۲۵ روز به ۶ تا ۷ سانتی‌متر می‌رسند و رژیم غذایی خود را به غذای مصنوعی تغییر داده و با روتیفر، آرتمیا، کوبه‌پودها و قطعات غذایی کوچک تغذیه کنند. بعد از مدت ۴۵

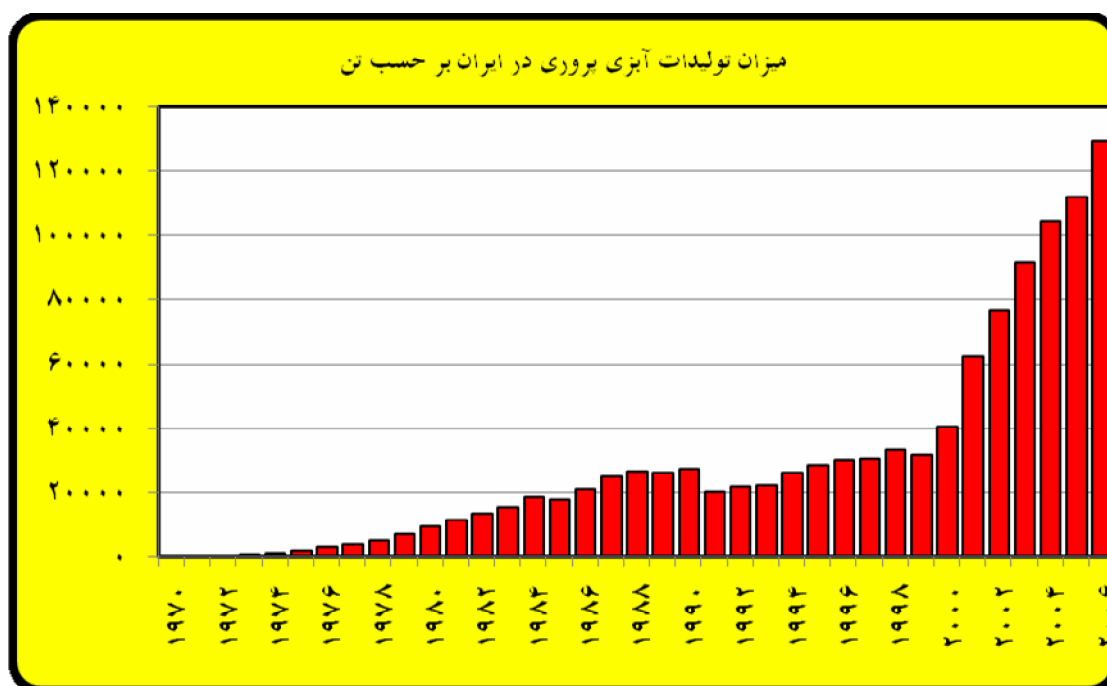
^۱ Food and Agriculture Organization of the United Nations

روز اغلب انگشت قد بوده و به ۹ تا ۱۰ سانتی متر می‌رسند. نرخ بقا در پرورش لاروها از مرحله تخم بارور تا ۴۵ روز بعد، بین ۵ تا ۲۰ درصد متغیر است. به خاطر بروز همجنس خواری^۱، بچه ماهی‌ها می‌بایست پیش از انتقال به حوضچه‌های نوزادگاهی درجه‌بندی شوند و درجه‌بندی پی در پی ۱۰ تا ۱۴ روز طی مرحله پرورش در نوزادگاه لازم است (Franks and Brown-Peterson, 2002).

شکل‌های ۳۶-۴ الی ۳۷-۴ میزان تولیدات آبی پروری و صیادی ماهی سوکلا را در جهان و ایران نشان می‌دهند.

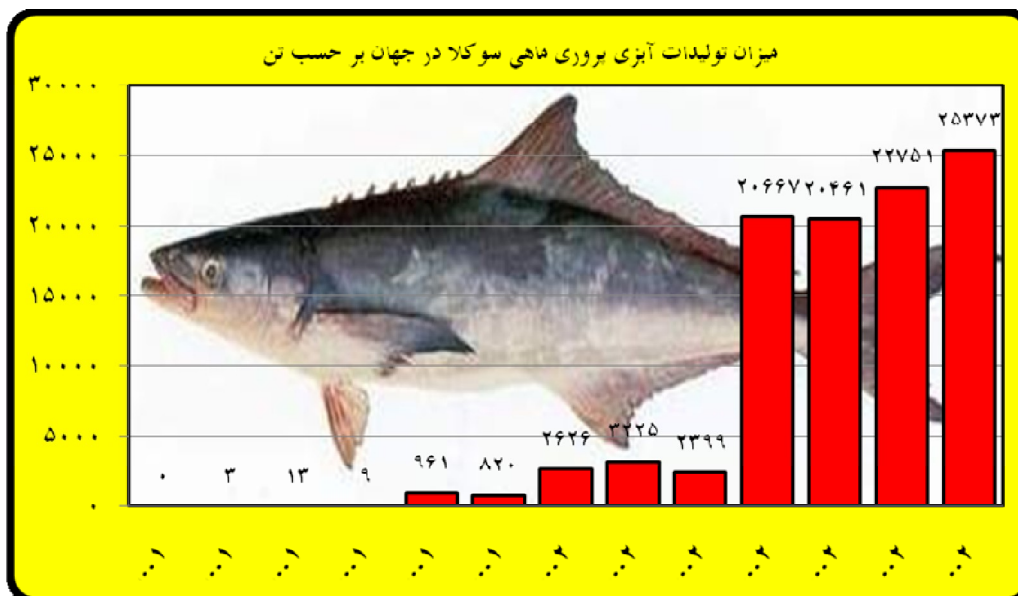
جدول ۱-۴- میزان صید جهانی ماهی سوکلا بر حسب تن (Shaffer and Nakamura, 1989).

کشور	۱۹۸۰	۱۹۸۱	۱۹۸۲	۱۹۸۳	۱۹۸۴	۱۹۸۵	۱۹۸۶	۱۹۸۷
پاکستان	۶۰۶	۱۴۰۵	۱۹۷۱	۱۳۸۴	۱۱۳۴	۸۸۷	۷۶۹	-
مکزیک	۱۳۴	۳۸۵	۳۳۴	۷۵۳	۶۲۶	۴۹۷	۴۷۲	-
فیلیپین	۳۹۲	۳۳۴	۲۹۸	۴۱۲	۷۴۱	۳۷۸	۶۲۹	-
آمریکا تجاری	۳۱	۴۵	۵۵	۵۵	۷۳	۷۴	۹۷	۱۱۷
آمریکا ورزشی	-	۱۲۰۰	۶۵۵	۸۲۳	۷۶۱	۵۷۰	۸۱۴	۶۲۱
امارات عربی متحده	-	۷۰	۳۰	۳۶	۳۶	۳۰	۳۰	-
بحرین	۱۹	۳۹	۴۴	۴۲	۲۲	۱۹	۱۶	-
قطر	-	-	۱۹	۲۱	۴۹	۶۲	۳۷	-
جمع کل	۱۱۸۵	۳۴۷۸	۳۴۰۶	۳۵۲۶	۳۴۴۲	۲۵۱۷	۲۸۶۴	-

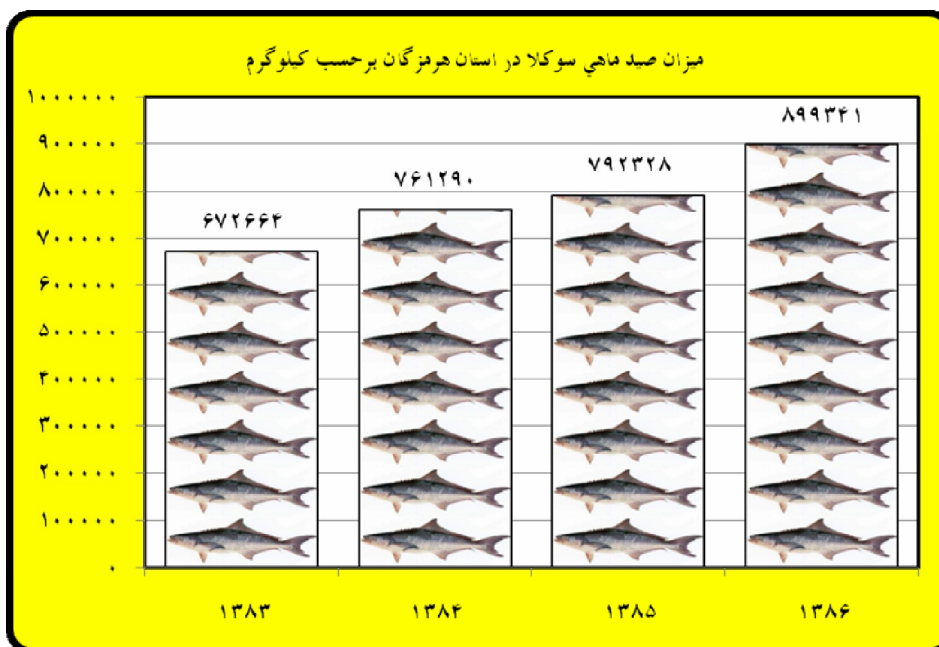


شکل ۳۶-۴- میزان تولیدات آبی پروری در ایران بر حسب تن (FAO, 2008)

^۱ Canibalism



شکل ۳۷-۱- میزان تولیدات آبی پروری ماهی سوکلا در جهان بر حسب تن (FAO, 2008)



شکل ۳۸-۴- میزان صید ماهی سوکلا در استان هرمزگان بر حسب کیلوگرم (بی نام، ۱۳۸۷)

۶-۱-۲-۴- مروری بر مطالعات انجام شده

تحقیق حاضر که در جهت مقایسه تنوع ژنتیکی و شناخت ذخایر ژنی آبریان صورت گرفته اولین تحقیق در ایران در خصوص ماهی سوکلای خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته ژنتیکی ریزماهوره می‌باشد. بررسی ساختار جمعیتی ماهی سوکلا در جهان نیز بسیار کم و محدود به تحقیقات انجام شده توسط Liu

و همکاران در سال ۲۰۰۵ به روش RAPD و RFLP در چین، Renshaw و همکاران و Pruett و همکاران هر دو در سال ۲۰۰۵ به روش ریزماهواره و در خلیج مکزیک می‌باشد. با این وجود در دو دهه گذشته مطالعات زیادی در سایر ماهیان با استفاده از تکنیک‌های مولکولی به روش ریزماهواره انجام گردیده است که در این بخش ابتدا به مطالعات انجام شده در ماهی سوکلا و سپس مطالعات انجام شده در ایران و خارج از کشور بر روی سایر ماهیان بر اساس ترتیب زمانی اشاره می‌گردد.

۱-۶-۱-۲-۴- مطالعات انجام شده در مورد ماهی سوکلا

Liu و همکاران در سال ۲۰۰۵ به روش RAPD و RFLP در آبهای سرزمینی کشور چین تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا (*R. canadum*) را با استفاده از ۱۷ آغازگر و ۱۹ آنزیم آندونوکلئاز محدود اثر مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاصله بیانگر مناسب بودن روش RAPD و RFLP در مطالعات جمعیتی و بالا بودن تنوع ژنتیکی در ماهی سوکلا می‌باشد. Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا ۲۰ آغازگر ریزماهواره را در ماهی سوکلای خلیج مکزیک واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند، نتایج حاکی از تغییر تنوع ژنتیکی بین ۰-۰/۹۱۰ و تعداد ۱-۱۵ آلل در جایگاه‌های مختلف ریزماهواره‌ای می‌باشد. Renshaw و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی ماهی سوکلا ۲۰ جایگاه ژنی ریزماهواره را کلون و شناسایی نمودند که شامل ۲ تترانوکلئوتید، ۱ تری نوکلئوتید، ۳ تترانوکلئوتید مرکب، ۹ دی نوکلئوتید و ۵ جایگاه ژنی ریزماهواره‌ای ناقص می‌باشند.

۲-۶-۱-۲-۴- مطالعات انجام شده در ایران بر روی سایر ماهیان

Pourkazemi در سال ۱۹۹۶ اولین مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی تاس ماهیان سواحل جنوبی دریای خزر را انجام داد؛ الکتروفورز آلوزایمها و RFLP برای مطالعه جمعیت ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) استفاده گردید. مطالعه آلوزایمها تنوع بالایی را در بین و درون جمعیتها نشان داد؛ وی عدم تشخیص جمعیت را جریان بالای ژنی بین جمعیتها، حساسیت پایین روش بکار رفته، تعداد کم نمونه و مناسب نبودن ژن مورد مطالعه عنوان کرد.

Rezvani Gilkolaiee در سال ۱۹۹۷ با استفاده از روش RAPD به مطالعه گونه‌های خاویاری دریای خزر پرداخت و تفاوت معنی داری در جایگاه‌های ژنی RAPD گروه‌های فیل ماهی متعلق به مناطق غربی و شرقی جنوب دریای خزر مشاهده شد.

Rezvani Gilkolaiee در سال ۲۰۰۰ در مطالعه تنوع میتوکندری جمعیت‌های تاس ماهی روسی در جنوب دریای خزر از روش RFLP و ژن ND5/6 استفاده کرد و نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در پراکنش هاپلو تیپ‌ها در شرق و غرب سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که دلیل آن را پراکنش ژنتیکی عنوان نمود. خوش خلق در سال ۱۳۸۵ در بررسی جمعیتی تاسماهی ایرانی دریای خزر (*Acipenser persicus*) از روش ریزماهواره استفاده و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در مناطق مختلف نمونه برداری مشاهده نمود. وی در تمام جایگاه‌ها انحراف از تعادل را به مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و تلاقی خویشاوندی که عمده بچه ماهیان ناشی از تکثیر مصنوعی می‌باشند و همچنین خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیتها و تعداد کم نمونه‌ها در بعضی از مناطق اعلام کرد. در پایان او سه جمعیت مستقل تاسماهی ایرانی را تشخیص داد که شامل جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود، جمعیت تاسماهی ایرانی منطقه ترکمنستان و جمعیت تاسماهی ایرانی ناحیه سه شیلاتی بودند. صفری در سال ۱۳۸۵ با استفاده از روش ریزماهواره و به کارگیری آغازگرهای به کار برده شده، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۰/۸۵) را در ماهی شیب دریای خزر (*Acipenser nudiventris*) در مناطق مختلف نشان داد. انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در تمام مناطق نمونه برداری به ازای هر جایگاه ژنی مشاهده کرد و این عدم تعادل

را به تکامل غیر هم جهتی که در نمونه‌های مناطق مختلف برای یک جایگاه خاص در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است نسبت داد.

نوروزی در سال ۱۳۸۶ در ساختار جمعیتی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) را با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار داد. وی کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های ترکمنستان و منطقه یک شیلاتی و بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های مناطق دو و چهار شیلاتی بدست آورد.

۳-۶-۱-۲-۴- مطالعات انجام شده در خارج از کشور بر روی سایر ماهیان

Shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ ساختار جمعیتی شگک ماهی اقیانوس اطلس (*Clupea harengus*) را با استفاده از دو روش RFLP و ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که نشانگر ریزماهواره در بررسی ساختار جمعیت بهتر از RFLP بوده و عدم اختلاف بین گروه‌های مختلف را ناشی از مهاجرت تغذیه‌ای دانستند. Wirgian و همکاران در سال ۲۰۰۲ به بررسی جمعیت‌های تاس ماهی اطلس با استفاده از روش‌های ریزماهواره‌ای و تعیین توالی mtDNA پرداختند. هر دو روش سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در ماهیان سواحل اطلس نشان داد و در نمونه‌های کانادایی تنوع ژنتیکی وجود نداشت. آنها اظهار داشتند هر دو روش بطور واضح جمعیت‌ها را تفکیک می‌کند اما آنالیز ریزماهواره تفاوت بین جمعیت‌های سواحل جنوبی آمریکا را بخوبی نشان می‌دهد. Skaala و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از آنالیز دوازده نشانگر ریزماهواره بررسی ساختار جمعیتی ماهی آزاد اتلانتیک (*Salmo salar*) پرورشی و وحشی را در نروژ مورد مطالعه قرار دادند و با دقت بالایی توانستند نمونه‌های وحشی را از نمونه‌های پرورشی تشخیص دهند. در تمامی نژادهای پرورشی اختلاف آللی کل به طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر از جمعیت‌های وحشی بود که می‌تواند ناشی از اثر موسس یا رانش ژنتیکی در افزایش تولید نسل در برنامه‌های تولید مثلی باشد.

Watts و همکاران در سال ۲۰۰۴ ساختار ژنتیکی *Pleuronectes platessa* در داخل نوزادگاه‌های دریای اریش مورد بررسی قرار دادند و در این مطالعه ۴۴ آلل شناسایی کردند که ۱۱ عدد از آنها آلل‌های اختصاصی بودند. دامنه آللی ۹-۲ آلل با میانگین ۵/۵ آلل در هر جایگاه بود؛ میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار به ترتیب ۰/۳۸۲ و ۰/۳۹۴ بود. مقدار اختلاف ژنتیکی مشاهده شده در این مطالعه نسبت به سایر ماهیان پهن با استفاده از روش ریزماهواره کمتر بود و آنها علت آنرا تنگناهای جمعیتی، جمع آوری نمونه از خویشاوندان و اندازه کوچک جمعیت ذکر کردند.

Aguilar و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از تکنیک مولکولی ریزماهواره منشاء ژنتیکی جمعیت اردک ماهی شمال (*Esox lucius*) معرفی شده به دریاچه دیویس^۱ کالیفرنیا و تغییرات ژنتیکی آن را از زمان رها سازی بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که جمعیت‌هایی در سال ۱۹۹۹ دوباره پدیدار شدند و به دنبال آن در سال ۲۰۰۲ بازماندگان آنها اولین جمعیت را تشکیل دادند. میانگین تعداد آلل در جایگاه‌ها و هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۷/۶ و ۰/۶۸ بدست آوردند. به نظر آنها اندازه موثر جمعیت و تنگناهای ژنتیکی بر تمایز ژنتیکی در داخل یک جمعیت و تغییر در فراوانی آللی موثر است.

Alam و Islam در سال ۲۰۰۵ ساختار جمعیت *Catla catla* را با استفاده از هشت جایگاه ریزماهواره و در جمعیت‌های سه رودخانه^۲ در بنگلادش بررسی و اعلام کردند اختلاف ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌های هجری پایین‌تر از جمعیت‌های رودخانه است. میانگین هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت هجری کمتر از جمعیت رودخانه بود.

Lundrigan و همکاران در سال ۲۰۰۵ اختلاف ژنتیکی ریزماهواره‌ای در داخل و بین جمعیت‌های وحشی و پرورشی چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) در شمال امریکا را با استفاده از شش نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که نژادهای هجری و وحشی چارقطبی از یکدیگر متمایزند و نژاد پرورشی تنوع ژنتیکی کمتری نشان می‌دهد.

Xia و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از تنوع ریزماهواره و mtDNA جمعیت در معرض خطر *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis* را بررسی کردند نتایج حاکی از آن است که سطوح تغییر پذیری ژنتیکی بوسیله mtDNA پایین بوده و مقدار هتروزیگوسیتی با ریزماهواره بسیار بالاتر می‌باشد.

Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ ساختار ژنتیکی ماهی پولاک (*Pollachius pollachius*) را با استفاده از ۶ نشانگر ریزماهواره در سواحل فرانسه مورد مطالعه قرار دادند. تنوع آللی ۱۱/۶۷ الی ۱۳ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۶۷۸ الی ۰/۷۴۱ بدست آوردند. عدم انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در تمامی جمعیت‌ها و جایگاه‌ها آشکار شد و عدم انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به استفاده از آغازگرهای بین گونه‌ای و وجود آلل‌های نول نسبت دادند. آنها بیان کردند که میان مقادیر F_{st} و فاصله‌های جغرافیایی ارتباط مثبتی وجود دارد. حاکی از تغییر تنوع ژنتیکی بین ۰/۶۲-۰/۱۷ و تعداد ۱-۱۶ آلل در جایگاه‌های مختلف ریزماهواره‌ای می‌باشد.

¹ Lake Davis, California

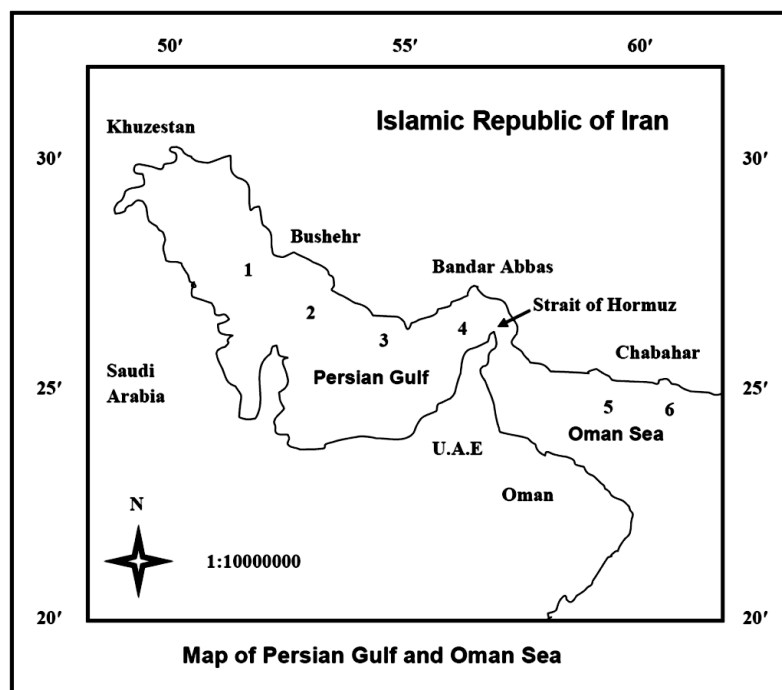
² Hadla, Jamuna and padma rivers

Taylor و همکاران در سال ۲۰۰۷ وجود ۴ زیر جمعیت مجزا را در ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنالیز ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره در ناحیه مرکزی کانادا نشان دادند. نتایج Heist و Schrey در سال ۲۰۰۷ در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس ماهی (*Scaphirhynchus albus*) ۱۶ آغازگر ریزماهواره تاس ماهی را استفاده کردند که تمامی آغازگرها به خوبی تنوع را نشان دادند. دامنه آللی ۷ الی ۱۹، هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۲۲۴ الی ۰/۸۴۳ و دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۲۳۷ الی ۰/۸۶۷ محاسبه گردید.

۳-۴- مواد و روش‌ها

۱-۳-۴- نمونه برداری^۱

در این بررسی پس از مطالعه اولیه و تعیین ایستگاه‌ها ۳-۵ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله سینه‌ای و باله پشتی ۱۸۴ عدد از ماهی‌های سوکلا صید شده در عملیات صیادی کشتی‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات شیلات ایران و صیدگاه‌های شیلات استان بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان در زمستان ۸۵ و بهار ۸۶ جدا و در اتانول خالص فیکس گردید و برای انجام آزمایش و مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در خزرآباد شهرستان ساری منتقل گردید. شکل ۴-۴۰ موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان را نشان می‌دهد. تعداد نمونه‌های مورد مطالعه ۷۳-۵۰ عدد در هر ناحیه و ۴۱-۲۰ عدد در هر منطقه بوده است. جدول ۲-۴ تعداد و پراکنش نمونه‌های جمع‌آوری شده از ماهی سوکلا را در ایستگاه‌های مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۴-۴۰- موقعیت ایستگاه‌های نمونه برداری در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان (۱- ایستگاه بوشهر ۲- ایستگاه بندر دیر ۳- ایستگاه بندر لنگه ۴- ایستگاه بندر عباس ۵- ایستگاه پزم چابهار ۶- ایستگاه بریس چابهار) (Salari Aliabadi, 2008)

¹ Sampling

جدول ۲-۴- تعداد و پراکنش نمونه‌های جمع آوری شده از ماهی سوکلا

تعداد نمونه	نام صیدگاه (ایستگاه)	استان (ناحیه)
۳۹	۱- بوشهر	بوشهر (۶۱)
۲۲	۲- بندر دیر	
۳۲	۳- بندر لنگه	
۴۱	۴- بندر عباس	هرمزگان (۷۳)
۳۰	۵- پزم	
۲۰	۶- بریس	سیستان و بلوچستان (۵۰)

۲-۳-۴- مواد و تجهیزات مورد استفاده و انجام آزمایشات استخراج DNA و الکتروفورز

مواد و تجهیزات مورد استفاده و انجام آزمایشات استخراج DNA و الکتروفورز مشابه بخش ۱، انجام گردید و PCR با استفاده از پرایمرهای آمده در جدول زیر با ترکیب محلول واکنش و برنامه حرارتی و زمانی دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر به اجرا در آمده است.

۳-۳-۴- آماده سازی آغازگر

طراحی آغازگرهای ریزماهورهای براساس ترادف DNA ژنومی ماهی سوکلا توسط Pruettt و همکاران در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت. بعد از مطالعه توالی ژنومی DNA این گونه توسط جستجوی اینترنتی در بانک ژنی (NCBI) ده جفت آغازگر بطول ۱۸-۲۴ باز برای دو سر ژن طراحی و سپس مورد آنالیز کامپیوتری با نرم افزار DNAsis و Oligo قرار گرفت و نهایتاً از شرکت MWG-Biotech برای سنتز سفارش داده شد.

آغازگرهای لیوفیلیزه طبق دستور شرکت سازنده بصورت محلول در آورده شد و بر حسب غلظت آن به نسبت ۱ به ۵ رقیق سازی انجام گرفت و در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری بصورت جداگانه هر کدام ۱۰۰-۲۰ میکرولیتر ریخته و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از آنجایی که داشتن توالی DNA مربوط به یک منطقه خاص از ژنوم یک گونه این اجازه را می‌دهد تا همین منطقه خاص از ژنوم مربوط به گونه‌های بسیار نزدیک یا جمعیت‌های مشابه از یک گونه را با همان یک جفت آغازگر تکثیر گردد لذا برای تمامی مناطق همین ده جفت آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در ماهی سوکلا در جدول ۳-۴ آمده است.

جدول 3-4- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جایگاه‌های مختلف ریزماهورهای ماهی سوکلا (Pruett et al., 2005)

رفرنس	شماره بانک ژنی	دمای اتصال °C	تکرار موتیف	توالی آغازگر	لوکوس
Pruett et al., 2005	AY721664	60	(GTT) ₆	F: 5'-GCAGCCCAATGCTAACAAAGCC-3' R: 5'-CATGTAGTCAAGCGAGCCACG-3'	Rca 1B-A10
Pruett et al., 2005	AY721665	60	(GT) ₉ (CTGT) ₂ (CT) ₂ (GT) ₂	F: 5'-CAGCCTGCTTAGCCTATCA-3' R: 5'-GAAGGATGGACCACCTTGTGAC-3'	Rca 1B-D09
Pruett et al., 2005	AY721666	60	(CT) ₁₈	F: 5'-GTGTTGCAGCCAAATGCTA-3' R: 5'-CTCCCTAGTGCCACTACAGCTC-3'	Rca 1B-E02
Pruett et al., 2005	AY721667A	55	(CA) ₉ GA(CA) ₃ A(CA) ₁₅	F: 5'-CATATCAAGTCAATATCACAGACC-3' R: 5'-CCACGGAATAGCAGACTTTCTC-3'	Rca 1B-E08A
Pruett et al., 2005	AY721667B	60	(CA) ₈ GA(CA) ₃	F: 5'-GCAGTTGATTCTGATTGCTACAC-3' R: 5'-CTAATGCCAGCTCATTATGTCC-3'	Rca 1B-E08B
Pruett et al., 2005	AY721668	55	(CTAT) ₁₅	F: 5'-CAAAGCAAATGCGTGGCCGA-3' R: 5'-CGTTAGCAAACACACGAGCTTG-3'	Rca 1B-F06
Pruett et al., 2005	AY721669	55	(GACA) ₆ (CA) ₁₂	F: 5'-GGAACTCTGTTGGTGGTGCAT-3' R: 5'-CTGTGGCTGAAGCGTGTGTT-3'	Rca 1B-F07
Pruett et al., 2005	AY721670	55	(CT) ₅ TT(CT) ₄	F: 5'-GGAACTCTATAACAGCATGTC-3' R: 5'-GTAGACAGAGCAACACATGAG-3'	Rca 1B-G10
Pruett et al., 2005	AY721671	48	(GATA) ₃₁	F: 5'-CATGTTATTCTCCAACCTCATGG-3' R: 5'-GTGTATCCGCATACTTTTCAG-3'	Rca 1B-H09
Pruett et al., 2005	AY721672	60	(CA) ₉ (CACT) ₄	F: 5'-CACGGACATGCACACTTTAAACC-3' R: 5'-GCTGTTGATGTGGCGAAGCAAC-3'	Rca 1-A04

۴-۳-۴- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Mullis et al., 1985)

برای انجام PCR و تکثیر ژن هدف، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از آغازگرها (۳۰ پیکومول) بعلاوه ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر Taq (۵۰/μ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۸ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده، چند ثانیه سانتیفریوژ و تیوپ‌ها در ترموسایکلر قرار گرفتند و یا برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید، سپس روی یخ ترکیبات جدول ۲-۳ با مقادیر مشخص شده افزوده گردید و محتویات ویال‌ها توسط نمونه‌بردار خوب به هم زده شد و سپس ویال‌ها را به مدت ۱۰ ثانیه سانتیفریوژ کرده تا محتویات لوله‌ها ته نشین گردد (لازم به ذکر است هرگاه در شرایط استاندارد PCR نتیجه‌ای مشاهده نشود مقدار MgCl₂ و تعداد سیکل‌ها تغییر می‌یابد).

جدول ۴-۱- نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA استخراجی	۱۰۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر ≤
آنزیم تک DNA پلیمرز	۵۰/μ	۰/۲ میکرولیتر
DNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	۰/۸ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
آغازگر ۱	۳۰/Variable پیکومول	۱ میکرولیتر
آغازگر ۲	۳۰/Variable پیکومول	۱ میکرولیتر
آب مقطر	—————	تا ۲۵ میکرولیتر

۴-۳-۵- بهینه کردن PCR و پروفیل‌های حرارتی آن

برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید (جدول ۴-۵). در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) غلظت MgCl₂، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs بهینه سازی گردید.

در مورد جایگاه ژنی *Rca 1B-E08B* و *Rca 1B-A10* به دلیل مشاهده باندهای غیراختصاصی و نارسا، از روش Touchdown برای انجام PCR استفاده شد. در این روش، ۱۰ سیکل اول را با ۱۰ درجه سانتی گراد دمای بالاتر از دمای اتصال اصلی انجام داده به طوری که به ازای هر سیکل، یک درجه سانتی گراد دما پایین می آید تا به دمای اتصال اصلی برسد در این دما به تعداد ۲۵ سیکل عمل تکثیر صورت می گیرد که نتیجه آن حذف باندهای غیراختصاصی و نارسا می باشد (شکل ۲-۲ و ۳-۲).

در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ تا ۸ درجه سانتی گراد انتقال می دهیم تا برای آزمایش های بعدی که شامل انتقال بر روی ژل آگارز ۲٪ برای سنجش وجود و کیفیت محصول PCR و پلی اکریل آمید به منظور ایجاد باندهای مورد نظر می باشد در دسترس باشد. پس از آزمایش های فوق، محصولات PCR را به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال می دهیم.

جدول ۵-۴- برنامه های داده شده به دستگاه PCR

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (سانتی گراد)	مراحل
۱	۳	۹۵	واسرشته سازی اولیه
	۰/۵	۹۵	واسرشته سازی ^۱
۳۰	۰/۷۵	۵۵-۶۳	الحاق ^۲
	۱	۷۲	بسط ^۳
۱	۱۰	۷۲	بسط نهایی

۶-۳-۴- الکتروفورز محصول و آنالیز داده ها

الکتروفورز محصول و آنالیز داده ها مانند بخش ۱ انجام شد.

۴-۴- نتایج بررسی مولکولی

۱-۴-۴- نتایج بررسی کمی و کیفیت DNA استخراج شده

استخراج ژنوم هسته ای به روش فنل- کلروفورم درمورد تمامی نمونه های ماهی سوکلا انجام شد. کمی و کیفیت

¹ Denaturation

² Annealing

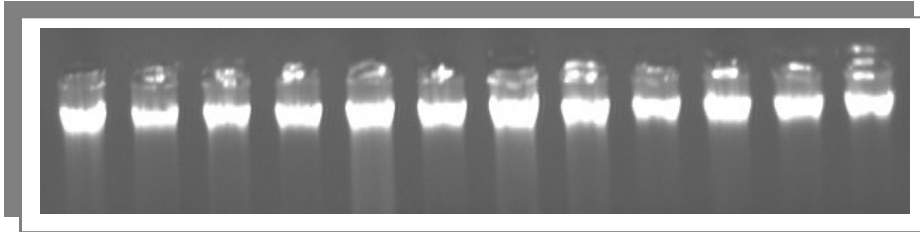
³ Extention

DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و مشاهده با اشعه UV و دستگاه اسپکتروفوتومتر

مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد.

۱-۴-۴-۱-۱ ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNAهای استخراج شده از باله ماهی سوکلا به روش فنل - کلروفورم از کیفیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشند. باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بوده و این بیانگر آن است که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی، فنلی و یا آلودگی به RNA است (شکل ۴۱-۴).



شکل ۳-۲- نمونه‌ای از DNA استخراج شده به روش فنل - کلروفورم بر روی ژل آگارز ۱٪
 ۴-۴-۱-۲- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری

میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm بوسیله اسپکتروفوتومتر محاسبه گردید و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت می‌باشد. نمونه‌هایی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه‌های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی بر اساس فرمول محاسبه شده در کلیه ۱۸۴ نمونه بین ۱۵۰-۲۵۰ ng/l بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA، در غلظت ۱۰۰ ng/l مورد استفاده قرار گرفت.

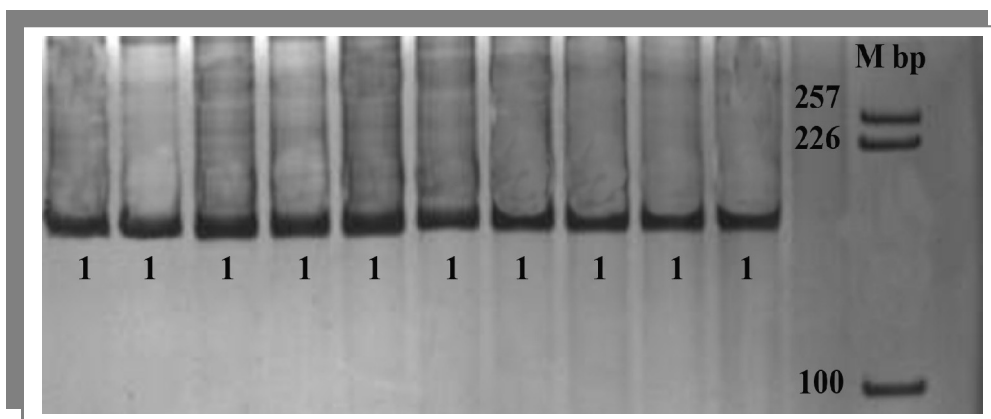
۲-۴-۴- ارزیابی محصول PCR

برای بهینه کردن PCR در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی^۱، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی غلظت $MgCl_2$ ، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs بهینه سازی گردید. به این منظور برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید، سپس روی یخ ترکیبات مورد نظر که شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۲ میکرولیتر Taq، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ می باشد افزوده گردید. سپس حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده و محتویات ویالها توسط سمپلر خوب به هم زده شد و در نهایت چند ثانیه سانتریفوژ کرده تا محتویات لوله ها ته نشین گردد و تیوپ ها در ترموسایکلر قرار گرفتند. پس از قرار دادن نمونه ها در دستگاه PCR مدت ۱/۵ ساعت برای تکمیل برنامه صرف گردید و سپس محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. تصاویر ژل پلی اکریل آمید پس از رنگ آمیزی توسط دستگاه مستند سازی ژل با فرمت TIFF ثبت و ذخیره شده و جهت سنجش وزن مولکولی باندهای محصول PCR بر حسب جفت باز از نرم افزار Lab Image استفاده گردید. هر یک از باندهای مشاهده شده روی ژل های پلی اکریل آمید، نشان دهنده آلل خاصی بودند. مکان قرار گیری این باندها نسبت به هم در نمونه های مختلف از ماهی به ماهی دیگر فرق می کند. امتیازبندی این باندها با توجه به وزن مولکولی شان، بر حسب جفت باز صورت گرفت. مثلا در جایگاه ژنی *Rca* 1B-E02 تعداد آلل مشاهده شده در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۶ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۳۲۴-۲۸۸ جفت باز بود. برای راحتی کار، هریک از آلل ها با یک حرف بزرگ انگلیسی و نیز با یک شماره عددی مشخص شد (علت ۲ نوع نامگذاری این است که وارد کردن اطلاعات به نرم افزارهای متعدد به صورت حروف و یا عدد امکان پذیر است). جایگاه ژنی *Rca* 1B-E02 تعداد ۱۶ آلل داشت که از A تا P یا از ۱۶-۱ نامگذاری شدند. وزن مولکولی سبک ترین آلل برابر ۲۸۸ جفت باز که با حرف A یا عدد ۱ مشخص شد و سنگین ترین آلل دارای وزن مولکولی ۳۲۴ جفت باز که با حرف P یا عدد ۱۶ مشخص گردید و در پایان نتایج زیر به دست آمد.

¹ Temperature Gradients

۱-۲-۴-۴- *Rca 1B-D09* جایگاه ژنی

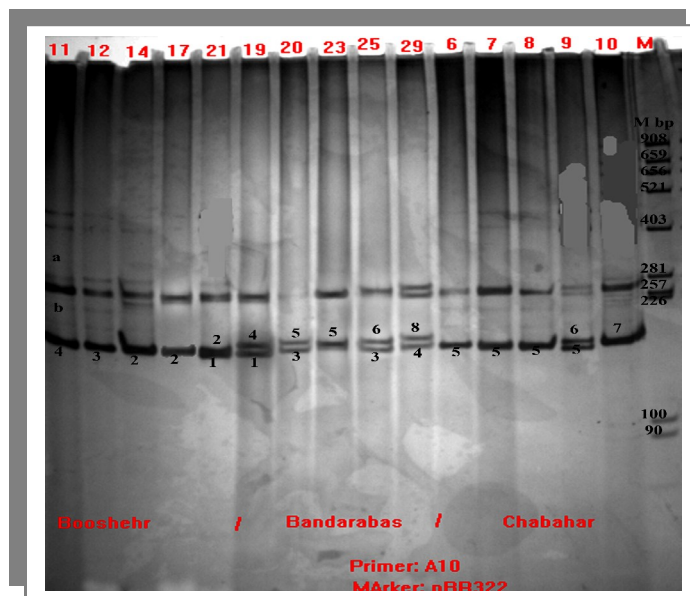
پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه تنها ۱ آلل با وزن مولکولی ۱۶۹ جفت باز بود که نتایج حاکی از مونومورف بودن این جایگاه ژنی می‌باشد. در شکل ۴-۴۲ اندازه آللی ۱۶۹ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بوشهر نشان داده شده است.



شکل ۴-۴۲- محصول PCR و ارایش باندهای DNA با استفاده از آغازگر *Rca 1B- D09*

۲-۲-۴-۴- *Rca 1B-A10* جایگاه ژنی

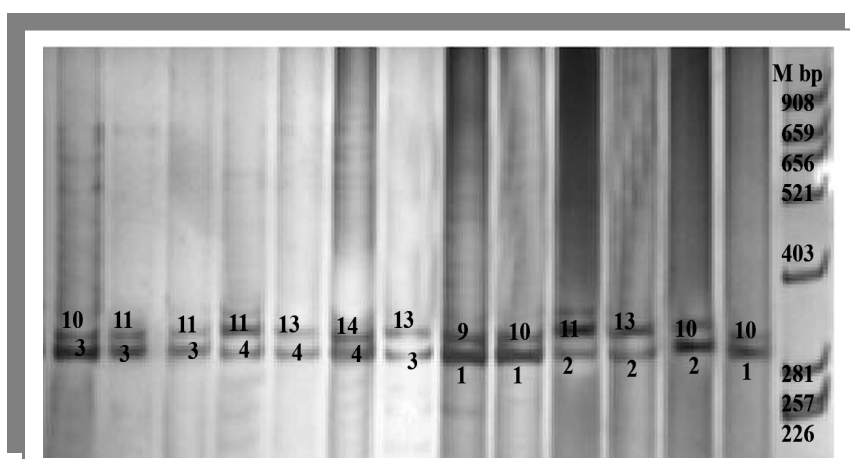
پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۱ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۴ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۱۵۹-۲۰۱ جفت باز بود؛ در شکل ۴-۴۳ اندازه آللی ۱۵۹-۱۸۰ جفت باز متعلق به ۱۵ نمونه از منطقه بوشهر، بندرعباس و یزم چابهار نشان داده شده است. آغازگر مورد استفاده علاوه بر جایگاه ژنی اختصاصی b (۲۰۱-۱۵۹ جفت باز) جایگاه ژنی غیر اختصاصی (a) دیگری با اندازه آللی ۲۵۸-۲۸۰ جفت باز را نیز شناسایی و تکثیر نمود.



شکل ۴-۳-۴- محصول PCR و ارایش باندهای DNA با استفاده از آغازگر Rca 1B-A10

۳-۲-۴-۴- جایگاه ژنی Rca 1B-E02

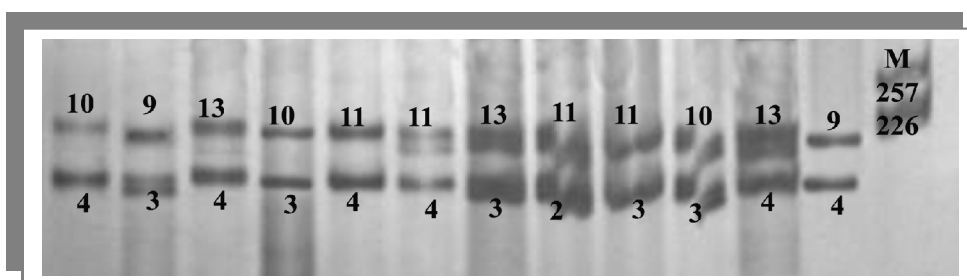
پس از بهینه سازی واکنش های PCR مناسب ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۳ درجه سانتی گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۶ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۲۸۸-۳۲۴ جفت باز بود در شکل ۴-۴۴ اندازه آللی ۲۸۸-۳۱۸ جفت باز متعلق به ۱۳ نمونه منطقه پزم چابهار نشان داده شده است.



۴-۴-۴- محصول PCR و ارایش باندهای DNA با استفاده از Rca 1B-E02

۴-۲-۴-۴-جایگاه ژنی Rca 1B-E08A

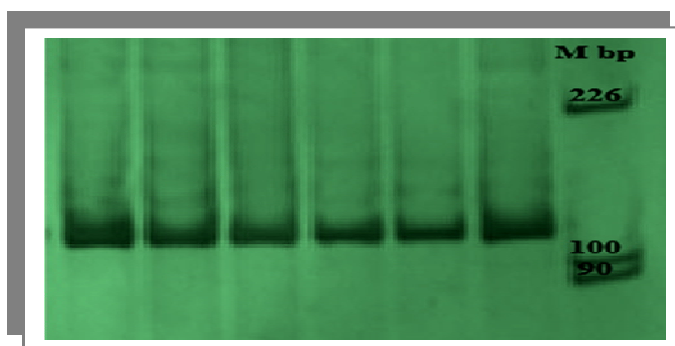
پس از بهینه سازی واکنش های PCR مناسب ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۳ درجه سانتی گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۴ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۲۳۱-۱۹۱ جفت باز بود؛ در شکل ۴-۴۵ اندازه آللی ۲۲۷-۱۹۳ جفت باز متعلق به ۱۲ نمونه منطقه بندرعباس نشان داده شده است.



شکل ۴-۴۵- محصول PCR و ارایش باندهای DNA با استفاده از Rca 1B-E08A

۴-۲-۴-۵-جایگاه ژنی Rca 1B-E08B

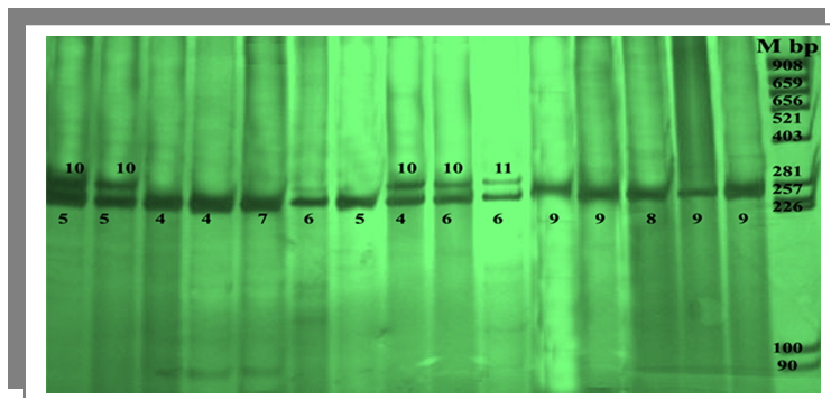
پس از بهینه سازی واکنش های PCR مناسب ترین دما برای اتصال این آغازگر ۵۵ درجه سانتی گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه تنها ۱ آلل با وزن مولکولی ۱۱۶ جفت باز بود که نتایج حاکی از مونومورف بودن این جایگاه ژنی می باشد. در شکل ۴-۴۶ اندازه آللی ۱۱۶ جفت باز متعلق به نمونه های منطقه بندرعباس نشان داده شده است.



شکل ۴-۴۶- محصول PCR و ارایش باندهای DNA با استفاده از Rca 1B-E08B

۶-۲-۴-۴-جایگاه ژنی *Rca 1B-F06*

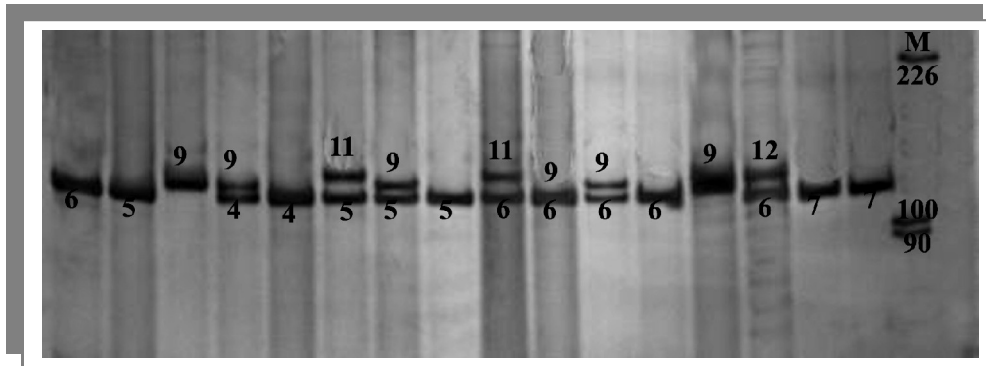
پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۷ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۲۳۴-۳۱۶ جفت باز بود در شکل ۴-۴۷ اندازه آللی ۲۸۶-۲۵۷ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه دیر نشان داده شده است.



شکل ۴-۴۷- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر *Rca 1B- F06*

۷-۲-۴-۴-جایگاه ژنی *Rca 1B-F07*

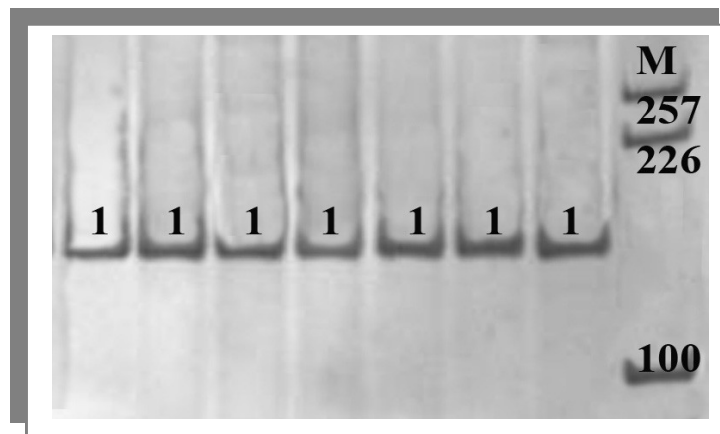
پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۶ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۱۱۴-۱۵۴ جفت باز بود در شکل ۴-۴۸ اندازه آللی ۱۳۶-۱۲۰ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بوشهر نشان داده شده است.



شکل ۴-۴۸- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر Rca 1B- F07

۸-۲-۴-۴- جایگاه ژنی Rca 1B-G10

پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۲/۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه تنها ۱ آلل با وزن مولکولی ۱۵۷ جفت باز بود که نتایج حاکی از مونومورف بودن این جایگاه ژنی می‌باشد. در شکل ۴۹-۴۹ اندازه آللی ۱۵۷ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بندرلنگه نشان داده شده است.

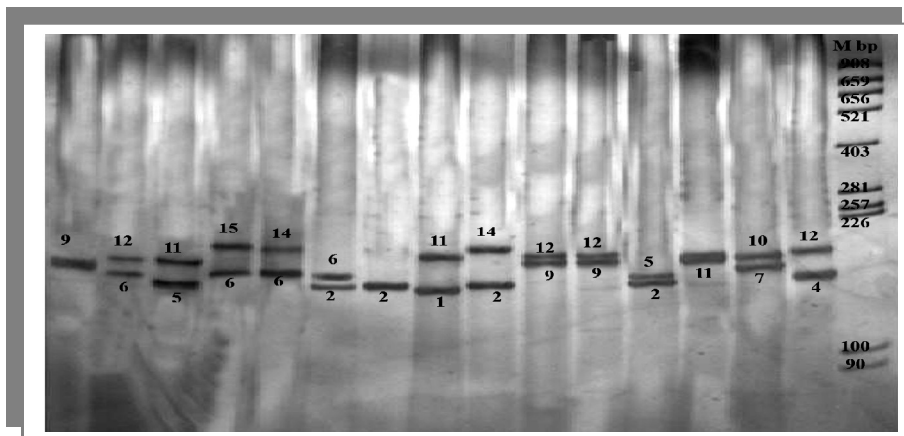


شکل ۴-۴۹- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر Rca 1B- G10

۹-۲-۴-۴- جایگاه ژنی Rca 1B- H09

پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۸ آلل و دامنه اندازه آللی

بین ۱۵۰-۲۲۶ جفت باز بود در شکل ۴-۵۰ اندازه آللی ۱۵۰-۲۰۶ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بریس چابهار نشان داده شده است.

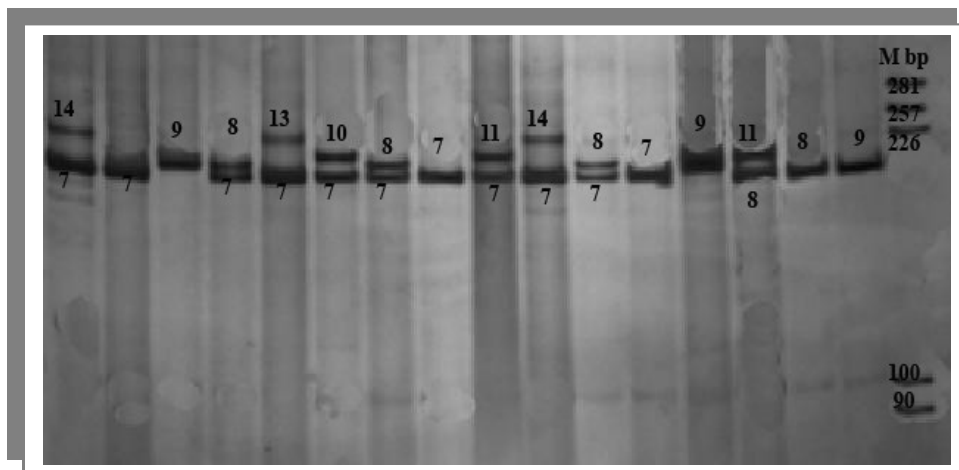


شکل ۴-۵۰- محصول PCR و آرایش باندهای DNA

ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر Rca 1B- H09

۱۰-۲-۴-۴-جایگاه ژنی Rca 1- A04

پس از بهینه سازی واکنش‌های PCR مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه بدست آمد. تعداد آلل مشاهده شده برای این جایگاه ژنی در ۱۸۴ نمونه مورد مطالعه ۱۶ آلل و دامنه اندازه آللی بین ۱۸۴-۲۲۲ جفت باز بود. در شکل ۴-۵۱ اندازه آللی ۲۰۴-۲۲۰ جفت باز متعلق به نمونه‌های منطقه بریس چابهار نشان داده شده است.



شکل ۴-۵۱- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی سوکلا با استفاده از آغازگر Rca 1B- A04

طبق جدول ۷-۴ در مجموع از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای بررسی شده در ماهی سوکلا، ۷ جفت آنها پلی مورف و ۳ جفت آنها مونومورف بوده است که جزئیات محاسباتی آن آورده شده است. همچنین یک جفت آغازگر در دو جایگاه ژنی باند تولید کرد یا به عبارتی ۱۱ جایگاه ژنی تولید باند DNA نمودند که از بین آنها ۸ جایگاه ژنی پلی مورفیسم و ۳ جایگاه ژنی مونومورف بودند.

جدول 4-6- خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاه‌های ریزم‌هاورهای بررسی شده در ماهی سوکلا

دمای اتصال °C	تعداد د چرخه	تعداد آلل	محدوده آللی (جفت باز)	توالی تکراری	توالی پرایمر	لوکوس
61	30	14	159-201	(GTT) ₆	F: 5'-GCAGCCCAATGCTAACAAAGCC-3' R: 5'-CATGTAGTCAAGCGGACCCACG-3'	<i>Rca</i> 1B-A10
60	35	1	169	(GT) ₉ (CTGT) ₂ (CT) ₂ (GT) ₂	F: 5'-CAGCCTGCTTAGCCTATCA-3' R: 5'-GAAAGGATGGACCACCTTGTGAC-3'	<i>Rca</i> 1B-D09
63	30	16	288-324	(CT) ₁₈	F: 5'-GTGTTGCAGCCCAAATGCTA-3' R: 5'-CTCCCTAGTGCCACTACAGCTC-3'	<i>Rca</i> 1B-E02
63	30	14	191-231	(CA) ₃ GA(CA) ₅ A(CA) ₁₆	F: 5'-CATATCAAGTCAATATCACAGACC-3' R: 5'-CCACGGAATAGCAGACTTTTCTC-3'	<i>Rca</i> 1B-E08A
55	30	1	116	(CA) ₈ GA(CA) ₃	F: 5'-GCAGTTGATTTCTGATTGCTACAC-3' R: 5'-CTAATGCCAGCTCATTATGTCC-3'	<i>Rca</i> 1B-E08B
58	35	17	234-316	(CTAT) ₁₅	F: 5'-CAAAGCAAATGCGTGGCCGA-3' R: 5'-CGTTAGCAAACCCACAGAGCTTG-3'	<i>Rca</i> 1B-F06
55	30	16	114-154	(GACA) ₆ (CA) ₁₂	F: 5'-GGAATCTGGTGGTGAATGTCAT-3' R: 5'-CTGTGGCTGAAGCGTGTGTT-3'	<i>Rca</i> 1B-F07
62/8	30	1	157	(CT) ₅ TT(CT) ₄	F: 5'-GGAACTCTATAACAGCATGTC-3' R: 5'-GTAGACAGAGCAAACACATGAG-3'	<i>Rca</i> 1B-G10
60	30	18	150-226	(GATA) ₃₁	F: 5'-CATGTTATTCTCCAACTCATGG-3' R: 5'-GTGTATCCGCATACTTTTCAG-3'	<i>Rca</i> 1B-H09
60	30	16	184-222	(CA) ₉ (CACT) ₄	F: 5'-CACGCACATGCACACTTTAAACC-3' R: 5'-GCTGTTGATGTGGGAAAGCAAC-3'	<i>Rca</i> 1-A04

۳-۴-۴- آلل‌های پلی‌مورف (چند شکلی)

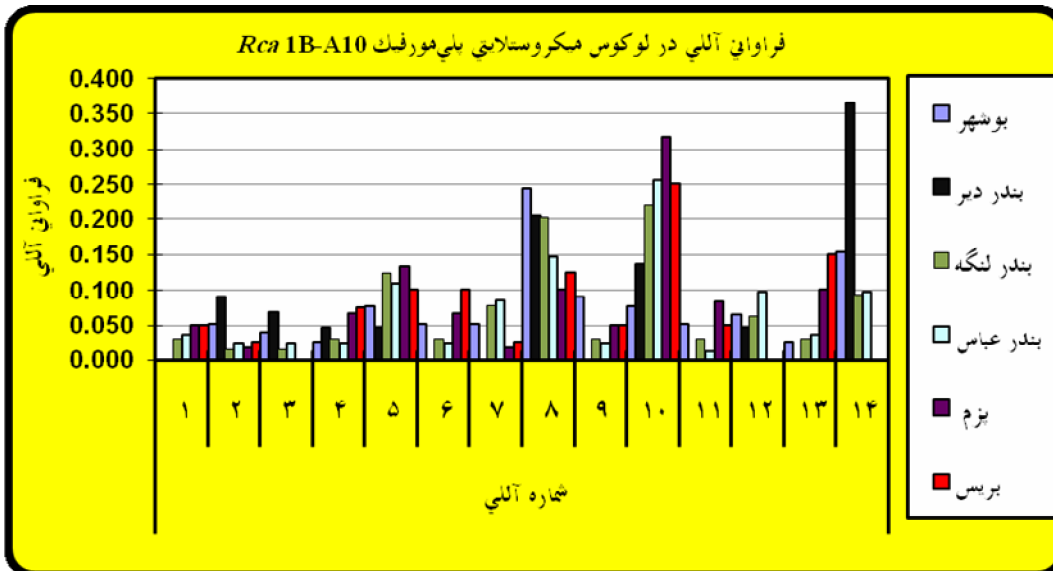
مطابق با تعریف پلی‌مورف بودن در مجموع از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهورای بررسی شده در ماهی سوکلا، ۷ جفت آنها پلی‌مورف بوده است چرا که فراوانی آللی در آنها کمتر از ۹۹ درصد می‌باشد. آلل‌ها و اندازه‌های آن (جفت باز) در ده جایگاه ژنی مختلف ریزماهورای مورد مطالعه در ماهی سوکلا در جدول ۳-۲ آمده است. فراوانی آللی جایگاه‌های مختلف ریزماهورای پلی‌مورفیک مورد مطالعه در ماهی سوکلا برحسب مناطق نمونه‌برداری در جداول ۳-۳ الی ۳-۹ و شکل‌های ۳-۱۴ الی ۳-۲۰ آمده است.

بر اساس داده‌های فراوانی آللی جایگاه‌های مختلف ریزماهورای پلی‌مورفیک مشاهده می‌شود که حداکثر تعداد آللی در تمام مناطق نمونه‌برداری در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* با آلل ۱۸ و حداقل آن در جایگاه ژنی پلی‌مورفیک *Rca 1B-A10* و *Rca 1B-E08A* با آلل ۱۴ دیده می‌شود.

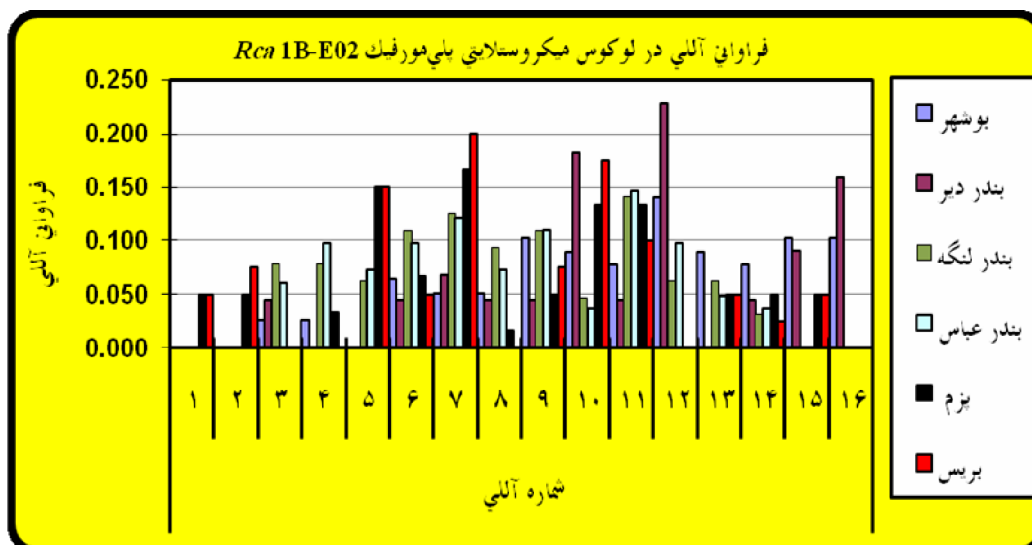
در تمام مناطق نمونه‌برداری بیشترین تعداد آلل با فراوانی بیش از ۰/۰۵ در جایگاه ژنی *Rca 1B-E02* با آلل ۵۶ و کمترین تعداد آلل با فراوانی بیش از ۰/۰۵ در جایگاه ژنی *Rca 1B-FO6* با آلل ۳۸ مشاهده می‌شود.

در جایگاه ژنی *Rca 1B-A10* حداکثر فراوانی آللی ۰/۳۶۴ مربوط به آلل ۱۴ یا N در منطقه دیر و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۲ مربوط به آلل ۱۱ یا K در منطقه بندرعباس می‌باشد. در جایگاه ژنی *Rca 1B-E02* حداکثر فراوانی آللی ۰/۲۲۷ مربوط به آلل ۱۲ یا L در منطقه دیر و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۷ مربوط به آلل ۸ یا H در منطقه پزم است. در جایگاه ژنی *Rca 1B-E08A* حداکثر فراوانی آللی ۰/۲۹۵ مربوط به آلل ۱۴ یا N در منطقه دیر و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۲ مربوط به آلل‌های ۱۲ یا L در منطقه بندرعباس می‌باشد. در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* حداکثر فراوانی آللی ۰/۳۷۵ مربوط به آلل ۱۰ یا J در منطقه بندرلنگه و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۲ مربوط به آلل‌های ۲، ۳ و ۱۴ یا A، B و N در منطقه بندرعباس می‌باشد. در جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* حداکثر فراوانی آللی ۰/۲۲۵ مربوط به آلل ۸ یا H در منطقه بريس و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۳ مربوط به آلل‌های ۶، ۱۱ و ۱۵ یا F، K و O در منطقه بوشهر می‌باشد. در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* حداکثر فراوانی آللی ۰/۲۲۷ مربوط به آلل ۱ یا A در منطقه بندر دیر و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۲ مربوط به آلل‌های ۹، ۱۱ و ۱۵ یا I، K و O در منطقه بندرعباس می‌باشد. در جایگاه ژنی *Rca 1-A04* حداکثر فراوانی آللی ۰/۴۱۷ مربوط به آلل ۱۶ یا P در منطقه پزم و حداقل فراوانی آللی ۰/۰۱۶ مربوط به آلل‌های ۵، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۵ یا E، I، J، L و N در منطقه بندرلنگه می‌باشد.

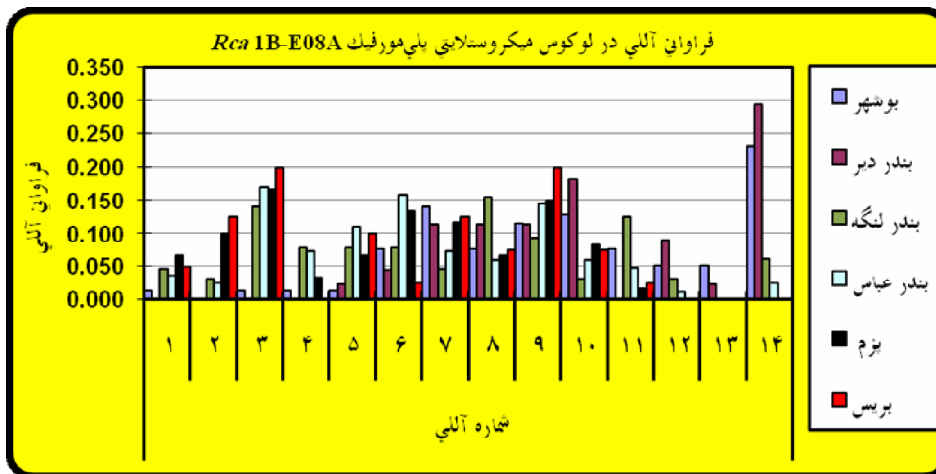
در جدول ۴-۸ فراوانی آللی هفت جایگاه ژنی مختلف پلی‌مورفیک در کل ماهیان سوکلا مورد مطالعه بدون در نظر گرفتن مناطق نمونه‌برداری آمده است



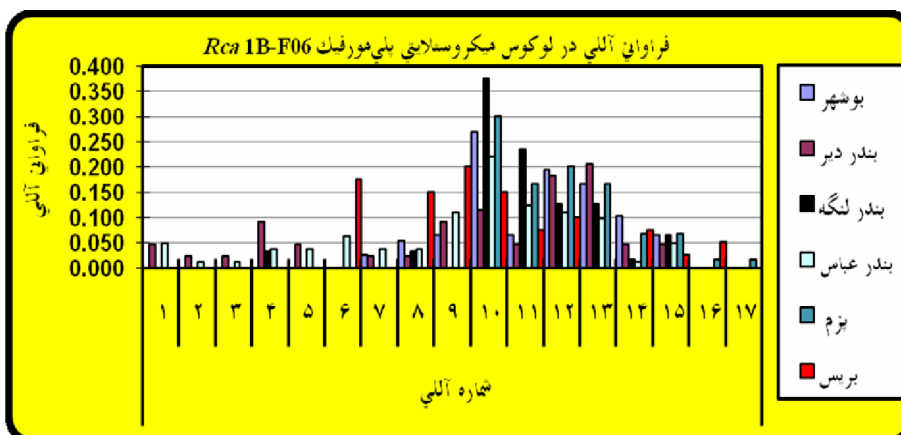
شکل ۵۲-۴- فراوانی آلی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک *Rca 1B-A10* بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



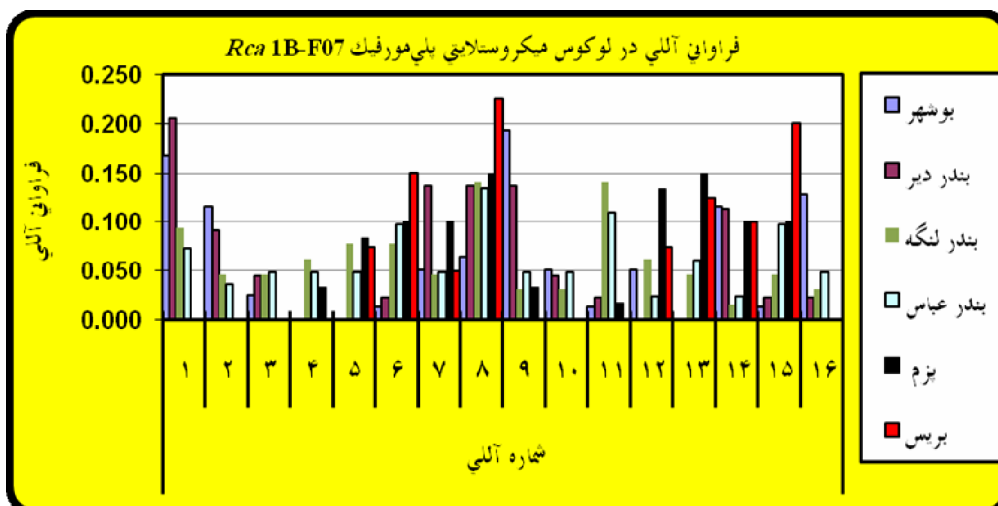
شکل ۵۳-۴- فراوانی آلی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک *Rca 1B-E02* بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



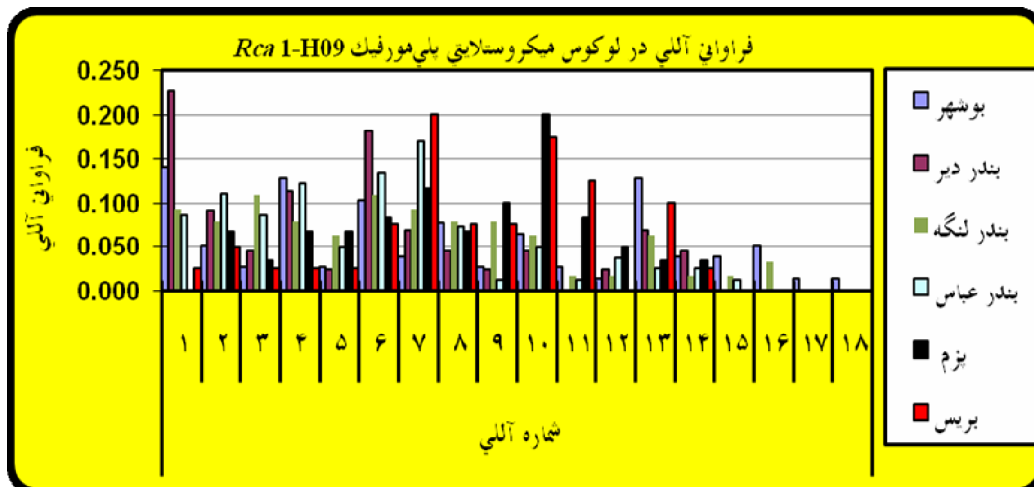
شکل ۵۴-۳- فراوانی آللی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک Rca 1B-E08A برحسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



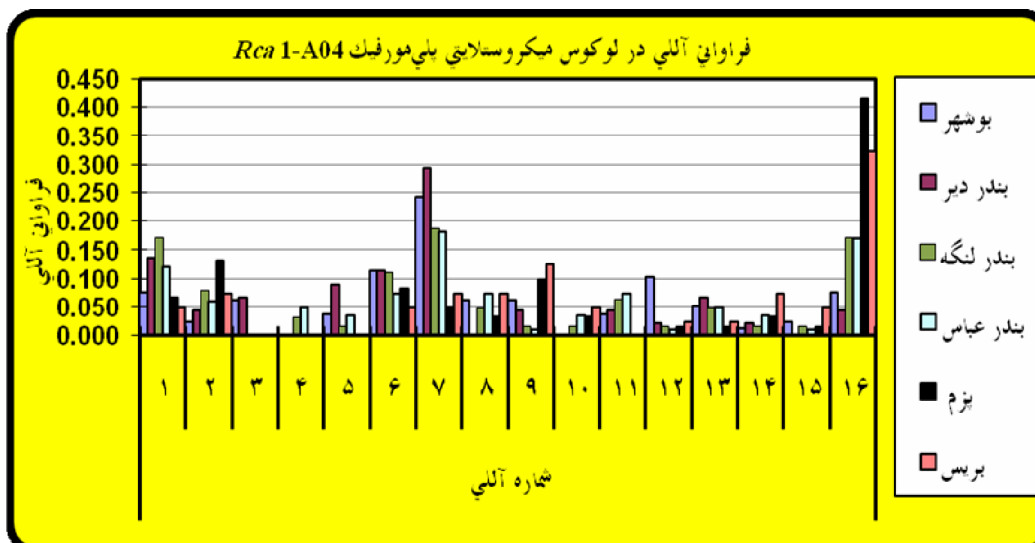
شکل ۵۵-۴- فراوانی آللی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک Rca 1B-F06 برحسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



شکل ۵۶-۴- فراوانی آللی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک Rca 1B-F07 برحسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



شکل ۵۷-۴- فراوانی آلی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک Rca 1B-H09 بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا



شکل ۵۸-۴- فراوانی آلی در جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک Rca 1-A04 بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا

جدول 4-8- فراوانی هفت جایگاه ژنی مختلف پلی مورفیک در کل ماهیان سوکلا مورد مطالعه (184 نمونه) بدون در نظر گرفتن مناطق نمونه برداری

<i>Rca</i> 1-A04	<i>Rca</i> 1B-H09	<i>Rca</i> 1B-F07	<i>Rca</i> 1B-F06	<i>Rca</i> 1B-E08A	<i>Rca</i> 1B-E02	<i>Rca</i> 1B-A10	شماره آللی
۰/۰۰۴	۰/۰۹۵	۰/۰۹۰	۰/۰۱۶	۰/۰۳۵	۰/۰۱۷	۰/۰۲۸	A
۰/۰۷۰	۰/۰۷۴	۰/۰۴۸	۰/۰۰۶	۰/۰۴۷	۰/۰۲۱	۰/۰۳۷	B
۰/۰۲۲	۰/۰۵۴	۰/۰۲۸	۰/۰۰۶	۰/۰۱۵	۰/۰۳۵	۰/۰۲۴	C
۰/۰۱۳	۰/۰۸۹	۰/۰۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۲۳	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	D
۰/۰۳۰	۰/۰۴۲	۰/۰۴۸	۰/۰۱۴	۰/۰۶۵	۰/۰۷۳	۰/۰۹۸	E
۰/۰۹۱	۰/۰۱۴	۰/۰۷۷	۰/۰۳۹	۰/۰۸۶	۰/۰۷۲	۰/۰۴۶	F
۰/۰۷۳	۰/۰۱۵	۰/۰۷۲	۰/۰۱۴	۰/۰۰۳	۰/۰۲۲	۰/۰۴۳	G
۰/۰۴۹	۰/۰۶۹	۰/۰۴۲	۰/۰۴۹	۰/۰۹۲	۰/۰۴۷	۰/۰۷۰	H
۰/۰۶۰	۰/۰۵۲	۰/۰۷۴	۰/۰۷۷	۰/۰۳۷	۰/۰۸۲	۰/۰۴۱	I
۰/۰۲۳	۰/۰۹۹	۰/۰۲۹	۰/۰۳۸	۰/۰۹۳	۰/۰۱۱	۰/۰۲۹	J
۰/۰۳۷	۰/۰۴۴	۰/۰۵۰	۰/۰۱۸	۰/۰۴۹	۰/۰۱۷	۰/۰۲۸	K
۰/۰۳۲	۰/۰۲۳	۰/۰۵۸	۰/۰۵۱	۰/۰۳۱	۰/۰۸۸	۰/۰۴۵	L
۰/۰۴۳	۰/۰۶۹	۰/۰۶۴	۰/۰۲۷	۰/۰۱۲	۰/۰۵۰	۰/۰۵۷	M
۰/۰۳۳	۰/۰۳۰	۰/۰۷۸	۰/۰۵۳	۰/۰۰۲	۰/۰۴۴	۰/۰۱۸	N
۰/۰۲۰	۰/۰۱۱	۰/۰۸۰	۰/۰۵۲	-	۰/۰۴۹	-	O
۰/۲۰۱	۰/۰۱۴	۰/۰۳۸	۰/۰۱۱	-	۰/۰۴۴	-	P
-	۰/۰۰۲	-	۰/۰۰۳	-	-	-	Q
-	۰/۰۰۲	-	-	-	-	-	R

۴-۴-۴- آلل‌های اختصاصی^۱

بر اساس داده‌های فراوانی آللی جایگاه‌های مختلف ریزماهورای پلی‌مورفیک مجموعاً ۱۴ آلل اختصاصی (آلل‌های ستاره دار* جداول ۳-۳ الی ۳-۹) مشاهده می‌شود که حداکثر آن در نمونه‌های منطقه بوشهر با ۵ آلل و حداقل آن در نمونه‌های منطقه پزم با ۱ آلل دیده می‌شود. بیشترین آلل اختصاصی منحصر به فرد (آلل‌های دو ستاره دار** جداول ۳-۳ الی ۳-۹) در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* با ۲ آلل و کمترین آن در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* با ۱ آلل دیده می‌شود.

پرایم‌هایی که بیشترین آلل اختصاصی را نشان دادند به ترتیب *Rca 1-A04*، *Rca 1B-F07*، *Rca 1B-H09* و *Rca 1B-F06* با ۵، ۳، ۲ و ۲ آلل اختصاصی در کل مناطق نمونه‌برداری می‌باشند. در مقایسه نمایش بیشترین تعداد آلل‌های اختصاصی هر جایگاه ژنی در هر منطقه نمونه برداری، *Rca 1-A04* با نمایش ۳ آلل اختصاصی در منطقه بریس و در آلل‌های شماره ۱۰، ۱۴ و ۱۵ و *Rca 1B-F07* با نمایش ۲ آلل اختصاصی در منطقه بوشهر و در آلل‌های شماره ۱۰ و ۱۶ را از خود نشان دادند.

بر اساس فراوانی آلل‌های اختصاصی جایگاه‌های مختلف پلی‌مورفیک مورد مطالعه، اگر نمونه‌ای از ماهی سوکلا دارای آلل شماره ۱۳ در جایگاه ژنی *Rca 1B-E08A* و آلل‌های شماره ۱۰ و ۱۶ در جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* و آلل شماره ۱۶ در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* و آلل شماره ۱۲ در جایگاه ژنی *Rca 1-A04* باشد متعلق به منطقه بوشهر است. همچنین اگر نمونه‌ای از ماهی سوکلا دارای آلل شماره ۱۶ در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* و آلل‌های شماره ۱۰، ۱۴ و ۱۵ در جایگاه ژنی *Rca 1-A04* باشد متعلق به منطقه بریس چابهار است.

اگر نمونه‌ای از ماهی سوکلا دارای آلل شماره ۳ در جایگاه ژنی *Rca 1B-A10* و آلل شماره ۴ در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* و آلل شماره ۵ در جایگاه ژنی *Rca 1-A04* باشد متعلق به منطقه دیر از ناحیه بوشهر است.

۵-۴-۴- آلل‌های واقعی^۲ (Na) و موثر^۳ (Ne)

معیار دیگری که برای تعیین میزان چند شکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود تعداد آلل واقعی و موثر است. در بررسی آللی برای تعیین میزان پلی‌مورفیسم بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۸ آلل در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09*

¹ Private Alleles

² Real Alleles Number

³ Effective Alleles Number

(نمونه‌های منطقه بوشهر) و کمترین تعداد آلل مشاهده شده ۸ آلل در جایگاه‌های *Rca* 1B-A10 (نمونه‌های منطقه بندر دیر)، *Rca* 1B-F06 (نمونه‌های منطقه بندرلنگه و پزم) و *Rca* 1B-F07 (نمونه‌های منطقه بریس) می‌باشد. در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۱۴/۲۸۶ آلل و کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بریس با ۱۰/۵۷۱ آلل می‌باشد. در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۹/۷۴۰ آلل و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه دیر با ۷/۰۵۹ آلل می‌باشد. در مقایسه جایگاه‌های هفت گانه مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۴/۶۶۷ آلل در جایگاه ژنی *Rca* 1B-H09 و کمترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۰/۵ آلل در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 می‌باشد. در مقایسه جایگاه‌های هفت گانه مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل موثر ۱۰/۰۵۳ آلل در جایگاه ژنی *Rca* 1B-H09 و کمترین تعداد آلل موثر ۶/۷۱۱ آلل در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 می‌باشد. در میان مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاه‌های هفت گانه مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل موثر ۱۲/۹۳۱ در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F07 در منطقه بندرعباس و کمترین تعداد آلل موثر ۴/۲۹۴ در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 و در منطقه بندرلنگه می‌باشد. در میان مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاه‌های هفت گانه مورد مطالعه میانگین تعداد آللی مشاهده شده ۱۲/۳۵۷ و میانگین تعداد آللی موثر ۸/۳۱۹ می‌باشد.

جدول 9-4- تعداد آل‌های واقعی (Na) و موثر (Ne) در هفت جایگاه ژنی ریزماهواره پلی‌مورفیک بر حسب مناطق مختلف نمونه‌برداری در ماهی سوکلا

منطقه	خطای معیار		میانگین		بریس		بزم		بندرعباس		بندرلنگه		بندر دیر		بوشهر		منطقه
	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	
	/302	/317	/532	/964	/006	/833	/407	/272	/624	/14	/699	/14	/722	/8	/311	13	A10
	1	2	0	0	7	11	7	6	7	14	7	14	4	8	8		
	/487	/894	/607	/365	/458	12	/000	/375	/377	12	/503	12	/389	11	/102	13	E02
	1	0	0	0	9	8	8	6	10	10	10	12	7	11	11		
	/502	/761	/613	/719	/189	/500	/339	/824	/013	13	/169	13	/867	9	/901	13	E08A
	1	1	0	0	8	11	7	8	9	13	10	13	5	7			
	/877	/146	/766	/286	/711	/500	/143	/128	/013	15	/294	8	/566	14	/121	9	F06
	1	3	0	1	6	10	7	5	9	15	4	8	8	6			
	/506	/077	/023	/256	/464	/667	/557	/911	/931	16	/118	16	/000	12	/266	13	F07
	2	3	1	1	9	12	6	8	12	16	12	16	8	8			
	/771	/066	/723	/843	/053	/667	/421	/890	/830	15	/564	16	/000	13	/611	18	H09
	1	2	0	0	10	14	8	9	9	15	12	16	8	11			
	/763	/506	0/72	/615	/356	/333	/452	/557	/391	15	/127	15	/865	12	/741	14	A04
	1	1	0	0	7	13	6	4	9	15	8	15	6	8			
	/744	/109	/712	/861	/319	/357	/331	/565	/740	286	/356	429	/059	286	/865	29	X
	1	2	0	0	8	12	7	7	9	14	9	13	7	11	8	13	
	/148	/309	0/06	/126	/509	/511	/269	/827	/622	522	/089	066	/513	808	/719	993	S.E.
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	/391	/818	0/16	/334	/346	/352	/713	/189	/646	1/38	/881	2/82	/358	/138	/901	2/62	S.D.
	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	1	

۶-۴-۴- تنوع ژنتیکی

در بررسی و مطالعات تنوع ژنتیکی درون جمعیتی یک گونه از معیارهای همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) برای هر منطقه در هر جایگاه ژنی و بازای هر جایگاه ژنی در تمامی مناطق، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه‌های هفت گانه بین ۰/۱۵-۱ با میانگین ۰/۶۵۵ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* و کمترین مقدار در جایگاه ژنی *Rca 1B-E08A* در نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه بریس می‌باشد.

دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه‌های هفت گانه بین ۰/۷۶۷-۰/۹۲۳ با میانگین ۰/۸۷۴ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* در نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه بندرعباس و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* مربوط به منطقه بندرلنگه می‌باشد.

مقادیر Ho و He در سطح جایگاه ژنی نیز برای کل نمونه‌ها محاسبه گردید که سطح تغییر پذیری هر جایگاه ژنی را در کل مناطق مورد بررسی نشان می‌دهد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در کل مناطق مورد بررسی ۱ مربوط به جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* و کمترین مقدار آن ۰/۳۰۷ مربوط به جایگاه ژنی *Rca 1B-E08A* می‌باشد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در کل مناطق مورد بررسی ۰/۸۹۸ مربوط به جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* و کمترین مقدار آن ۰/۸۴۰ مربوط به جایگاه‌های *Rca 1B-F06* می‌باشد.

محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در تمام مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاه‌ها (به غیر از *Rca 1B-H09*) کاهش هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر He نسبت به Ho وجود دارد.

تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژنی بصورت هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناآریب (He) در هر جایگاه ژنی و برای هر جمعیت به همراه میانگین‌ها و انحراف معیارها در جدول ۱۰-۴ خلاصه شده است.

۷-۴-۴-شاخص اطلاعات شانون (H')

چون حد نهایی هتروزیگوسیتی یک است و تفاوت میان مقادیر بین صفر و یک به خصوص برای نشانگرهای بسیار چند شکلی مثل ریزماهورها (که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا کمتر دارند) به میزانی نمی‌باشد که اطلاعات دقیقی را بیان کند بنابراین برای بزرگنمایی این مقادیر شاخص اطلاعات Shannon (H') استفاده شد. این شاخص در سطح جمعیت، معیار مناسبی برای ارزیابی چند شکلی و میزان تغییر پذیری جایگاه‌های مورد مطالعه فراهم می‌نماید.

شاخص اطلاعات شانون (H') برای هر ۴۲ ترکیب مختلف لوکوس - جمعیت یعنی برای هر جمعیت در تمامی لوکوس‌ها و بازاء هر جایگاه ژنی برای تمامی جمعیت‌ها بانضمام انحراف معیارهای مربوطه محاسبه گردید که نتایج حاصله در جدول شماره ۳-۱۳ خلاصه گردیده است. بیشترین مقدار شاخص شانون در بین ۴۲ ترکیب از آن جایگاه ژنی Rca 1B-F07 در منطقه بندرعباس (۲/۶۶۲) با ۱۶ آلل و کمترین آن متعلق به جایگاه ژنی Rca 1B-F06 در منطقه بندرلنگه (۱/۶۸۳) با ۸ آلل می‌باشد.

به هنگام مقایسه جایگاه‌ها با در نظر گرفتن تمام مناطق نمونه برداری نیز بیشترین مقدار شاخص اطلاعات شانون (۲/۴۵۴) مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-H09 است که در مجموع ۱۸ آلل دارد و کمترین مقدار (۲/۰۴۵) نیز مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-F06 می‌باشد.

متوسط شاخص اطلاعات شانون برای تمام جایگاه‌ها بالا می‌باشد.

شاخص اطلاعاتی شانون در لوکوس‌های مختلف بر حسب نواحی مختلف نمونه برداری سه گانه بانضمام انحراف معیارهای مربوطه نیز محاسبه گردید که نتایج حاصله در جدول شماره ۳-۱۴ آمده است.

بیشترین مقدار شاخص شانون در بین ۲۱ ترکیب از آن جایگاه ژنی Rca 1B-F07 در ناحیه بندرعباس (۲/۶۶۳) با ۱۶ آلل و کمترین آن متعلق به جایگاه ژنی Rca 1B-A04 در ناحیه چابهار (۲/۰۶۷) با ۱۲ آلل می‌باشد.

به هنگام مقایسه جایگاه‌ها با در نظر گرفتن تمام نواحی نمونه برداری سه گانه بیشترین مقدار شاخص اطلاعات شانون (۲/۵۲۳) مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-H09 با میانگین ۱۶ آلل و کمترین مقدار (۲/۱۹۲) نیز مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-F06، با میانگین ۱۳/۳ آلل می‌باشد.

جدول ۱۱-۴- شاخص اطلاعاتی شانون در لوکوس‌های مختلف بر حسب مناطق مختلف نمونه‌برداری

X	بریس	پزم	بندرعباس	بندرلنگه	بندر دیر	بوشهر	لوکوس
۲,۱۶۴	۲,۱۸۰	۲,۰۹۸	۲,۲۸۵	۲,۲۹۱	۱,۷۸۷	۲,۳۴۲	Rca 1B-A10
۲,۳۴۶	۲,۲۲۲	۲,۳۸۱	۲,۴۰۴	۲,۴۱۲	۲,۱۸۳	۲,۴۷۳	Rca 1B-E02
۲,۲۲۴	۲,۱۱۷	۲,۲۶۳	۲,۳۴۵	۲,۴۳۰	۱,۹۴۲	۲,۲۴۷	Rca 1B-E08A
۲,۰۴۵	۲,۰۵۷	۱,۷۷۸	۲,۴۱۲	۱,۶۸۳	۲,۳۶۴	۱,۹۷۷	Rca 1B-F06
۲,۳۳۸	۱,۹۷۱	۲,۲۶۱	۲,۶۶۲	۲,۶۲۶	۲,۲۳۰	۲,۲۷۲	Rca 1B-F07
۲,۴۵۴	۲,۳۱۱	۲,۴۲۹	۲,۴۴۰	۲,۶۱۳	۲,۲۹۸	۲,۶۳۴	Rca 1B-H09
۲,۲۴۶	۲,۱۸۶	۱,۹۴۶	۲,۴۳۳	۲,۳۱۹	۲,۱۹۷	۲,۳۹۶	Rca 1-A04
۲,۲۷۰	۲,۱۵۰	۲,۱۶۵	۲,۴۲۶	۲,۳۳۹	۲,۱۴۳	۲,۳۹۶	X
۰/۰۴۴	۰/۰۳۷	۰/۰۷۸	۰/۰۳۸	۰/۱۰۴	۰/۰۶۷	۰/۰۶۶	S.E.
۰/۰۲۰	۰/۱۱۲	۰/۲۳۷	۰/۱۱۸	۰/۳۱۷	۰/۲۰۵	۰/۲۰۵	S.D.

جدول ۱۲-۴- شاخص اطلاعاتی شانون در لوکوس‌های مختلف بر حسب نواحی مختلف نمونه‌برداری

میانگین		چابهار		بندرعباس		بوشهر		نواحی
H'	Na	H'	Na	H'	Na	H'	Na	لوکوس
۲/۲۳۰	۱۲/۷	۲,۱۴۱	۱۱	۲,۲۹۷	۱۴	۲,۲۵۳	۱۳	Rca 1B-A10
۲/۳۹۴	۱۲/۷	۲,۳۴۱	۱۳	۲,۴۱۳	۱۲	۲,۴۲۸	۱۳	Rca 1B-E02
۲/۲۸۲	۱۲/۳	۲,۲۳۹	۱۱	۲,۴۲۴	۱۳	۲,۱۸۴	۱۳	Rca 1B-E08A
۲/۱۹۲	۱۳/۳	۲,۱۷۵	۱۱	۲,۲۱۶	۱۵	۲,۱۸۴	۱۴	Rca 1B-F06
۲/۳۸۹	۱۳/۳	۲,۱۹۳	۱۱	۲,۶۶۳	۱۶	۲,۳۱۲	۱۳	Rca 1B-F07
۲/۵۲۳	۱۶	۲,۴۳۴	۱۴	۲,۵۵۹	۱۶	۲,۵۷۷	۱۸	Rca 1B-H09
۲/۲۸۰	۱۳/۷	۲,۰۶۷	۱۲	۲,۳۹۶	۱۵	۲,۳۷۸	۱۴	Rca 1-A04
۲/۳۲۷	۱۳/۴	۲,۲۲۷	۱۱/۸۵۷	۲,۴۲۴	۱۴/۴۲۸	۲,۳۳۷	۱۴	X
۰/۱۱۵	۱/۲۲۸	۰/۱۲۴	۱/۲۱۵	۰/۱۵۰	۱/۵۱۲	۰/۱۳۶	۱/۸۲۵۷	S.D.

۸-۴-۴- تعادل هاردی- واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ^۱ در تمامی مناطق مورد بررسی و لوکوس‌های مختلف از آزمون مربع کای^۲ یا χ^2 استفاده شد. در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در لوکوس‌های مختلف، تمامی لوکوس‌ها در تمامی

^۱ $\chi^2 = \sum (O-E)^2 / E$

^۲ Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium (ChiSq)

مناطق مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داده و خارج از تعادل بودند ($P < 0.05$) و فقط دو جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 و *Rca* 1B-H09 در منطقه پزم چابهار و جایگاه ژنی *Rca* 1-A04 در منطقه بريس چابهار در تعادل بودند.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی مناطق بوشهر، بندر دیر، بندرلنگه و بندرعباس در تمامی لوکوس‌های مورد بررسی خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند و تنها نمونه‌های مناطق پزم چابهار در جایگاه ژنی *Rca* 1B-F06 و *Rca* 1B-H09 و بريس چابهار در جایگاه ژنی *Rca* 1-A04 در تعادل بودند.

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در سطح لوکوس‌های مختلف، لوکوس‌های *Rca* 1B-E02، *Rca* 1B-A10، *Rca* 1B-E08A و *Rca* 1B-F07 در تمامی مناطق مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داده و خارج از تعادل بودند ($P < 0.05$).

در بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در لوکوس‌های مختلف، تمامی لوکوس‌ها در تمامی نواحی سه گانه مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داده و خارج از تعادل بودند ($P < 0.001$).

در جدول ۴-۱۳ و ۴-۱۴ به ترتیب نتایج آزمون مربع کای (χ^2) برای تعادل هاردی-واینبرگ در سطح لوکوس‌های ریزماهورای پلی‌مورفیک برای همه نمونه‌های مناطق و نواحی مختلف آورده شده است. در این جدول میزان درجه آزادی^۱، آزمون مربع کای (χ^2)، مقدار احتمال^۲ و سطح معنی دار بودن^۳ آورده شده اند. هر چه عدد بدست آمده از آزمون مربع کای (χ^2) بیشتر باشد، نشان دهنده اختلاف بیشتری از تعادل هاردی-واینبرگ است. هنگام محاسبه احتمال در سطح $P < 0.05$ ، سطح معنی دار بودن با یک ستاره، در سطح $P < 0.01$ ، سطح معنی دار بودن با دو ستاره و در سطح $P < 0.001$ ، سطح معنی دار بودن با سه ستاره مشخص می‌شود.

¹ Degree of freedom (DF)

² Probability (Prob)

³ Significant (Signif)

جدول ۱۳-۴- بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در ۷ جایگاه ژنی ریزماهورهای پلی مورفیک بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا

منطقه	عوامل تعادل χ^2						
	A04	H09	F07	F06	E08A	E02	A10
بوشهر	۹۱	۱۵۳	۷۸	۳۶	۷۸	۷۸	۷۸
	درجه آزادی						
	۱۸۲	۲۲۶	۱۸۱	۱۵۸	۲۷۲	۱۵۳	۲۰۸
	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	***	***	***	***	***	***	***
بندر دیر	۶۶	۷۸	۶۶	۹۱	۳۶	۵۵	۲۸
	درجه آزادی						
	۱۱۶	۱۷۲	۱۳۲	۱۵۲	۱۰۳	۱۲۰	۱۰۵
	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	***	***	***	***	***	***	***
بندر لنگه	۱۰۵	۱۲۰	۱۲۰	۲۸	۷۸	۶۶	۹۱
	درجه آزادی						
	۲۵۶	۱۵۷	۱۸۴	۹۹	۲۴۸	۱۲۰	۲۱۰
	۰/۰۰۰	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	***	*	***	***	***	***	***
بندر عباس	۱۰۵	۱۰۵	۱۲۰	۱۰۵	۷۸	۶۶	۹۱
	درجه آزادی						
	۳۴۹	۱۳۶	۲۴۲	۲۴۸	۲۸۷	۱۵۴	۲۷۵
	۰/۰۰۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	***	*	***	***	***	***	***
پزم	۶۶	۷۸	۵۵	۲۸	۵۵	۷۸	۵۵
	درجه آزادی						
	۹۱	۸۲	۱۰۲	۳۶	۱۶۸	۱۰۹	۱۰۰
	۰/۰۲۲	۰/۳۴۸	۰/۰۰۰	۰/۱۳۷	۰/۰۰۰	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰
	*	ns	***	ns	***	*	***
بریس	۶۶	۷۸	۲۸	۳۶	۴۵	۵۵	۵۵
	درجه آزادی						
	۷۷	۱۱۶	۵۱	۶۷	۱۴۹	۹۴	۱۰۹
	۰/۱۷۵	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰
	ns	**	**	**	***	***	***

*, **, و ***: به ترتیب معنی داری با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد، ۱ درصد و ۰/۱ درصد را نشان می دهند. ns اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد ($P < 0.05$) غیر معنی دار است.

جدول ۱۴-۴- بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در ۷ جایگاه ژنی ریزماهورهای پلی مورفیک بر حسب نواحی مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا

منطقه	χ^2 عوامل تعادل	A10	E02	E08A	F06	F07	H09	A04
بوشهر	درجه آزادی	۷۸	۷۸	۷۸	۹۱	۷۸	۱۵۳	۹۱
	آزمون مربع کای	۳۹۵/۹	۲۴۸/۶	۲۴۶/۸	۳۲۰/۷	۲۸۹/۶	۳۸۵	۲۸۳/۵
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی دار بودن	***	***	***	***	***	***	***
هرمزگان	درجه آزادی	۹۱	۶۶	۷۸	۱۰۵	۱۲۰	۱۲۰	۱۰۵
	آزمون مربع کای	۵۳۷/۴	۲۸۰/۹	۵۸۲	۵۳۹	۴۱۶	۲۷۱/۹	۶۰۸/۵
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی دار بودن	***	***	***	***	***	***	***
چابهار	درجه آزادی	۵۵	۷۸	۵۵	۵۵	۵۵	۹۱	۶۶
	آزمون مربع کای	۲۰۴	۱۹۲/۷	۳۷۹/۷	۱۳۷	۱۵۶	۱۵۲/۵	۱۶۳
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
	معنی دار بودن	***	***	***	***	***	***	***

***: معنی داری با احتمال خطای کمتر از ۰/۱ درصد ($P < 0.001$) را نشان می‌دهند.

۹-۴-۴- فاکتور F_{st} ، R_{st} و جریان ژنی

برای تعیین میزان اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن نسبت به اختلاف ژنتیکی کل در بین مناطق هر ناحیه از فاکتورهای F_{st} (برآورد مرسوم در تمایز ژنتیکی) و R_{st} (برآورد تمایز کننده مخصوص میکروستلایت) استفاده می‌شود. F_{st} بیشتر شامل اندازه گیری در زیر جمعیت‌ها است و بیشترین کاربرد را در آزمون واگرایی ژنتیکی کل در بین زیر جمعیت‌ها دارد. مقدار F_{st} همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ زیر جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیر جمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است. بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از این دو فاکتور F_{st} و R_{st} استفاده می‌گردد تا معنی دار بودن و یا نبودن اختلافات مشخص گردد. هر دو فاکتور F_{st} و R_{st} با میزان جریان ژنی (N_m) یا تعداد مهاجرت موثر میان جمعیت‌ها بطور مستقیم یا غیر مستقیم ارتباط دارند. میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل اطلاق می‌شود. هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و اختلاف ژنتیکی کمتر است.

جدول ۱۵-۴ میزان F_{st} محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی (N_m) یا تعداد مهاجرت موثر میان جمعیت‌ها را بر اساس آزمون AMOVA نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده از F_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۶۳) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است مشاهده می‌شود. حداقل F_{st} (۰/۰۰) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندرلنگه که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴۶) است مشاهده می‌شود.

محاسبه F_{st} برحسب فراوانی نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۴۴) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس و حداقل F_{st} (۰/۰۰۵) بر حسب فراوانی بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندرلنگه مشاهده می‌شود.

جدول ۱۶-۴ میزان R_{st} محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی (N_m) یا تعداد مهاجرت موثر میان جمعیت‌ها را بر اساس آزمون AMOVA نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده از R_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۲۴۶) بر اساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۰/۷۷) است مشاهده می‌شود. حداقل R_{st} (۰/۰۰) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بریس با نمونه‌های پزم که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴۶/۹۷) است مشاهده می‌شود.

جدول ۱۷-۴ میزان F_{st} و R_{st} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری سه گانه به همراه میزان جریان ژنی (N_m) یا تعداد مهاجرت موثر میان نواحی را بر اساس آزمون AMOVA نشان می‌دهد.

نتایج بدست آمده از F_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۵۱) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بوشهر و چابهار که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۴/۷) است مشاهده می‌شود. حداقل F_{st} (۰/۱۸) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های چابهار که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۱۴) است مشاهده می‌شود.

محاسبه F_{st} برحسب فراوانی نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۳۱) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بوشهر و چابهار که و حداقل F_{st} (۰/۰۱۳) بر حسب فراوانی بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های چابهار مشاهده می‌شود.

نتایج بدست آمده از R_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۱۷۵) بر اساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه‌های بوشهر و چابهار که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۱/۲) است مشاهده می‌شود. حداقل R_{st} (۰/۰۶۷) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های چابهار که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳/۵) است مشاهده می‌شود.

جدول ۱۵-۴- میزان F_{st} (اعداد بالای ماتریکس میزان F_{st} بر اساس فراوانی) محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی

منطقه	بوشهر	بندر دیر	بندرلنگه	بندرعباس	پزم	بریس
بوشهر	۰/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۶*	۰/۰۱۷*	۰/۰۳۰*	۰/۰۳۴*
بندر دیر	۰/۰۰۲ (۱۰/۸)	۰/۰۰۰	۰/۰۲۶*	۰/۰۲۳*	۰/۰۴۳*	۰/۰۴۴*
بندرلنگه	۰/۰۱۷ (۱۴/۲)	۰/۰۳۲ (۷/۵)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۱۵*	۰/۰۲۴*
بندرعباس	۰/۰۲۱ (۱۱/۹)	۰/۰۲۹ (۸/۵)	۰/۰۰۰ (۳۴/۶)	۰/۰۰۰	۰/۰۱۵*	۰/۰۱۷*
پزم	۰/۰۴۴ (۵/۵)	۰/۰۶۳ (۳/۷)	۰/۰۱۴ (۱۷)	۰/۰۱۵ (۱۶/۱)	۰/۰۰۰	۰/۰۱
بریس	۰/۰۴۷ (۵)	۰/۰۶۲ (۳/۸)	۰/۰۲۶ (۹/۳)	۰/۰۱۵ (۱۶/۴)	۰/۰۰۱ (۲۰/۴)	۰/۰۰۰

* اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۱ درصد ($P < 0.01$) معنی دار است

جدول ۱۶-۲- میزان R_{st} (اعداد بالای ماتریکس میزان R_{st} بر اساس فراوانی) محاسبه شده برای مناطق مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی

منطقه	بوشهر	بندر دیر	بندرلنگه	بندرعباس	پزم	بریس
بوشهر	۰/۰۰۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
بندر دیر	۰/۰۰۴ (۶)	۰/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
بندرلنگه	۰/۰۷۲ (۳/۲)	۰/۱۰۰ (۲/۲)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
بندرعباس	۰/۱۱۴ (۱/۹)	۰/۱۲۲ (۱/۸)	۰/۰۰۹ (۲۸/۴)	۰/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۲۰
پزم	۰/۱۳۹ (۱/۵۵)	۰/۲۴۵ (۰/۷۷)	۰/۰۶۵ (۳/۶۲)	۰/۰۷۳ (۳/۱۹)	۰/۰۰۰	۰/۲۶۰
بریس	۰/۱۵۶ (۱/۳۵)	۰/۲۴۰ (۰/۷۷)	۰/۰۸۴ (۲/۷۱)	۰/۰۶۱ (۳/۸۷)	۰/۰۰ (۴۶/۹۷)	۰/۰۰۰

جدول ۱۷-۴- میزان R_{st} و F_{st} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری به همراه میزان جریان ژنی

آزمون	میزان R_{st}			میزان F_{st}		
	چابهار	بندرعباس	بوشهر	چابهار	بندرعباس	بوشهر
بوشهر	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۳۱	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰
بندرعباس	۰/۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۹۱ (۲/۵)	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰	(۱۰/۴)
چابهار	۰/۰۰۰	۰/۰۶۷ (۳/۵)	۰/۱۷۵ (۱/۲)	۰/۰۰۰	۰/۰۱۸ (۱۴)	۰/۰۵۱ (۴/۷)

۱۰-۴-۴- شباهت و فواصل ژنتیکی

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei (1972) بوسیله نرم افزار GeneAlex و (Nei (1978) بوسیله نرم افزار PopGen محاسبه شده و در جداول ۱۸-۴ و ۱۹-۴ آمده است. همانطوری که در جدول ۱۸-۴ ملاحظه می شود بر اساس معیار (Nei (1972) بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۸۱۵) و کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۴۳) میان نمونه های مناطق دیر و بريس وجود دارد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۸۵) و بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۱۹) میان نمونه های مناطق بندرعباس و بندرلنگه وجود دارد. بر اساس معیار (Nei (1978) بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۷۳۹) و کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۷۸) میان نمونه های مناطق دیر و بريس وجود دارد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲۸) و بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۷۲) میان نمونه های مناطق بندرعباس و بندرلنگه وجود دارد (جدول ۱۹-۴).

جدول ۱۸-۴- ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت ژنتیکی (Nei, 1972) در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشد).

منطقه	بوشهر	بندر دیر	بندرلنگه	بندرعباس	پزم	بریس
بوشهر	****	۰/۸۷۱	۰/۷۶۰	۰/۷۳۰	۰/۵۹۳	۰/۵۲۳
بندر دیر	۰/۱۳۸	****	۰/۶۵۵	۰/۶۷۷	۰/۴۷۸	۰/۴۴۳
بندرلنگه	۰/۲۷۴	۰/۴۲۳	****	۰/۹۱۹	۰/۸۰۰	۰/۶۷۵
بندرعباس	۰/۳۱۵	۰/۳۹۰	۰/۰۸۵	****	۰/۷۹۵	۰/۷۵۶
پزم	۰/۵۲۲	۰/۷۳۸	۰/۲۲۴	۰/۲۲۹	****	۰/۸۶۳
بریس	۰/۶۴۸	۰/۸۱۵	۰/۳۹۴	۰/۲۸۰	۰/۱۴۸	****

جدول ۱۹-۴- ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت ژنتیکی (Nei, 1978) در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری در ماهی سوکلا (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و زیر قطر مربوط به فاصله ژنتیکی میباشد).

منطقه	بوشهر	بندر دیر	بندرلنگه	بندرعباس	پزم	بریس
بوشهر	****	۰/۹۲۴	۰/۸۰۳	۰/۷۶۹	۰/۶۲۴	۰/۵۵۹
بندر دیر	۰/۰۷۹	****	۰/۶۹۸	۰/۷۲۰	۰/۵۰۸	۰/۴۷۸
بندرلنگه	۰/۲۲۰	۰/۳۵۹	****	۰/۹۷۲	۰/۸۴۵	۰/۷۲۴
بندرعباس	۰/۲۶۳	۰/۳۲۸	۰/۰۲۸	****	۰/۸۳۸	۰/۸۰۹
پزم	۰/۴۷۲	۰/۶۷۸	۰/۱۶۹	۰/۱۷۷	****	۰/۹۲۳
بریس	۰/۵۸۲	۰/۷۳۹	۰/۳۲۳	۰/۲۱۲	۰/۰۸۱	****

۱۱-۴-۴- اختلاف در تنوع ژنتیکی بین نواحی (گروه‌ها)، مناطق هر ناحیه و افراد هر منطقه

تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۶ منطقه^۱ (شامل بوشهر، بندر دیر، بندرلنگه، بندرعباس، پزم و بریس) و ۳ گروه یا ناحیه^۲ (شامل نواحی بوشهر، بندرعباس و چابهار) بر اساس آزمون AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف بر اساس F_{st} و R_{st} محاسبه گردید.

¹ Population

² region

همانطور که شکل ۴-۵۹ و جدول ۴-۲۰ نشان می‌دهد بر اساس F_{st} اختلاف بین نمونه‌های هر منطقه ($P \leq 0/01$ و $0/97$)، اختلاف بین مناطق هر ناحیه ($P \leq 0/01$ و $0/0$) و اختلاف بین گروه‌ها یا نواحی انتخاب شده در خلیج فارس و دریای عمان ($P \leq 0/01$ و $0/3$) محاسبه شد. بر این اساس به نظر می‌رسد بیشترین اختلاف بین افراد در هر منطقه نمونه برداری است.

همچنین بر اساس R_{st} اختلاف بین نمونه‌های هر منطقه ($P \leq 0/01$ و $0/88$)، اختلاف بین مناطق هر ناحیه ($P \leq 0/01$) و $0/2$ و اختلاف بین گروه‌ها یا نواحی انتخاب شده در خلیج فارس و دریای عمان ($P \leq 0/01$ و $0/10$) محاسبه شد. بر این اساس به نظر می‌رسد بیشترین اختلاف بین افراد در هر منطقه نمونه برداری است.

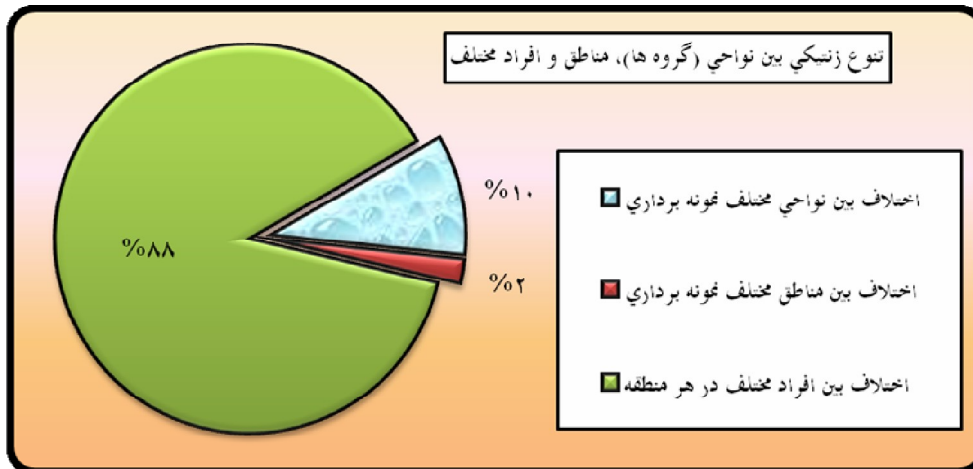
جدول ۴-۲۰- آزمون AMOVA بر اساس میزان F_{st} و R_{st} محاسبه شده برای نواحی، مناطق و افراد مختلف در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی‌مورفیک در ماهی سوکلا

AMOVA		F_{st}		R_{st}		منبع
مقدار	درصد	احتمال	مقدار	درصد	احتمال	
۰/۰۲۹	۳٪	۰/۰۱	۰/۱	۱۰٪	۰/۰۱	اختلاف بین نواحی مختلف نمونه برداری ^۱ در خلیج فارس و دریای عمان
۰/۰۰۰	۰٪	۰/۰۱	۰/۰۱۹	۲٪	۰/۰۱	اختلاف بین مناطق نمونه برداری ^۲ واقع در هر ناحیه یا گروه
۰/۰۲۹	۹۷٪	۰/۰۱	۰/۱۱۷	۸۸٪	۰/۰۱	اختلاف بین افراد مختلف در هر منطقه ^۳ نمونه برداری

¹ Among Regions

² Among Pops/Regions

³ Indiv/Within Pops

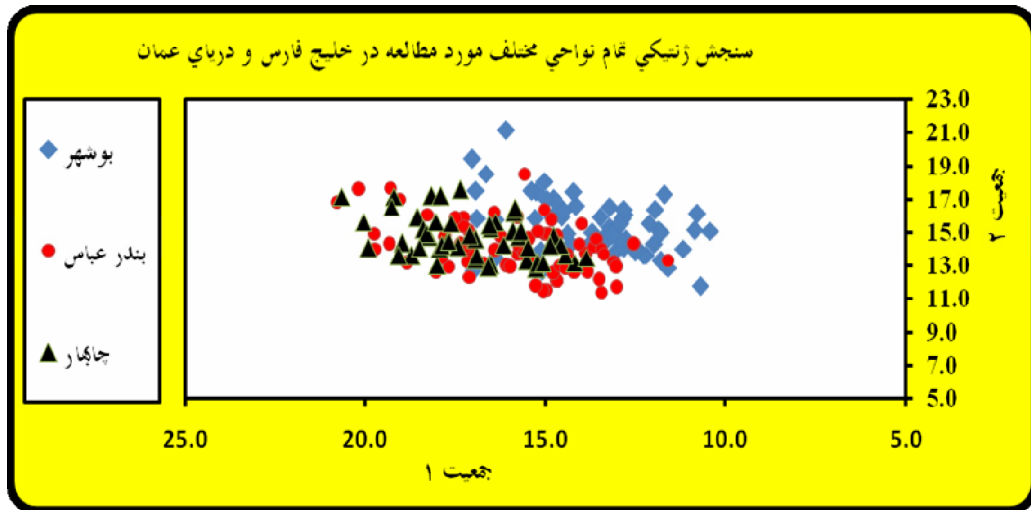


شکل ۵۹-۴- تنوع ژنتیکی بین نواحی (گروه‌ها)، مناطق و افراد مختلف در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی‌مورفیک در ماهی سوکلا بر اساس آزمون AMOVA

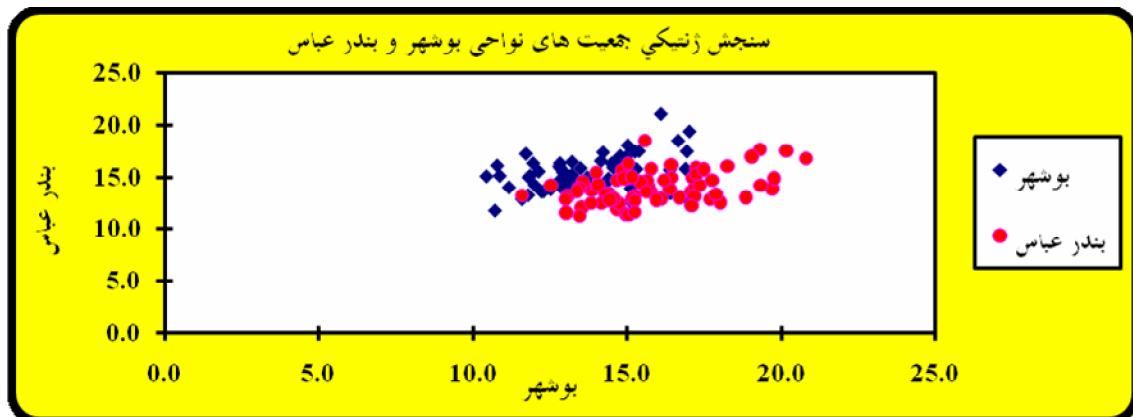
۱۲-۴-۴- نمودارهای سنجش جفت جمعیت‌ها^۱

نمودارهای سنجش ژنتیکی جمعیت‌ها بصورت جفت آورده شده است. این نقشه‌ها نمایشی از درجه تفکیک و تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها را میسر می‌سازند و روش مناسبی برای اندازه‌گیری اختلاف میان جمعیت‌ها به کمک نمودار و بر اساس تست‌های سنجش می‌باشند و اعداد نمایش داده شده روی محور بر حسب درجه تمایز است.

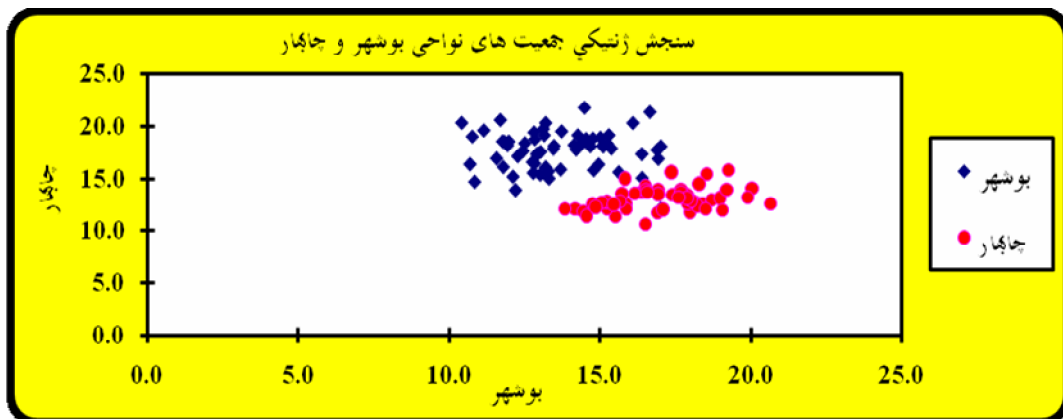
¹ Pairwise Population Assignment Graphs



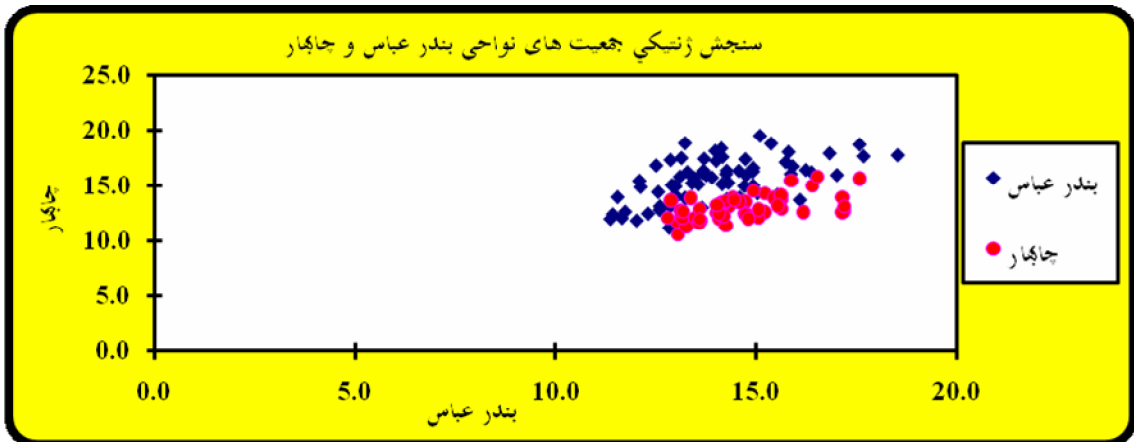
شکل ۶۰-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی تمام جمعیت‌های نواحی مختلف مورد مطالعه در خلیج فارس و دریای عمان بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



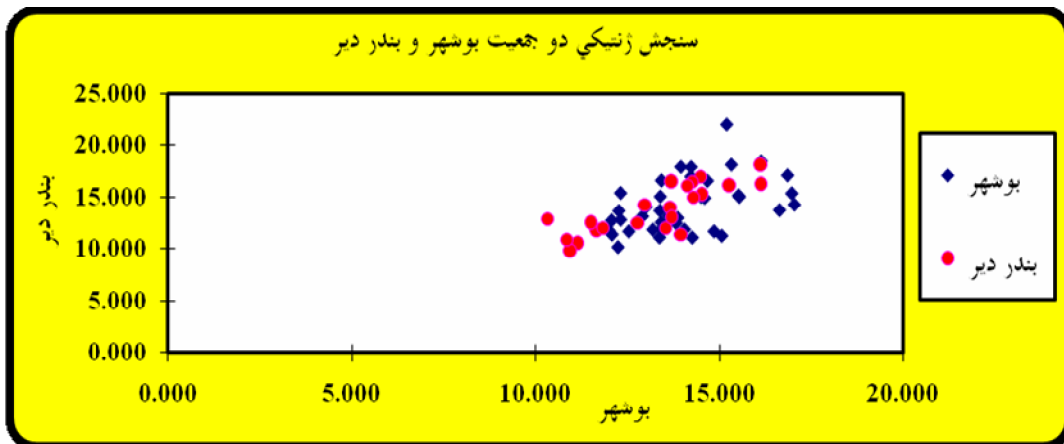
شکل ۶۱-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی بوشهر و بندرعباس بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



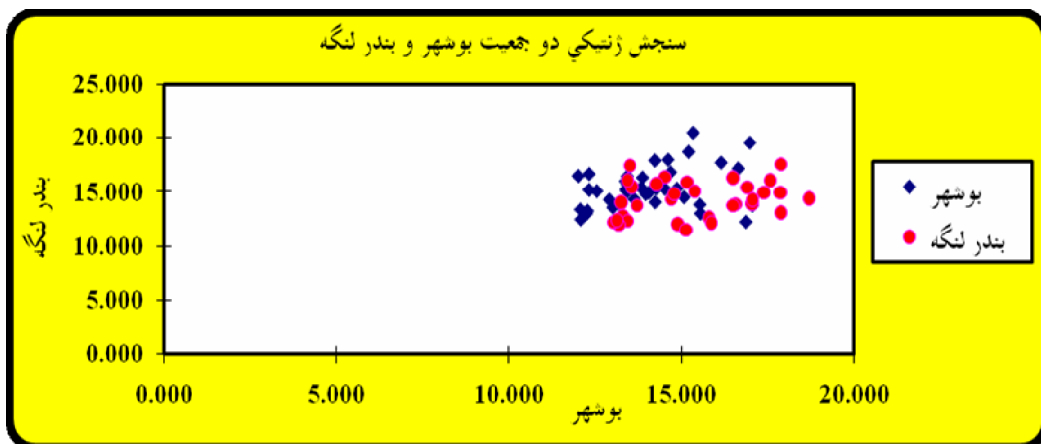
شکل ۶۲-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی بوشهر و چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



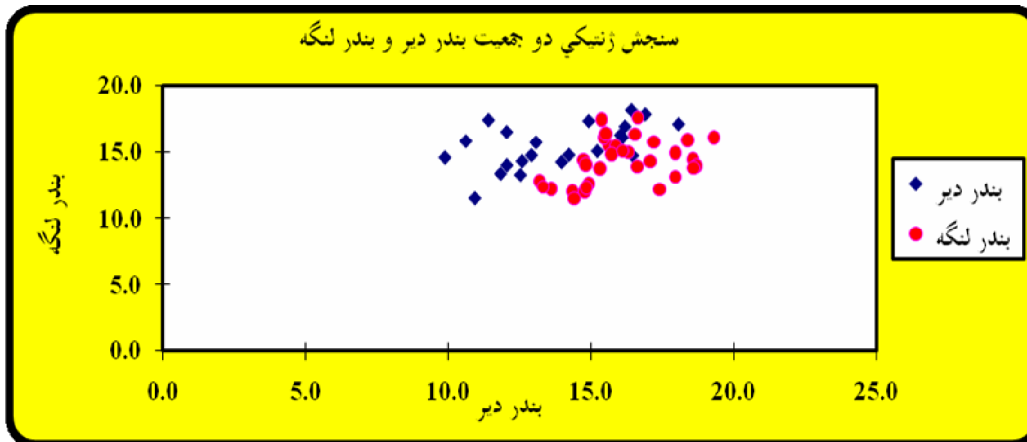
شکل ۶۳-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت های نواحی بندرعباس و چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



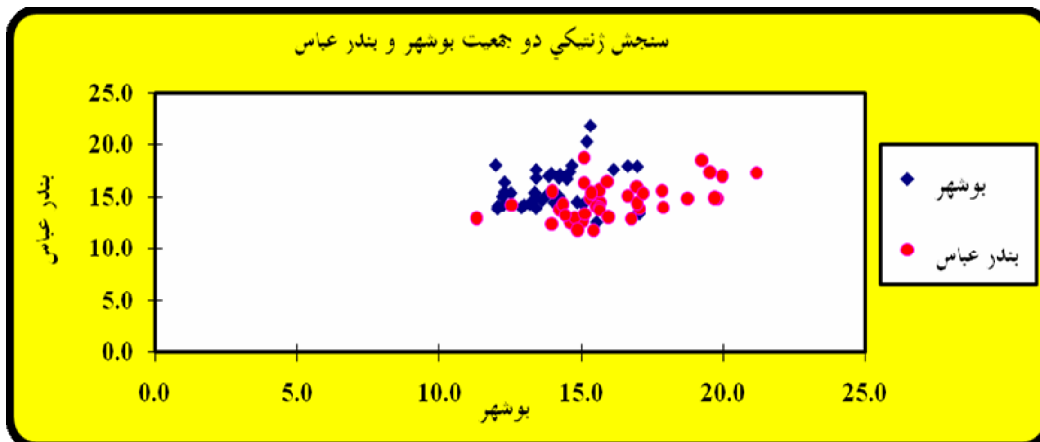
شکل ۶۴-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بوشهر و بندر دیر بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



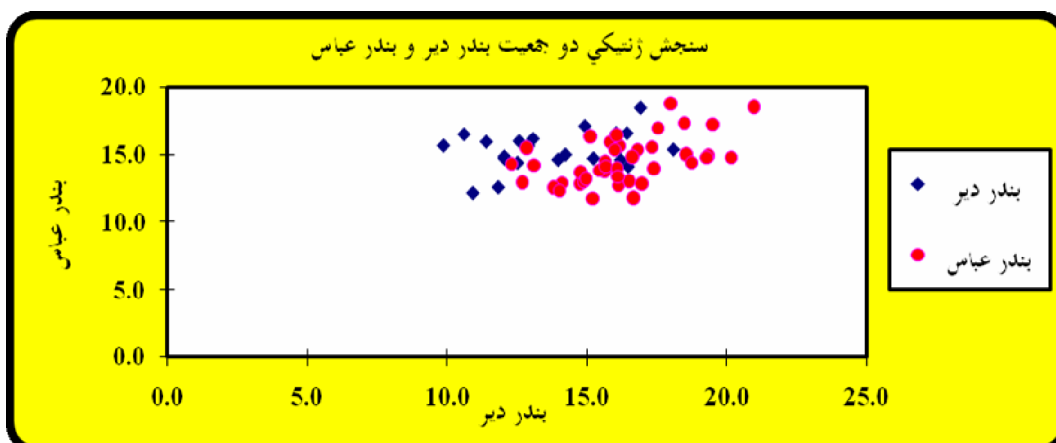
شکل ۶۵-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بوشهر و بندرلنگه بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



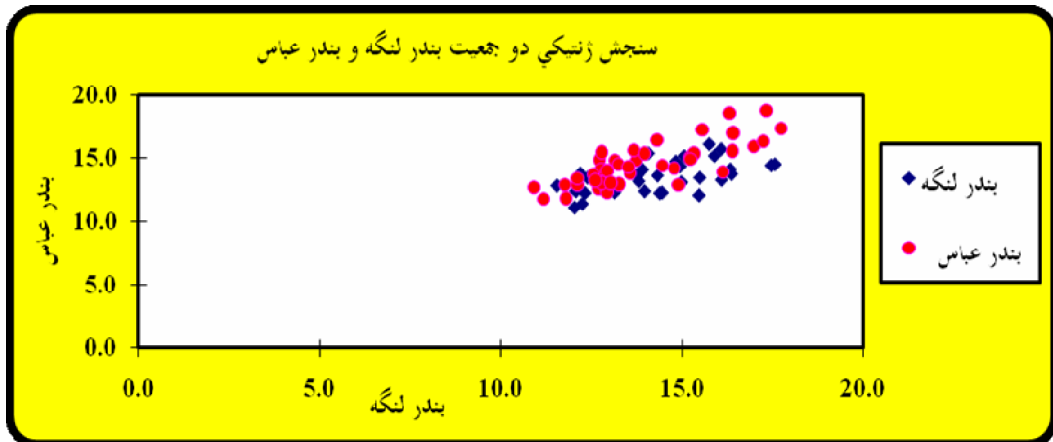
شکل ۶۶-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر دیر و بندر لنگه بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



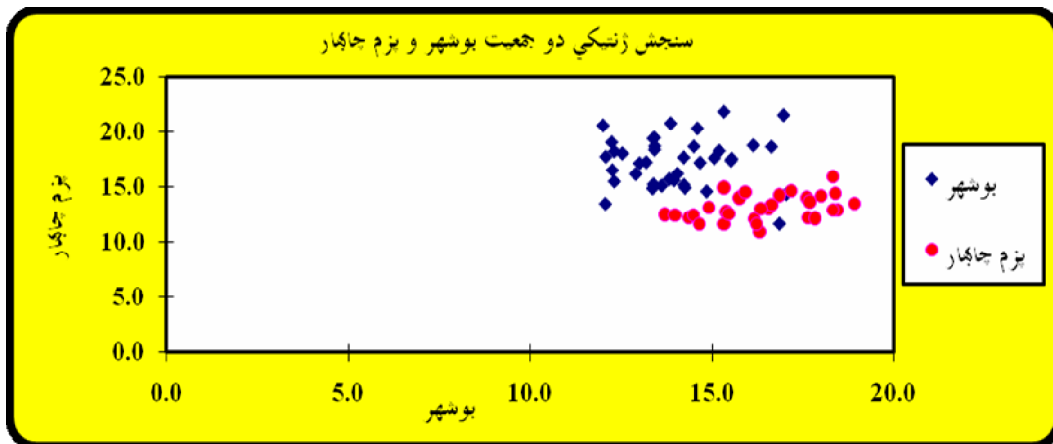
شکل ۶۷-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بوشهر و بندر عباس بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



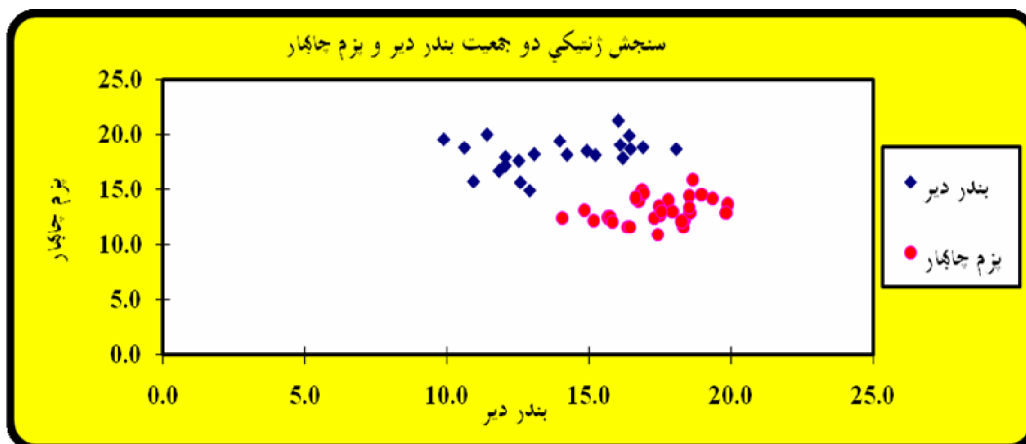
شکل ۶۸-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر دیر و بندر عباس بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



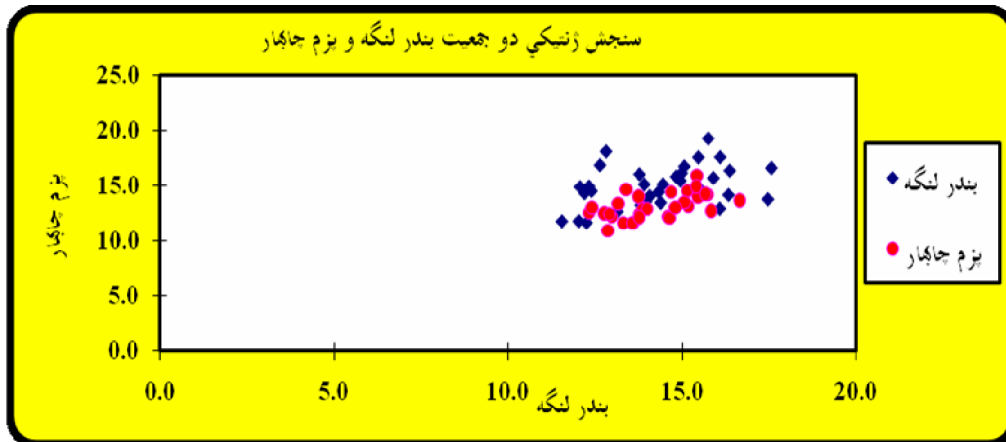
شکل ۶۹-۴ نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر لنگه و بندر عباس بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



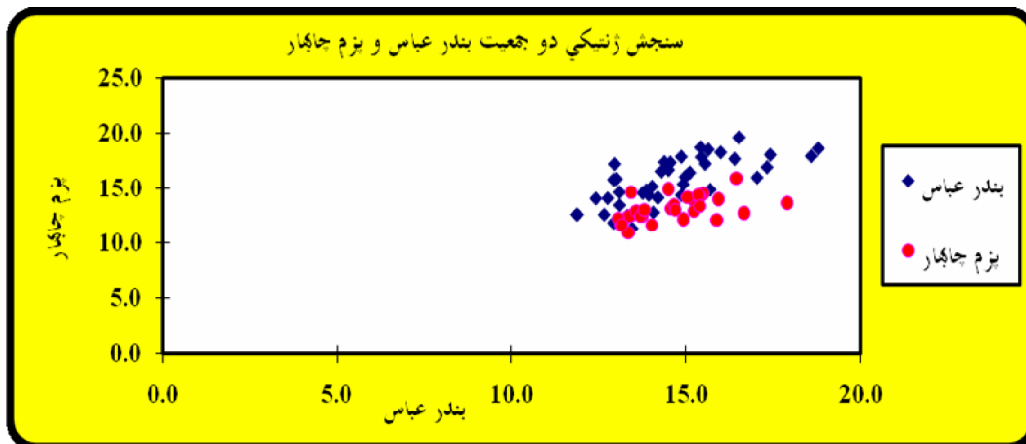
شکل ۷۰-۴ نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بوشهر و بزم بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



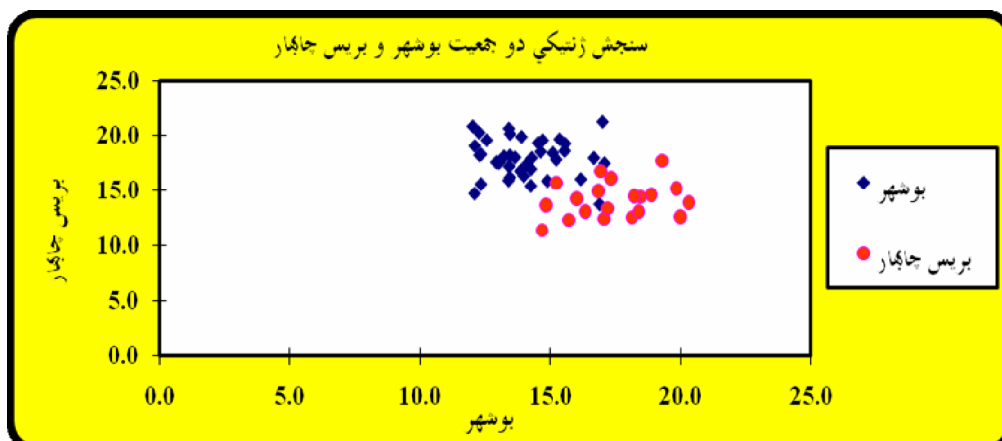
شکل ۷۱-۴ نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر دیر و بزم چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



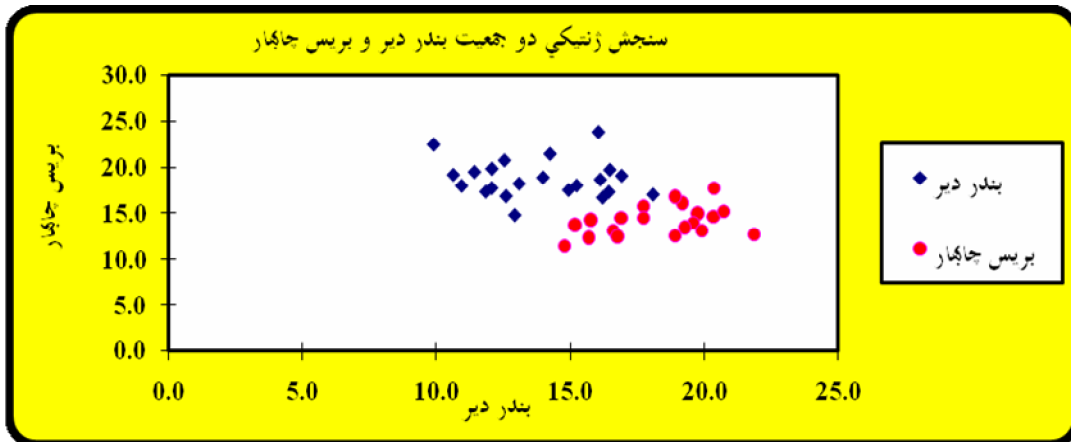
شکل ۷۲-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر لنگه و پزم چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



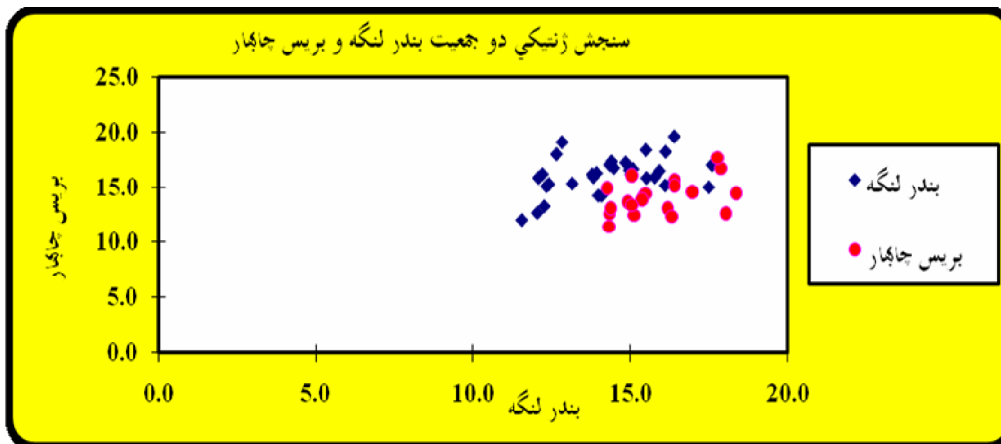
شکل ۷۳-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر عباس و پزم چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



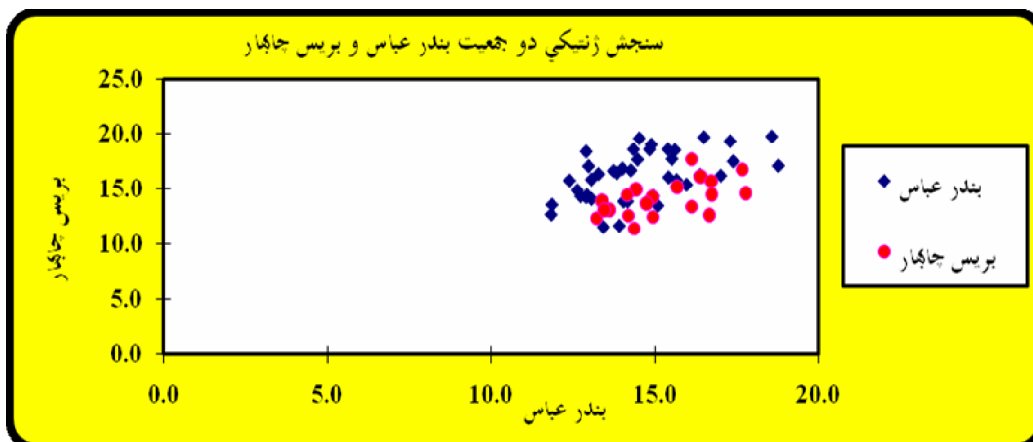
شکل ۷۴-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بوشهر و بریس چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



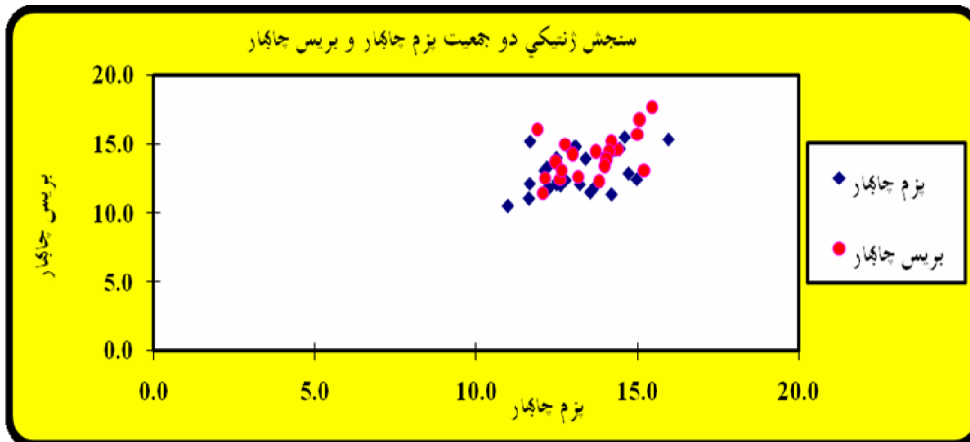
شکل ۷۵-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر دیر و بریس چابهار و بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



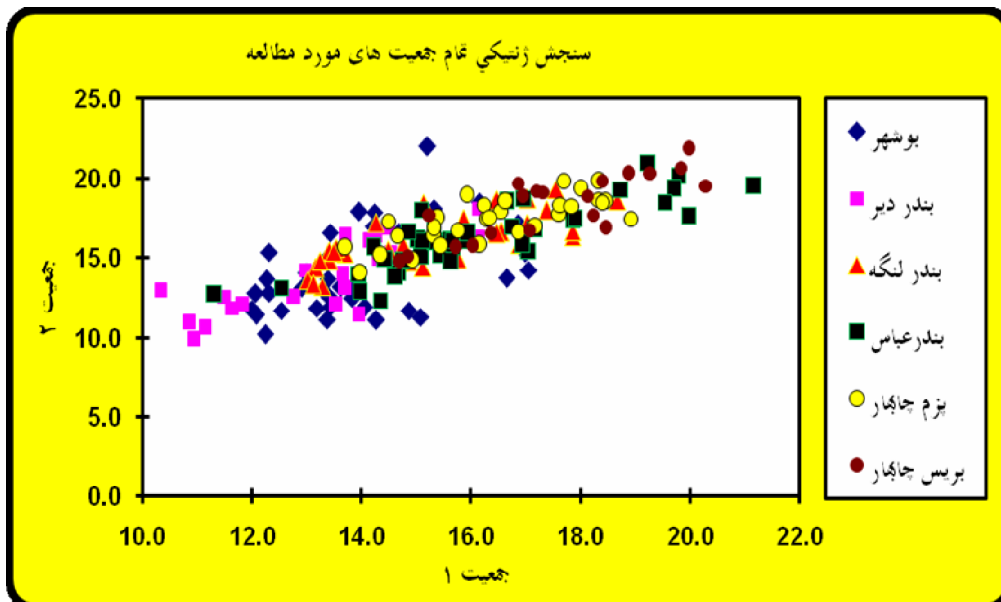
شکل ۷۶-۵- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر لنگه و بریس چابهار و بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



شکل ۷۷-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بندر عباس و بریس چابهار و بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



شکل ۷۸-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی دو جمعیت مناطق بزم چابهار و بریس چابهار بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا



شکل ۷۹-۴- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی تمام جمعیت های مناطق مورد مطالعه بر حسب درجه تمایز در ۷ جایگاه ژنی ریزماهواره پلی مورفیک در ماهی سوکلا

۵-۴- بحث و تفسیر

۱-۵-۴- وضعیت آللی و آلل‌های اختصاصی

در این مطالعه در مجموع از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهورای بررسی شده در ماهی سوکلا، ۷ جفت آنها پلی‌مورف و ۳ جفت آنها (*Rca 1B-D09*, *Rca 1B-E08B*, *Rca 1B-G10*) مونومورف بودند که جزئیات محاسباتی آن آورده شده است. همچنین یک جفت آغازگر (*Rca 1B-A10*) در دو جایگاه ژنی تولید باند کرد یا به عبارتی ۱۱ جایگاه ژنی تولید باند DNA نمودند که از بین آنها ۸ جایگاه ژنی پلی‌مورفیسم و ۳ جایگاه ژنی مونومورف بودند. در هنگام شمارش الگوی باندهای تمامی جایگاه‌ها یک یا دو باند را نشان دادند که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است یا به عبارتی انحصاری و اختصاصی بودن آغازگرها موجب شد که در هر فرد تنها یک یا دو باند (در فرد هتروزیگوت دو باند و در فرد هموزیگوت یک باند) بدست آید.

در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۱۴/۲۸۶ آلل و کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به نمونه‌های منطقه بریس با ۱۰/۵۷۱ آلل می‌باشد همچنین بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه بندرعباس با ۹/۷۴۰ آلل و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نمونه‌های منطقه دیر با ۷/۰۵۹ آلل می‌باشد. که علت این پدیده احتمالاً به خاطر زیاده‌تر بودن نمونه‌ها، جریان ژنی بالا و برون زادآوری، عدم تخریب زیستگاه‌های طبیعی منطقه بندرعباس نسبت به بریس چابهار و منطقه دیر می‌باشد که با گذشت زمان موجب افزایش آلل و افزایش تنوع ژنتیکی در ذخایر منطقه بندرعباس گردیده است. میزان جریان ژنی (N_m) به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل اطلاق می‌شود؛ هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و در نتیجه تنوع ژنتیکی بالاتر ولی تمایز ژنتیکی میان مناطق مزبور کمتر است.

در مقایسه جایگاه‌های هفت‌گانه مورد مطالعه بیشترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۴/۶۶۷ آلل در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* و کمترین تعداد آلل مشاهده شده ۱۰/۵ آلل در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* می‌باشد همچنین بیشترین تعداد آلل موثر ۱۰/۰۵۳ آلل در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* و کمترین تعداد آلل موثر ۶/۷۱۱ آلل در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* می‌باشد. جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* تعداد آلل بالاتری نشان داد که علت این پدیده احتمالاً به خاطر جهش پذیری بالای این جایگاه ژنی و یا وجود آلل‌های نول می‌باشد که به اشتباه رتبه دهی شده‌اند.

در میان مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاه‌های هفت گانه میانگین تعداد آلی مشاهده شده ۱۲/۳۵۷ و میانگین تعداد آلی موثر ۸/۳۱۹ می‌باشد که قابل قیاس با نتایج دیگران می‌باشد.

بر اساس داده‌های فراوانی آلی جایگاه‌های مختلف ریزماهورای پلی‌مورفیک مجموعاً ۱۴ آلی اختصاصی مشاهده گردید که حداکثر آن در نمونه‌های منطقه بوشهر با ۵ آلی و حداقل آن در نمونه‌های منطقه پزم چابهار با ۱ آلی دیده می‌شود. علت احتمالی این پدیده بسته بودن نسبی خلیج فارس و دریای عمان و میزان جریان ژنی پائین و فرصت کافی برای ظهور آلی‌های اختصاصی می‌باشد. بیشترین آلی اختصاصی منحصر به فرد در جایگاه ژنی *Rca 1B-H09* با ۲ آلی و کمترین آن در جایگاه ژنی *Rca 1B-F06* با ۱ آلی دیده می‌شود. آلی‌های اختصاصی مشاهده شده به دلیل فراوانی پائین قابل ملاحظه نیستند و نمی‌توان آنها را کاملاً اختصاصی فرض نمود و از آنها برای تشخیص مطمئن این جمعیت‌ها استفاده کرد. معمولاً در مطالعات ساختار جمعیتی بدلیل کوچک بودن اندازه نمونه و چند شکلی فراوان ریزماهوره‌ها نبایستی بدنبال آلی‌های اختصاصی گشت.

تعداد زیاد آلی‌های اختصاصی در بوشهر به آن معنی است که جمعیت به سرعت توسعه یافته و آلی‌های جدید در میان جهش‌های جدید برخاسته‌اند. تعداد آلی اختصاصی کمتر در نمونه‌های بندرعباس احتمالاً نشانه این است که این مناطق زیستگاه‌های میانی بوده‌اند و یا کم بودن آلی‌های اختصاصی نشانه‌های کاهش جمعیت این گونه در اثر تنگناهای شدید جمعیتی می‌باشد. وجود آلی‌های اختصاصی که بر اساس جهش و پس از مهاجرت به مکانهای جدید ایجاد شده‌اند نشانه وضعیت مناسب اکولوژیکی در هر یک از زیستگاه‌های جدید (در آن زمان) بوده است و نشان دهنده وجود گونه‌های بومی منطقه است (Kalinowski, 2005).

در بررسی حاضر دامنه تعداد آلی مشاهده شده در جایگاه‌های ژنی ۱۸-۸ محاسبه گردید در حالی که Aurelle و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ژنتیکی *Coris julis* دامنه آلی در لوکوس‌ها را بین ۳-۴۲ آلی؛ Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* در سواحل اروپا تنوع آلی را ۱۳-۱۱/۶۷؛ Cui و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه *Takifugu rubripes* در سواحل چین میانگین آلی در هر جایگاه ژنی را ۱۱/۷ و دامنه آلی را ۵-۲۵؛ Salguero و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی ساختار ژنتیکی *Anaocypris hispanica* در پرتغال دامنه آلی در جایگاه‌های ژنی ۳۸-۱ با میانگین ۱۴/۴ و دامنه آلی در جمعیت‌ها را ۱۳-۸ و

Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های *Acipenser sinensis* تعداد آلل در هر جایگاه ژنی ۱۵-۴ آلل با میانگین ۷ آلل را بدست آوردند.

Alam و Islam در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های وحشی و پرورشی رودخانه‌ای *Catla catla* با استفاده از هشت جایگاه ژنی ریزماهواره میانگین تعداد آلل مشاهده شده در داخل و بین جمعیت‌های هجری را پایین‌تر از جمعیت‌های رودخانه اعلام کردند؛ به نظر آنها کاهش در اختلاف آللی جمعیت‌های پرورشی ممکن است به علت اثر موسس (بنیانگذار) و رانش ژنتیکی باشد زیرا ممکن است جمعیت موسس با تعداد کمی از مولدین بنا شود؛ افزایش تنگناهای ژنتیکی و آمیزش‌های خویشاوندی در ذخایر هجری با گذشت زمان سبب کاهش آللی می‌گردد.

Skaala و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی ماهی آزاد اتلاننتیک (*Salmo salar*) پرورشی و وحشی با استفاده از دوازده نشانگر ریزماهواره با دقت بالایی توانستند نمونه‌های وحشی را از نمونه‌های پرورشی تشخیص دهند و میانگین آللی در تمامی نژادهای پرورشی را به طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر از جمعیت‌های وحشی بدست آوردند که می‌تواند ناشی از تعداد کم مولدین موسس یا رانش ژنتیکی در افزایش تولید نسل در برنامه‌های تولید مثلی باشد. به از دست رفتن واریانس ژنتیکی یا هنگامی که یک جمعیت با تعداد کمی مولد بنیان گذاشته شود اثر موسس (بنیانگذار) می‌نامند (امینی، ۱۳۷۴).

سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه نسبت به گونه دیگر و در جمعیت‌های مختلف یک گونه که در هر منطقه می‌باشد متفاوت است ولی بطور متوسط تعداد آلل در هر جایگاه ژنی در ماهیان آب شور (۲۰/۶) بیشتر از ماهیان آب شیرین (۷/۵) و در ماهیان آنادراموس (۱۱/۳) بینابین آب شور و شیرین است (Dewoody and Avise, 2000). در بررسی حاضر میانگین تعداد آللی مشاهده شده ۱۲/۳۵۷ از متوسط تعداد آلل در هر جایگاه ژنی در ماهیان آب شور (۲۰/۶) کمتر می‌باشد که احتمالاً به دلیل محدودیت مهاجرت‌ها (جریان ژنی) و در نتیجه آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد؛ علت چنین امری را می‌توان به عوامل زیست محیطی مختلفی از جمله تفاوت درجه حرارت، شوری، مواد مغذی و جریان‌های دریایی بین زیستگاه‌های مختلف در شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان نسبت داد که موجب محدود شدن جریان ژنی بین آنها و کاهش تنوع آللی می‌شود.

۲-۵-۴- هتروزیگوسیتی

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Beardmore *et al.*, 1997).

ریزماهواره‌ها شاخص حساسی در اندازه‌گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری‌های همخون هستند بنابراین برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب می‌باشند (Alarcon *et al.*, 2004).

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه‌های هفت گانه بین ۱-۱۵/۰ با میانگین ۰/۶۵۵ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه ژنی Rca 1B-F07 و کمترین مقدار در جایگاه ژنی Rca 1B-E08A در نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه بریس می‌باشد.

دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا تنوع ژنتیکی (He) بین مناطق نمونه برداری در جایگاه‌های هفت گانه بین ۰/۹۲۳-۰/۷۶۷ با میانگین ۰/۸۷۴ بود. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه‌های Rca 1B-F07 و Rca 1B-H09 در نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه بندرعباس و بندرلنگه می‌باشد. کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه‌های Rca 1B-F06 و Rca 1-A04 به ترتیب مربوط به مناطق بندرلنگه و پزم می‌باشد. بالا بودن دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی این گونه در مناطق مختلف نمونه برداری می‌باشد.

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سطح جایگاه ژنی ۱ مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-F07 و کمترین مقدار آن ۰/۳۰۷ مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-E08A می‌باشد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در سطح جایگاه ژنی ۰/۸۹۸ مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-H09 و کمترین مقدار آن ۰/۸۴۰ مربوط به جایگاه ژنی Rca 1B-F06 می‌باشد. مقادیر Ho و He در سطح جایگاه ژنی بیانگر آن است که سطح تغییر پذیری هر جایگاه ژنی متفاوت از یکدیگر می‌باشد.

در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی لوکوس‌ها به غیر از Rca 1B-H09 هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به

هتروزیگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی و از دست دادن تنوع ژنتیکی در نمونه‌ها است؛ علت آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس‌های زیست محیطی، تخریب زیستگاه‌های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی، محدودیت مهاجرت‌ها (جریان ژنی) و آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و اُفت هتروزیگوسیتی در ذخایر گردیده است؛ کاهش مهاجرت‌ها (جریان ژنی) و در نتیجه افزایش آمیزش‌های خویشاوندی احتمالاً به دلیل عوامل زیست محیطی مختلفی از جمله تفاوت درجه حرارت، شوری، مواد مغذی و جریانات دریایی بین زیستگاه‌های مختلف در شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد که موجب محدود شدن جریان ژنی بین آنها و کاهش هتروزیگوسیتی می‌شود.

جایگاه ژنی *Rca 1B-F07* هتروزیگوسیتی بالاتری نشان داد و این امر بوسیله سایر لوکوس‌ها تأیید نشد که بیانگر آن است که سطح تغییر پذیری (میزان جهش پذیری) این جایگاه ژنی متفاوت از بقیه می‌باشد و یا احتمالاً به خاطر عدم جداسازی مناسب باندها در هنگامیکه تفاوت فقط به اندازه یک جفت باز بوده رخ داده است و یا به خاطر وجود آلل‌های نول می‌باشد که به اشتباه رتبه دهی شده‌اند. لازم به ذکر است که آلل‌های نول اغلب در آغازگرهای غیر اختصاصی دیده می‌شود.

بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های ناحیه هرمزگان (مناطق بندرعباس و بندرلنگه) دیده شد که نشانه بالا بودن تنوع و مناسب بودن ساختار جمعیت در این ناحیه نسبت به جمعیت‌های سایر نواحی نمونه‌برداری است. می‌توان علت آنرا به فرصت بیشتر برای تکثیر طبیعی، بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی، عدم تخریب زیستگاه‌های طبیعی، بالا بودن میزان جریان ژنی (N_m)، برون‌زادآوری و... تفسیر نمود. لازم به ذکر است که هر چه میزان جریان ژنی (N_m) بیشتر باشد تنوع ژنتیکی بیشتر ولی اختلاف ژنتیکی میان مناطق مورد نظر کمتر خواهد بود.

کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نمونه‌های مناطق بريس چابهار و بندر دیر دیده شد که علت آن در بريس چابهار عدم بهره‌برداری بهینه از منابع شیلاتی و احتمالاً پایین بودن میزان جریان ژنی (N_m) و در بندر دیر تخریب زیستگاه‌های طبیعی ناشی از توسعه پارس جنوبی و تأسیسات عسلویه است.

این در حالی است که Aurelle و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه ژنتیکی *Coris julis* در مدیترانه دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار را بین ۰/۵۳ تا ۰/۵۸؛ Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ژنتیکی *Pollachius pollachius* در سواحل فرانسه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۶۷۸ الی ۰/۷۴۱؛ Lucentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه پلی مورفیسم ریزماهواره در اردک ماهی (*Esox lucius*) شمال ایتالیا و شرق اروپا دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۳۸ الی ۰/۷۶؛ Watts و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی ژنتیکی *Pleuronectes platessa* در میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار را به ترتیب ۰/۳۸۲ و ۰/۳۹۴؛ Jug و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه *Salmo marmoratus* در دریاچه آدریاتیک دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۰۶ الی ۰/۷۲ و دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۱۲ الی ۰/۶۵ محاسبه نمودند.

Cui و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی تنوع ژنتیکی *T. rubripes* و *T. pseudommus* در سواحل چین با استفاده از ۹ جایگاه ژنی ریزماهواره دامنه شاخص تنوع ژنتیکی را ۰/۶۴۶ تا ۰/۹۴۷ بدست آوردند، شاخص تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که کاهش معنی داری بین جمعیت‌های پرورشی در مقایسه با جمعیت‌های وحشی دیده می‌شود؛ دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر در مورد کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی ذکر شده است. کاهش تنوع ژنتیکی در ذخایر پرورشی بر روی ذخایر وحشی نیز می‌تواند فشار وارد نماید و آمادگی آنها را برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی افزایش داده و در نتیجه در آینده کاهش در اندازه جمعیت دیده می‌شود.

Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا ۲۰ آغازگر میکروستلایت را در ماهی سوکلای خلیج مکزیک واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند، در این مطالعه دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۰۴۳ الی ۰/۹۱۰ و دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۰۴۳ الی ۰/۹۵۷ محاسبه گردید.

خوش خلق در سال ۱۳۸۵ در مطالعه تاسماهی ایرانی دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴-۰/۸۶ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۳-۰/۸۳؛ نوروزی در سال ۱۳۸۶ در ماهی ازون برون دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۲۳۱-۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۵۷-۰/۵۴۳؛ صفری در سال ۱۳۸۵ در بررسی ماهی شیپ دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۳۷-۱ و نویدی در سال ۱۳۸۵ در بررسی ماهی آزاد دامنه

هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۷-۱ با استفاده از روش ریزماهواره بدست آوردند.

Dewoody and Advise در سال ۲۰۰۰ میانگین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در ماهیان دریایی ۰/۷۹، ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ و ماهیان آنادراموس رقمی بینابین ماهیان دریایی و آب شیرین ۰/۶۸ گزارش کردند. در بررسی حاضر میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۵۵ کمتر از مقدار اعلام شده برای ماهیان دریایی ۰/۷۹ می‌باشد که علل آن احتمالاً به دلیل جریان ژنی پایین، آمیزش‌های خویشاوندی و تنگناهای ژنتیکی به واسطه افزایش میزان فشار صید، تخریب زیستگاه، اندازه کوچک جمعیت، نمونه برداری افراد خویشاوند از یک گله و ... می‌باشد.

تنوع آلی با حساسیت بیشتری نسبت به هتروزیگوسیتی می‌تواند اختلاف ژنتیکی را اندازه‌گیری کند زیرا تنگناهای ژنتیکی همانند وقایعی که موجب کاهش تعداد آلل می‌شود (بویژه نمونه‌های کمیاب) بدون داشتن اثر قابل مشاهده روی هتروزیگوسیتی هنگامی که اندازه نمونه‌ها مشابه هستند، دیده می‌شود. ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آبزیان ممکن است به طور قابل ملاحظه‌ای بین گونه‌ها بسته به اهمیت نسبی رانش، جریان ژنی، انتخاب، مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلند مدت همچون تجمع افراد و جمعیت‌ها بعد از عصر یخبندان تغییر کند. در میان ماهیان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین‌تری را نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می‌دهند در حالی که ماهیان آب شیرین تنوع ژنتیکی پایین و تمایز ژنتیکی بالاتری را نسبت به ماهیان دریایی نشان می‌دهند و این تمایز به اندازه بزرگ جمعیت موثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیط‌های دریایی و اندازه کوچک جمعیت موثر و جریان ژنی محدود در جمعیت‌های آب شیرین نسبت داده می‌شود (Norris et al., 1999).

۳-۵-۴- تعادل هاردی- واینبرگ

در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی مناطق بوشهر، بندر دیر، بندرلنگه و بندرعباس در تمامی لوکوس‌های مورد بررسی خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند و تنها نمونه‌های مناطق پزم چابهار در جایگاه ژنی Rca 1B-F06 و Rca 1B-H09 و بریس چابهار در جایگاه ژنی Rca 1-A04 در تعادل بودند.

چنین مشاهداتی در مطالعاتی که بر روی ماهیان دیگر انجام گردیده است نیز گزارش شده است بطوری که Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ در بررسی ترکیب ذخایر *Merlangius merlangus* در آتلانتیک شمالی، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را در ۳ جایگاه ژنی از ۴ جایگاه ژنی مورد مطالعه مشاهده نموده و علت آن را برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی^۱ نتیجه گیری کردند. Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی *Acipenser sinensis* با استفاده از ۴ جفت آغازگر ریزماهواره انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را ناشی از آلل‌های پوچ دانستند. Beacham و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ساختار جمعیت *Oncorhynchus nerka* عدم تعادل هاردی- واینبرگ فقط در یک جایگاه ژنی مشاهده کردند. Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی- واینبرگ را به علت افزایش هوموزیگوس، آلل‌های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و کافی نبودن نمونه‌ها ارتباط دادند. Israel و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی پراکنش ژنتیکی نمونه‌های تاس ماهی سبز در نمونه‌های رودخانه کلمبیا هیچ گونه انحرافی از تعادل هاردی- واینبرگ را مشاهده نکرده و عدم تعادل معنی دار در نمونه‌های خلیج سان پابلو را ناشی از آن می‌دانند که نمونه‌ها از یک ذخیره نیستند. Aguilar و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی ژنتیکی جمعیت اردک ماهی شمال از ده جایگاه ژنی تترانوکلوتیدی ریزماهواره در یازده جمعیت استفاده کردند و انحراف معنی دار از تعادل هاردی- واینبرگ در هفت جایگاه ژنی جمعیت سبز، چهار جایگاه ژنی جمعیت قرمز، سه جایگاه ژنی جمعیت طلایی اردک ماهی شمال را گزارش کردند.

خوش خلق در سال ۱۳۸۵ در مطالعه تاسماهی ایرانی در تمام جایگاه‌ها انحراف از تعادل را ناشی از مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری، تلاقی خویشاوندی، خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها در بعضی از مناطق اعلام کرد. صفری در سال ۱۳۸۵ در ماهی شیپ انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را در تمام مناطق نمونه برداری به تکامل غیرهم جهتی که در نمونه‌های مناطق مختلف برای یک جایگاه ژنی خاص در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آن‌ها روی داده است نسبت داد. نوروزی در سال ۱۳۸۶ در ازون برون در تمام مناطق انحراف از تعادل را مشاهده و ناشی از آلل‌های نول، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری و مخلوط شدن جمعیت‌ها اعلام کرد.

^۱ Out Breeding

در بررسی حاضر در اکثر مناطقی که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین تر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود عدم تعادل هاردی- واینبرگ مشاهده شد. چنین نتیجه‌ای می‌توند ناشی از روش رتبه دهی به باندهای فریب دهنده یا وجود آلل‌های نول باشد که هوموزیگوس‌ها را جایگزین هتروزیگوس‌ها می‌کند. در واقع وجود آلل‌های نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است. وجود عدم تعادل همراه با هتروزیگوسیتی بالا نشان دهنده وجود ساختار زیر جمعیت در منطقه نمونه برداری می‌باشد اما در این بررسی هیچ یک از مناطق در تمامی لوکوس‌ها در تعادل نبودند. همچنین رانش ژنتیکی، مخلوط شدن جمعیت‌ها، غیر کافی بودن نمونه‌ها، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری، آمیزش‌های خویشاوندی و وجود جهش‌های محلی در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزیگوت‌ها همانند هوموزیگوت‌ها می‌شود را می‌توان از دلایل عدم تعادل هاردی- واینبرگ اعلام کرد.

در بررسی حاضر، انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در تمام مناطق مختلف نمونه برداری به ازای هر جایگاه ژنی ($P \leq 0.05$) مشاهده شد. این عدم تعادل را همچنین میتوان به تکامل غیر هم جیتی که در نمونه‌های مناطق مختلف برای یک جایگاه ژنی خاص در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است نسبت داد این امر موجب می‌گردد جایگاه مورد نظر برای کل جمعیت‌های ادغام شده از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف داشته باشد، همچنین تاثیر پذیری کل نمونه‌ها از نمونه‌های بندرعباس و بوشهر که تعداد آنها زیاد است یا کوچک بودن اندازه جمعیت نیز تاثیر دارند.

چنین ساختاری را Alam و Islam در سال ۲۰۰۵ در Ayllon، Catla catla و همکاران در سال ۲۰۰۶ در *Salmo salar*، Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در *Pollachius pollachius*، Porta و همکاران در سال ۲۰۰۶ در Soela و *Salguerio*، *senegalensis* و همکاران در سال ۲۰۰۳ در *Anaocypris hispanica*، Yamamoto و همکاران در سال ۲۰۰۶ در *Salvenius leucomaenis* و Schrey و Heist در سال ۲۰۰۷ در *Scaphirhynchus albus* قبلاً گزارش کرده‌اند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

۴-۰-۴- میزان F_{st} و R_{st} , جریان ژنی، شباهت و فواصل ژنتیکی

بر اساس تعاریف، یک جمعیت گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولید مثلی از گروه‌های دیگر همان گونه جدا هستند اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیت‌ها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌ها) به عنوان گونه مطرح نمی‌گردند. در حقیقت رفتارهای تولید مثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولید مثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت می‌باشد (صفری، ۱۳۸۵).

در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه برداری کرد، معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم پوشانی نسلی هستند بنابراین، اطلاعات ژنتیک جمعیت اغلب افراد را از نسل‌های مختلف بررسی می‌کند. وقتی نمونه‌برداری در جایی در بیش از یک زمان صورت می‌گیرد راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی آزمون تمایز بین نمونه‌ها است (Viard *et al.*, 1997).

نکته مهم در ریزماهوره‌ها نرخ جهش بالا در جایگاه‌های ژنی ریزماهوره است و از الگوی جهش نیز نباید غفلت کرد. روش تغییر در ریزماهوره‌ها تعیین کننده وضعیت آماری است که می‌تواند منعکس کننده مهاجرت یا زمان انشعاب باشد. اگر الگوی جهش در ریزماهوره‌ها کاملاً شناخته شود امکان تعیین شاخص آماری برای تمایز فاصله آلی تابع مهاجرت یا زمان انشعاب بین جمعیت‌ها وجود دارد. مدل‌های مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است اما هیچ یک از مدل‌های ارائه شده به طور کامل مناسب برای جایگاه‌های ژنی ریزماهوره نیستند. در نتیجه هر دو روش برآورد مرسوم در تمایز (F_{st}) و برآورد کننده تمایز مخصوص ریزماهوره (R_{st}) به طور معمول در مطالعاتی که از نشانگرهای ریزماهوره استفاده می‌گردد، گزارش می‌شوند. F_{st} و R_{st} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییر پذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Meffe and Carool, 1997).

در این بررسی، نتایج بدست آمده از F_{st} (جدول ۳-۱۷) نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۶۳) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است مشاهده می‌شود. حداقل F_{st} (۰/۰۰) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندرلنگه که دارای

بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴۶) است مشاهده می‌شود که با فاصله جغرافیایی کاملاً هماهنگی دارد. به طور کلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند.

محاسبه F_{st} برحسب فراوانی شان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۴۴) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس و حداقل F_{st} (۰/۰۰۵) بر حسب فراوانی بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندرلنگه مشاهده می‌شود که با فاصله جغرافیایی کاملاً هماهنگی دارد.

نتایج بدست آمده از R_{st} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۲۴۶) بر اساس آزمون AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۰/۷۷) است مشاهده می‌شود. حداقل R_{st} (۰/۰۰) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بریس با نمونه‌های پزم که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴۶/۹۷) است مشاهده می‌شود که با فاصله جغرافیایی کاملاً هماهنگی دارد.

در کل عنوان شده که تفسیر مقدار R_{st} و F_{st} مشکل است. برای مثال مقدار F_{st} همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ زیرجمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیرجمعیت و جدایی کامل جمعیت‌ها) متغیر است. زمانی که F_{st} بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان‌دهنده جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. به هر حال دادن یک معنی بیولوژیکال به این داده‌ها سخت و گمراه کننده است. برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا است و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا است (Wright, 1978; Hartl and Clark, 1989).

اما به طور معمول مقدار F_{st} به طور معقولانه‌ای زیر ۰/۰۵ مطرح می‌شود که محققین ممکن است ساختار بین زیر جمعیت‌ها را ضعیف تفسیر کنند در حالی که آن نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست. نکته دیگر اینکه میزان F_{st} در اکثریت موارد به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی مورفیسم ناشی از جهش به طور موثری میزان F_{st} را تغییر می‌دهد (Wright, 1978; Charlesworth, 1998; Nagylaki, 1998; Hedrick, 1999).

تفاوت معنی دار در تفسیر R_{st} و F_{st} در تشخیص ساختار جمعیت مورد توجه است. استفاده از آزمون‌های غیر پارامتریک وسیله‌ای برای ارزیابی برآورد معنی دار R_{st} و F_{st} است و معنی دار بودن آن با مقدار P آزمون می‌شود (Petit and Mayer, 1999).

در بررسی حاضر دامنه F_{st} و R_{st} به ترتیب $۰-۰/۰۶۳$ و $۰-۰/۲۴۶$ بدست آمد، در حالی که Alam و Islam در سال ۲۰۰۵ در بررسی *Catla catla* حداقل و حداکثر مقدار F_{st} را به ترتیب $۰/۰۰۶$ و $۰/۰۲۲$ ؛ Israel و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی تاس ماهی سبز در ایالات متحده میزان F_{st} را بین $۰/۰۰۲$ الی $۰/۰۰۵$ ؛ Salguero و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی *Anaocypris hispanica* در پرتغال دامنه F_{st} را بین $۰/۰۱۷$ الی $۰/۳۴۴$ ؛ Shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ در بررسی *Clupea harengus* دامنه F_{st} را $۰/۰۰۱$ تا $۰/۰۴۳$ و دامنه R_{st} را $۰/۰۲۹$ تا $۰/۲۷۳$ و Yue و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی *S. formosus* میانگین F_{st} و R_{st} را به ترتیب $۰/۰۴۷$ و $۰/۱۰۳$ بدست آوردند.

همچنین خوش خلق در سال ۱۳۸۵ در بررسی تاسماهی ایرانی حداکثر و حداقل مقدار F_{st} را به ترتیب $۰/۰۳۲$ و $۰/۰۱۱$ ؛ صفری در سال ۱۳۸۵ در مطالعه جمعیت‌های شیپ حداکثر و حداقل مقدار F_{st} را به ترتیب $۰/۰۴۸$ و $۰/۰۰۴$ و نوروزی در سال ۱۳۸۶ در مطالعه جمعیت‌های ازون برون دامنه F_{st} را $۰/۰۲۸$ تا $۰/۰۶۳$ و دامنه R_{st} با احتمال ۹۹ درصد $۰/۰۴۱$ تا $۰/۴۳۹$ بدست آوردند.

Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار F_{st} و فاصله جغرافیایی را مشاهده نکردند و ساختار ژنتیکی ضعیف این ماهی را نشان دهنده جریان ژنی بالا بین مولدین اعلام کردند.

Skaala و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی *Salmo salar* مقدار F_{st} تمایز ژنتیکی معنی‌داری را در تمام جایگاه‌های ژنی نشان داده و به طور کلی F_{st} در نژادهای پرورشی ۲ تا ۸ بار بالاتر از نژادهای وحشی بود که ممکن است به خاطر اثر موسس باشد که افراد بنا کننده یا مؤسس از نژادهای مختلف بودند.

در جدول ۴-۵ مقادیر F_{st} و جریان ژنی (N_m) در بررسی حاضر با نتایج حاصل از دیگر مطالعات جهت مقایسه و تأیید صحت نتایج آورده شده است.

در بررسی حاضر بر اساس معیار Nei در سال ۱۹۷۲ و ۱۹۷۸ بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های مناطق دیر و بریس وجود دارد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های مناطق بندرعباس و بندرلنگه وجود دارد که با فاصله جغرافیایی کاملاً هماهنگی دارد. نزدیکی

جغرافیایی و همجواری مناطق بندرعباس و بندرلنگه موجب جریان ژنی بالا بین آنها شده و این امر باعث شده کمترین فاصله و اختلاف ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی در بین مناطق مختلف را به خود اختصاص دهند.

الگوهای تمایز ژنتیکی بین نمونه‌ها منعکس کننده جدایی جغرافیایی جمعیت‌های نمونه‌برداری شده است و در این بررسی ارتباط معنی داری بین فاصله جغرافیایی و مقدار F_{st} و R_{st} مشاهده شد. به طور کلی بر اساس آزمون AMOVA نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نزدیکتر هستند، از نظر ژنتیکی نیز شباهت بیشتری دارند و با افزایش فاصله جغرافیایی، فاصله و اختلاف ژنتیکی افزایش می‌یابد.

حداکثر F_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی است مشاهده شد که با فاصله جغرافیایی زیاد میان آنها هماهنگی داشته و همچنین محاسبه F_{st} بر حسب فراوانی نیز آنرا تأیید کرد. حداقل F_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندرعباس با نمونه‌های بندرلنگه که دارای بیشترین میزان جریان ژنی است مشاهده شد که با فاصله جغرافیایی کم میان آنها و همجواری هماهنگی دارد.

در خلیج فارس و دریای عمان به دلیل عدم راه اندازی کارگاه‌های تکثیر مصنوعی ماهی سوکلا و پایین بودن احتمال آمیزش خویشاوندی ناشی از تکثیر مصنوعی می‌توان ادعا کرد که تمام نمونه‌های مورد مطالعه متعلق به جمعیت‌های وحشی هستند. در نتیجه نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نزدیکتر هستند، از نظر ژنتیکی نیز شباهت بیشتری دارند و با افزایش فاصله جغرافیایی، فاصله ژنتیکی نیز افزایش می‌یابد.

به هر حال مواقعی که اندازه مطلق جمعیت وحشی کوچک باشد، تکثیر حمایتی می‌تواند تنوع ژنتیکی را در کل جمعیت به طور جدی کاهش دهد (نوروزی، ۱۳۸۶).

در این بررسی میزان R_{st} در تمامی نواحی با احتمال ۹۹ درصد ($P < 0.01$) بیشتر از F_{st} بود بنابر این نتایج پیشنهاد می‌کند که تمامی نواحی نمونه برداری از نظر ژنتیکی تعریف پذیر هستند.

حداکثر R_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه‌های بندر دیر با نمونه‌های بریس که دارای کمترین میزان جریان ژنی است مشاهده شد که با نتایج بدست آمده از F_{st} هماهنگی دارد. حداقل R_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین

نمونه‌های بریس با نمونه‌های پزم که دارای بیشترین میزان جریان ژنی است مشاهده شد که با فاصله جغرافیایی کم میان آنها و همجواری هماهنگی دارد.

میزان R_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه برداری غیر معنی دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی دار بود ($P < 0.01$) یا به عبارتی میزان R_{st} با احتمال ۹۹ درصد ($P < 0.01$) اختلاف معنی داری بین جمعیت ماهی سوکلای منطقه بوشهر با کلیه مناطق به غیر از منطقه دیر نشان می‌دهد و جمعیت ماهی سوکلای منطقه بندرعباس نیز با احتمال ۹۹ درصد ($P < 0.01$) اختلاف معنی داری را با کلیه مناطق به غیر از منطقه بندرلنگه نشان می‌دهد. همچنین جمعیت ماهی سوکلای منطقه بریس چابهار با احتمال ۹۹ درصد ($P < 0.01$) اختلاف معنی داری را با کلیه مناطق به غیر از منطقه پزم چابهار نشان می‌دهد. در نتیجه سه جمعیت مستقل ماهی سوکلا در میان نمونه‌های مورد بررسی از مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان قابل تشخیص می‌باشد:

۱- جمعیت ماهی سوکلای ناحیه بوشهر

۲- جمعیت ماهی سوکلای ناحیه بندرعباس

۳- جمعیت ماهی سوکلای ناحیه چابهار

به طور کلی مهاجرت زیاد در ماهیان و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند (Waples, 1987).

افزایش اختلاف در مقدار F_{st} و R_{st} هنگامی رخ می‌دهد که تعداد افراد زیر ۴۰ تا ۵۰ فرد باشد. البته برآوردهای R_{st} و F_{st} اغلب در یک وضعیت مشخص دارای تفاوت هستند. هنگامیکه F_{st} و R_{st} از دو جنبه مجزا برآورد شده باشد اختلاف آنها زیاد شده و تجزیه و تحلیل آنها ممکن است کاملاً قابل اعتماد نباشد برای مثال هنگامی که از نمونه‌های کوچک با تعداد محدود جایگاه ژنی استفاده شود (Coltman and Pilkington, 1999).

مشکل اصلی F_{st} در ریزماهورها حساسیت پایین آنها به جهش نسبت به جریان ژنی یا مهاجرت است به طوری که در وضعیت SMM، میزان F_{st} مستقل از میزان جهش است. R_{st} در ریزماهورها حساسیت بالاتری به جهش نسبت به جریان ژنی یا مهاجرت دارد و کمتر از F_{st} تمایز جمعیت را منعکس می‌کند و در مدل SMM، R_{st} در کم کردن اختلاف نمونه‌ها مناسبتر از F_{st} خواهد بود. معمولاً میزان R_{st} میانگین بالاتری نسبت به F_{st} دارد زیرا در سطح

تمایز جمعیت اثر جهش بیشتر از اثر مهاجرت است (Balloux *et al.*, 2000).

این رویداد به طور عموم در مطالعات تجربی متعددی مشاهده شده است و به نظر می‌رسد R_{st} در جمعیت‌هایی که ساختار ژنتیکی بالایی دارند بهتر می‌تواند تمایز را منعکس کند (Lugon-Moulin *et al.*, 1999). به همین علت داده‌های R_{st} و F_{st} در این بررسی در مواردی کاملاً هم پوشانی ندارند.

مقایسه گروه‌های AMOVA در تمایز جمعیت‌ها نشان می‌دهد که بیشترین اختلاف بین نمونه‌های هر منطقه وجود دارد بنابراین هر یک از افراد این جمعیت‌ها قسمت بی نظیری از اختلاف ژنتیکی کل را نشان می‌دهند که باید حفاظت شوند. الگوهای تمایز ژنتیکی بین نمونه‌ها منعکس کننده جدایی جغرافیایی جمعیت‌های نمونه برداری شده است و در این بررسی ارتباط معنی داری بین فاصله جغرافیایی و مقدار R_{st} و F_{st} مشاهده شد.

در مدل جریان ژنی ماهیان الگوی جدا سازی بوسیله مسافت مشاهده شده انجام می‌شود و بیان می‌کند که جریان ژنی و فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها رابطه معکوس با یکدیگر دارند (Barber *et al.*, 1999).

جریان ژنی بین نمونه‌های مناطق خلیج فارس با یکدیگر و دریای عمان با یکدیگر بالاتر از جریان ژنی بین نمونه‌های مناطق خلیج فارس و دریای عمان با هم دیگر است. علت چنین امری را می‌توان به عوامل زیست محیطی مختلفی از جمله تفاوت درجه حرارت، شوری، مواد مغذی و جریان‌ات دریایی بین زیستگاه‌های مختلف در شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان نسبت داد. بنابراین تفاوت عوامل زیست محیطی موجود بین زیستگاه‌های شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان موجب محدود شدن جریان ژنی بین آنها و ایجاد تمایز ژنتیکی می‌شود.

۶-۴- نتیجه گیری نهایی

با توجه به ارزیابی مقادیر بدست آمده از فراوانی آلی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی-واینبرگ، F_{st} ، R_{st} و ترسیم درخت فیلوژنی ماهی سوکلا در مناطق مختلف نمونه برداری می توان جمع بندی نمود که ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزاست که عبارتند از:

۱- جمعیت بوشهر ۲- جمعیت هرمزگان ۳- جمعیت چابهار

به نظر می رسد جمعیت ماهی سوکلا بندرعباس وضعیت بهتری نسبت به سایر جمعیت ها داشته باشند زیرا دارای تنوع ژنتیکی بالاتری بوده و این امر سبب افزایش سازگاری با تغییرات ناگوار زیست محیطی می گردد. کاهش اختلاف ژنتیکی منجر به کاهش پتانسیل ژنتیکی و کاهش سازگاری با تغییرات محیطی می شود، بنابر این نظارت بر هر تغییر در ساختار ژنتیک جمعیت های این گونه ضروری است.

کمترین مقدار تنوع ژنتیکی در نمونه های جمعیت بوشهر دیده شد که علت آن تخریب زیستگاه های طبیعی ناشی از توسعه پارس جنوبی و تأسیسات عسلویه است. وجود دخالت های انسانی و فعالیت های مدیریتی در دهه های اخیر در این گونه غالب بر فعالیت های طبیعت شده است، در حقیقت گسترش حمل و نقل زیاد نمونه ها بین مکان های مختلف می تواند ساختار طبیعی جمعیت را تحت تاثیر قرار دهد. فشار صید توسط انسان می تواند جمعیت های محلی این گونه و تنوع آنها را متاثر کند.

با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش فرض های معلوم می توان جمع بندی کرد که نشانگرهای ریزماهورای ابزار بسیار توانمندی برای بررسی تنوع درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی می باشند و برتری های انکار ناپذیری را در این رابطه دارا می باشند. در حقیقت این مطالعه به هدف اصلی خود یعنی ارزیابی کارآمدی ریزماهوراها برای مطالعات ژنتیک جمعیتی بر روی جمعیت های ماهی سوکلا نائل گردیده است و علی رغم تخریب زیستگاه، فشار صیادی، آلودگی های شدید زیست محیطی و کاهش شدید ذخایر ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی نسبتاً بالا بوده و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد.

این مطالعه مدارک و شواهد اولیه را برای وجود جمعیت های متمایز نشان می دهد و با توجه به برنامه در دست اقدام شیلات ایران در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی سوکلا در سواحل جنوبی ایران بهتر است برای مدیریت این

ذخیره، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود. اگر برنامه‌های مدیریتی ذخیره سازی تمامیت ژنتیکی افراد را در برداشته باشند در این صورت جمعیت حفظ می‌شود، اما استفاده از افراد سایر جمعیت‌ها ممکن است تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها را به خطر بیاندازند؛ افراد باقی مانده از یک جمعیت باید به شدت محافظت شوند و برای حفاظت در هنگام گرفتن ژن باید از تعداد زیاد مولدین استفاده کرد و هنگامی می‌توان از جمعیت‌های این گونه محافظت کرد که در مدیریت به ساختار جمعیت محلی شامل برنامه‌های دقیق ذخیره سازی و مشکلاتی همانند کاهش زیستگاه‌ها و صید بی رویه توجه شود.

۷-۴- پیشنهادها

- ۱- با توجه به توانایی بالای روش میکروستلایت توصیه می‌گردد در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت سایر گونه‌ها این روش مورد استفاده قرار گیرد.
- ۲- با توجه به برنامه در دست اقدام شیلات ایران در زمینه تکثیر مصنوعی ماهی سوکلا در سواحل جنوبی ایران لازم و ضروری است برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی موجود، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود.
- ۳- از جابجایی ماهیان صید شده به سایر مناطق به منظور تکثیر مصنوعی جلوگیری شود و در کارگاه‌های تکثیر مصنوعی از بیشترین تعداد مولد استفاده شود.
- ۴- سایر نواحی زیستی ماهی سوکلا در سواحل جنوبی ایران بررسی شوند.
- ۵- استفاده از تعداد بیشتر آغازگر در مباحث ژنتیک جمعیتی، دستیابی به جمعیت‌های نادر ژنتیکی را ساده‌تر خواهد کرد، در این خصوص بررسی فیلوژنتیکی با تعداد بیشتر آغازگرها فاصله ژنتیکی را در صورت بروز تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشخص خواهد کرد لذا برای مطالعات ژنتیک جمعیت از تعداد آغازگر بیشتری استفاده گردد.
- ۶- با توجه به ارزیابی مقادیر بدست آمده ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزای بوشهر، هرمزگان و چابهار است حال با توجه به تفاوت جمعیتی پیشنهاد می‌گردد که اختلافات این گونه در نواحی مختلف جمعیتی از نظر شرایط اکولوژیک و بیولوژی تولید مثل، زمان تخم‌ریزی، محل تخم‌ریزی و... مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.
- ۷- جهت تکمیل اطلاعات ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان جمعیت‌های ایرانی با جمعیت‌های کشورهای دیگر از نظر ژنتیکی مقایسه گردند.
- ۸- میزان تمایز ژنتیکی نمونه‌های بوشهر بیانگر آن است که باید برنامه کامل حفاظت ذخایر ژنتیکی این گونه از طریق کاهش استرس‌های محیطی و ایجاد بانک ژنی صورت پذیرد.
- ۹- علی‌رغم تخریب زیستگاه و فشار صید و کاهش شدید ذخایر ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی وجود دارد و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد.

Abstract

Genetic divergence within and between wild populations of cobia, *Rachycentron canadum* (Goode, 1884) was assessed by means of microsatellite analysis in the Persian Gulf and Oman Sea. Between June and April of 2007, a small sample of the pectoral fin in the individuals were collected from 184 fish and preserved in 95% ethanol at 4°C and transferred to the biotechnology library of the Caspian Sea ecological research institute. Ten microsatellite markers were used to estimate the level of genetic diversity within six wild populations of cobia, and the degree of genetic differentiation between them was compared.

Total genomic DNA was extracted by proteinase-K digestion, phenol: chloroform: isoamyl alcohol extraction and ethanol precipitation. The quality and quantity of DNA was assessed using 1% agarose gel electrophoresis and spectrophotometric method. Polymerase chain reactions (PCR) were conducted on the target DNA using 10 paired microsatellite primers. PCR products were separated by electrophoresis on polyacrylamid gels (8%) that were stained using silver nitrate. Electrophoretic pattern and DNA bands were analyzed by LabImage software. Allel count and frequency, the effective and real allele, expected heterozygosity and observed heterozygosity, genetic diversity, Shannon Information index, genetic resemblance and genetic distance, F_{st} , R_{st} , gene flow and Hardy-Weinberg equilibrium based on analysis of molecular variance (AMOVA) were calculated using the GENALEX and PopGene software. The dendrogram was constructed and drawn using TFPGA program and MEGA version 4 for any level of the hierarchy.

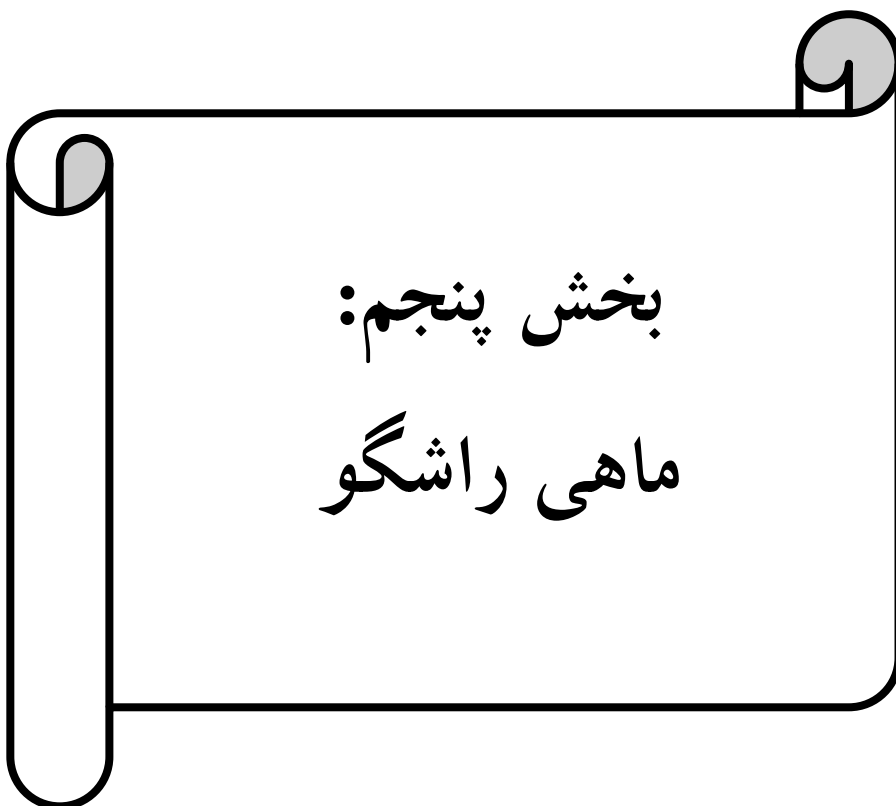
Seven of the ten loci analyzed were polymorphic in all the populations. Mean observed and effective allele number was 12.357 and 8.319, respectively. Mean observed and expected heterozygosity was 0.655 and 0.874, respectively. It was also seen that specimens from all region weren't in Hardy-Weinberg expectation in most of the loci ($P < 0.05$).

Based on analysis of molecular variance (AMOVA) highest F_{st} (0.063) was observed when comparing specimens from Dayer Port zone and Pozm of Chabahar zone ($N_m = 3.7$). Lowest F_{st} was observed when comparing specimens from Bandarabass zone and Lengeh port zone ($N_m = 346$). Significant differences ($P < 0.01$) weren't observed between R_{st} recorded in the same region specimens studied but were observed between R_{st} recorded in the different region specimens studied. Highest genetic distance (0.815) and lowest genetic resemblance (0.443) was observed between specimens from Dayer Port zone and Beris of Chabahar zone. Lowest genetic distance (0.085) and highest genetic resemblance (0.919) was observed between specimens from Bandarabass zone and Lengeh port zone. Based on the genetic dendrogram tree derived by applying UPGMA algorithm, *R. canadum* specimens from Booshehr zone and Dayer Port zone together to one cluster which divided into two cluster, one of which includes specimens from Pozm of Chabahar zone and Beris of Chabahar zone while the other cluster includes specimens from Lengeh port zone and Bandarabass zone. It is evident that the main population of this species belongs to the Booshehr region.

Result obtained from the present study show that at least 3 different population of *R. canadum* are found in the northern coasts of Persian Gulf and Oman Sea, which are including the Booshehr region population, the Bandarabass region population and the Chabahar region population.

Specific markers were also identified for of the Booshehr zone population identified. The Booshehr population zone can be identified using primers *Rca* 1B-E08A, *Rca* 1B-F07, *Rca* 1B-H09 and *Rca* 1-A04.

Key word: *Rachycentron canadum*; Cobia; populations genetic; Persian Gulf; Oman



بخش پنجم:
ماهی راشگو

چکیده

نمونه برداری از ۲۳۵ نمونه راشگوی صیدگاه استانهای خوزستان، بوشهر، هرمزگان و چابهار از تابستان ۸۶ تا بهار ۸۹ انجام شده بود، استخراج DNA با استفاده از ۲ گرم بافت باله از هر کدام از نمونه ها و سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از ۹ آغازگر پدید انجام گرفت و محصول واکنش بر روی ژل اگاروز ۳٪ الکتروفورز گردید. بیشترین میزان هتروزایگوسیتی در استانهای بوشهر و بندرعباس ($0,22 \pm 0,13$) و کمترین در چابهار ($0,171 \pm 0,175$) دیده شد. میزان متوسط تمایز در بین ژنوتیپها $0,084 \pm 0,01$ و متوسط جریان ژنی $5,39 \pm 0,01$ می باشد. براساس فاصله Nei(1972) بیشترین فاصله بین نمونه های مناطق خوزستان و بوشهر ($0,9816$) و کمترین فاصله بین نمونه های مناطق بوشهر و چابهار ($0,9523$) به دست آمد. دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) و Nei(1978) نمونه های مناطق بوشهر و خوزستان را در یک گروه قرار داد و نمونه های چابهار را در یک گروه جداگانه قرار داد.

کلمات کلیدی: ماهی راشگوا، خلیج فارس، دریای عمان، ژنتیک جمعیت، رپید.

۱-۵-مقدمه

در کره زمین (در سه سطح اکوسیستم، گونه و ژن) و بر هم کنش این عوامل اطلاق می شود. در دهه اخیر با افزایش روند تخریب محیط زیست در سطح جهان، توجه به مسأله تنوع زیستی معطوف شده است و در این میان حفاظت و بهره برداری از منابع ژنتیکی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقاء موجودات در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است و امروزه بیوتکنولوژی مدرن به دنبال استفاده گسترده تر از آن می باشد. برای کسب شناخت و آگاهی از ساختار و وضعیت موجودات دریا می توان از علم ژنتیک استفاده نمود. مواد ژنتیکی در معرض تغییرات و جهش های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی، از درون سلول و یا بیرون ارگانیسم، در هنگام همانندسازی باعث جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می گردند. بنابراین در گونه های جانوری یا گیاهی، جمعیت ها و نژادهای متفاوتی ایجاد می گردد که شناسایی آنها از روی صفات ظاهری امکان پذیر نیست. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شود چند شکلی ژنتیکی نام دارد. استفاده از تفاوت توالی های DNA از دقیقترین روشها در طبقه بندی موجودات هستند. و امروزه نشانگرهای DNA به ابزاری قابل اعتماد در مطالعات تنوع گونه ای تبدیل شده اند (صفری، ۱۳۸۵).

دریا بستر بسیار مناسبی جهت تحقیق و توسعه است. اما تاکنون همه پتانسیلهای آن شناخته نشده است. حتی در مورد موجودات زنده شناخته شده نیز دانش کافی جهت مدیریت کارا و بهره برداری بهینه از آنها وجود ندارد. این لذا اهمیت و ارزش بیوتکنولوژی دریایی در بهره برداری بهینه و پایدار از منابع دریایی بیشتر نمود می یابد. (آزادی، ۱۳۷۸) موجودات زنده دریایی بخش اعظمی از ذخایر زیستی کره زمین را تشکیل می دهند. از آنجائیکه حیات از دریاها و اقیانوسها سرچشمه گرفته است، لذا بخش اعظمی از موجودات نخستین و منحصر به فرد در دریاها زندگی می کنند. بنابراین، دریاها منبع عظیم ذخایر ژنتیکی به شمار می روند. اقیانوسها و دریاها بیش از سه چهارم سطح زمین و موجودات دریایی، بخش اعظمی از تنوع بیولوژیکی آن را تشکیل می دهند. این تنوع، منبع ترکیبات منحصر به فردی است که دارای پتانسیلهای صنعتی در زمینه هایی همچون تولید مواد دارویی، آرایشی، افزودنی های غذایی، کاوشگرهای مولکولی، آنزیمها، مواد شیمیایی ظریف (Fine chemical) و مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی است (احمدیان، ۱۳۷۷).

استفاده از منابع آبریان دریایی بصورت مطمئن و پایدار، یکی از ملزومات صید از دریاهاست. صید بی‌رویه باعث صدمه یافتن اکوسیستم‌های دریایی شده و حتی به از بین رفتن برخی گونه‌ها می‌انجامد. به همین دلیل و با افزایش رشد جمعیت و نیاز به منابع دریایی، اهمیت مدیریت اصولی ذخایر روشن می‌شود. بسیاری از محدودیتهای روشهای مختلف اصلاح نژاد و شناسایی ساختارهای ژنتیکی آبریان دریایی ریشه در فقدان ابزارهای مناسب برای مطالعات ژنتیکی دارد. مارکرهای مولکولی و نشانگرهای DNA ابزار مناسبی هستند که براساس آن می‌توان جایگاه ژنی و کروموزومی ژنهای تعیین کننده صفات مطلوب را شناسایی کرد.

امروزه جمعیت اغلب ماهیان مهم تجاری در اکثر اکوسیستم های جهان و از جمله خلیج فارس و دیای عمان بعلت صید غیرمجاز به شدت کاهش یافته و اندک ذخایر باقیمانده ماهیتن هم به جهت تخریب بسترهای تخم‌ریزی و فشار صید بی‌رویه، صید غیرقانونی و آلودگی با مشکلاتی مواجه شده است. لذا تکثیر طبیعی آنها کاهش یافته است. تصمیمات کنوانسیون *CITES، کشورهای مشترک در یک اکوسیستم آبی باید هر یک از گونه‌های خود را براساس نتایج گشت دریایی ارزیابی ذخایر کنند لذا احتمال می‌ورد که در آینده تعیین سهمیه صید و مدیریت آن بر مبنای جمعیت‌های شناسایی شده از هر گونه صورت پذیرد (سالاری، ۱۳۸۷). لذا گسترش برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیتهای بازسازی ذخایر ماهی راشگو هنگامی مفید است که ابتدا تنوع ژنتیکی ساختار جمعیت آن انجام پذیرد.

اصولا بررسی فیلوژنتیک، یک پیش نیاز ضروری برای فعالیت های زیست شناسی، تکامل، زیست شناسی مولکولی و پزشکی است. از سوی دیگر هر چه دانش ما از زیست شناسی، پراکنش و زیستگاه یک گونه بیشتر باشد، استراتژیهای تلاش برای حفاظت از آن گونه را موفقیت آمیز تر می نماید. با توجه به ارزش والای تغذیه ای، اکولوژیکی و شیلاتی راشگو، تدابیر مدیریتی میزان صید و از طرفی در دستور کار بودن موضوع تکثیر و پرورش آن در سالهای آتی، انجام این تحقیق امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. بنابر این تحقیق حاضر بر اساس تکنیک مولکولی آنالیز RAPD، PCR –sequencing، با استفاده از ژنهای مستقر بر ژنوم ماهی راشگو در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان، با اهداف کلی زیر انجام شد:

۱- تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی *Eleutheronema tetradactylum* در محدوده مورد نظر مورد مطالعه با

استفاده از دو روش RAPD، PCR –sequencing

- ۲- بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی *Eleutheronema tetradactylum* در محدوده مورد نظر مورد مطالعه با استفاده از دو روش RAPD ، PCR –sequencing
- ۳- شناسایی زیرگونه های ماهی *Eleutheronema tetradactylum* در محدوده مورد نظر مورد مطالعه با استفاده از دو روش RAPD ، PCR –sequencing
- ۴- ارزیابی جمعیت های چند ژنی ماهی راشگو؟
- ۵- مقایسه پلی مورفیسم *Eleutheronema tetradactylum* با گونه های *Polynemus sextarius* (راشگو شش خط) *Polynemus plebeius* (راشگو ۵ خط) *Polynemus heptadactylus* (راشگو ۷ خط) (Curier, 1829) صید شده در منطقه مورد مطالعه.
- ۶- تعیین توالی ناحیه کنترلی ژن (COI) در پنج گونه ماهی راشگو صید شده.
- ۷- مقایسه اطلاعات حاصل از دو روش جداگانه بکار برده شده (RAPD ، PCR –sequencing) در زمینه اهداف فوق و بررسی دقت هر یک
- ۸- فراهم نمودن بستر علمی جهت اتخاذ استراتژی های موثر و کارا در حفاظت از ذخایر ماهی راشگوی خلیج فارس و دریای عمان با توجه به بررسی های اولیه این فرضیات مطرح گردید:
- ۱- نشانگرهای مولکولی RAPD ، PCR –sequencing قادر به نمایان سازی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه ای راشگوی ۴ خطی و سه گونه صید شده دیگر را دارند.
- ۲- راشگوی ۴ خطی صید شده هر منطقه مورد مطالعه دارای تنوع ژنتیکی می باشند و این تنوع متمایز از یکدیگر است.
- ۳- ۴ گونه راشگوی صید شده در محدوده شمال خلیج فارس و دریای عمان دارای تنوع ژنتیکی بین گونه ای می باشند.

۲-۵- کلیات

۱-۲-۵- بیولوژی ماهی راشگو

۱-۱-۲-۵- رده بندی ماهی راشگو

- Domain: Eukaryota (Whittaker & Margulis, 1978-eukaryotes)
- Kingdom: Animalia (Linnaeus, 1758-animals)
- Sub kingdom: Bilateria (Hat Schek, 1888)(Cavalier-smith, 1983-bilaterians)
- Branch: Deuterostomia (Grobber, 1908-Deuterostomes)
- Infrakingdom: Chordonia (Haeckel, 1874) Cavalier-Smith, 1998)
- Phylum: Chordata (Bateson, 1885-Chordates)
- Subphylum: Vertebrata (Cuvier, 1812-Vertebrates)
- Infraphylum: Gnathostomata (Auct-Jawed Vertebrates)
- Super Class: Osteichthyes (Huxely, 1880-Boyd fishes)
- Class: Osteichthyes (Huxely, 1880-Boyd fishes)
- Sub Class: Actinopterygii (Ray-Finned Fishes)
- Infraclass: Actinopteri
- Cohort: Clupeocephala
- Superorder: Acanthopterygii
- Order: Perciformes (Perch-like Fishes)
- Suborder: Percoidei
- Family: Polynemidae (Threadfins)
- Genus: Eleuteronema
- Species: E.tetradactylum (tetradactylus)

۱-۱-۱-۲-۵-نام: ماهی راشگو چهار خط

۲-۱-۱-۲-۵- نام علمی: *Eleutheronema tetradactylus*



شکل ۸۰-۵- ماهی راشگو چهار خط (*Eleutheronema tetradactylus*)

۳-۱-۱-۲-۵-انتشار جغرافیایی

غرب اقیانوس آرام (از خلیج فارس تا گینه نو) و شمال استرالیا (از دهانه رود Ashburton) تا غرب استرالیا (دهانه رود Queensland, Mary).

۴-۱-۱-۲-۵- شناسایی و مطالعات انجام یافته

اولین بار این گونه (Shaw, 1804) که حاصل جمع‌آوری (Russell, 1803) از هند بود، گزارش شد. گزارش با نام محلی *Polynemus coccus* توسط (Macleary, 1878) در استرالیا نیز ثبت گردیده است. سپس (Motomura, 2002) گزارشی از جمع‌آوری این گونه با نام مترادف *Polynemus teria* ارائه نمود. مقایسه واریانس ریخت‌شناسی و هتروزایگوسیتی میان این گونه و *Strongylura strongylura* جمع‌آوری شده از خود الزیبر عراق انجام یافته است. (sabah, et al., 1989)

۵-۱-۱-۲-۵- ریخت شناسی (Morphology) گونه

پوزه زیاد جلو آمده. خط جانبی دارای ۷۸-۸۰ فلس. در خط عرضی بدن ۹ فلس بالای خط حسی، یک فلس روی خط و ۱۴ فلس زیر آن خط است. چشمها بوسیله یک پرده ژلاتینی پوشیده شده است. فک بالایی فلسی، سر تا نوک پوزه از فلس پوشیده شده است. سوراخهای قدامی و خلفی بینی نزدیک بهم می باشند.

پیش سر پوش برانشی داندانه دار است. لب بالایی وجود ندارد و لب پایینی فقط نزدیک زاویه دهان خوب رشد کرده است. نواری پهن از داندانهای رشته‌ای در هر دو فک، تا خارج فکها ادامه پیدا کرده است. شبیه این دندانها روی استخوان تیغه بینی و سقف وجود دارد. اولین باله پشتی دارای ۸ خار و و دومی دارای یک خار Patnaik (1967) به دو نمونه هرمافرودیت با (404, 405mm T.L) که از دریاچه Chilka هند صید شده بودند اشاره نمود و (1974) Stranger به مطالعه جنسیت و رشد این گونه در آبهای استرالیا پرداخته است. (FAO species catalogue for fishery purposes)

Tetractylus در ۶ ماهه اول زندگی خود بسیار سریع رشد می کند. در سال اول زندگی به 300 mm L_F و در سال سوم به 450 mm L_F می رسند. اندازه نرها از $340-470 \text{ mm L}_F$ ، هرمافرودیتها $250-460 \text{ mm L}_F$ و مادهها بین $450-500 \text{ mm L}_F$ است. در شمال شرقی سواحل شرقی Queensland استرالیا اغلب گونه‌های با سایز $450-500 \text{ mm L}_F$ نر بودند. هرمافرودیتها شامل ماهیان ۱ الی ۲ ساله‌اند و تغییر جنسیت به ماده در ماهیان ۳-۲ ساله پدید می آید. طبق گزارش (Stanger, 1974) نرها پس از تخم‌ریزی بلافاصله تغییر جنسیت می دهند و گاهی ممکن است تا تخم‌ریزی بعدی جنسیت نر خود را حفظ کنند. تغییر جنسیت از هرمافرودیت به مادگی کاملاً به تغییر فصل بستگی دارد.

در آبهای Queensland, Townsville استرالیا تخم‌ریزی در آخر اکتبر شروع می شود (Stanger, 1974) گونه های جمع آوری شده از شمال شرقی سواحل Queensland, Townsville در نوامبر و دسامبر شامل نمونه های تخم‌ریزی کرده و آماده تخم‌ریزی بود. (Kailola and Stewart in Kaillola et al., 1993)

* L_F = Fork length

* T_L = Total length

Terraductylus که تنها یک بار در سال تخم‌ریزی می‌کنند نیز در ابهای Queensland نیز شناسایی شده است (Stanger, 1974) در شمال دریای عرب نمونه‌ای از این ماهی توسط (Karandikar and Palekar, 1950) گزارش شده است.

Kaywade (1970) معتقد بود گونه‌هایی که در آبهای هند هستند به 360-390mm T.L برسند بالغ می‌گردند. Karandikar and Palekar (1950) سائز تخمهای این گونه را در آبهای هند بدین شرح یافتند: تخمدانهای نابالغ دارای تخمهای با خطی کمتر از ۰/۴mm اند. تخمدانهای در حال بلوغ حاوی تخمهای با قطر ۰/۴۵-۰/۶۸mm و تخمدانهای بالغ تخمهای با قطر ۰/۷-۱mm دارند. جسم زرد در تخمهای بالغ ۰/۳-۰/۲۵ قطر دارد.

Sarojini and Malhotra (1952) رشد لارو ماهی راشگو را از ۶ میلی‌متری تا مرحله Juvenile بررسی کردند. سومین رشته بندرت بلندتر از باله لگنی است و چهارمین رشته بلندترین است و طولش ۱۵-۲۸٪ طول استاندارد (St.L) ماهی است، بطوریکه به ابتدای باله دوم سینه ای می‌رسد. (FAO species catalogue for fishery purposes)

و ۱۵ شعاع می‌باشد. باله مخرجی با ۲ خار و ۱۷ شعاع دارد. باله سینه ای ۴ خار آزاد و ۱۷ شعاع دارد. دومین باله پتی و مخرجی و دمی تقریباً بطور کامل فلسی‌اند. باله دمی عمیقاً دو شاخه شده اما رشته ای نیست خط جانبی ساده است. از انتهای بالای سرپوش برانشی شروع شده تا لوب پایینی باله دمی ادامه می‌یابد یا در پایه باله دمی دو شاخه می‌شود. شاخه بالایی به پایین لوب بالایی باله دمی می‌رود و شاخه پایینی باز در لوب پایینی به دو شاخه تقسیم می‌شود. ۳-۸ رشته آبششی در بالای کمان آبششی و ۱۰-۳ عدد در زیر کمان آبششی قرار می‌گیرند و در کل ۱۸-۶ رشته آبششی دارند. در طول دوره رشد گاهی رشته‌های آبششی بالا و پایین کمان آبششی با صفحات دندان‌های رشته‌ای کوچک جایگزین می‌شوند. این رشته‌ها (هم در بالا و هم در پایین کمان آبششی) با رشد ماهی کوچکتر می‌شوند. ۱۵ مهره قبل از ناحیه دمی و ۱۵ مهره در ناحیه دمی دارند و دارای ۲-۱ عدد استخوان Supraneural هستند. این ماهی فاقد کیسه شنا است. باله سینه‌ای دو قسمتی است. ۱۶-۱۸ خار شعاعی نشده دارد و بخش اول بصورت ۴ رشته‌ای است. اولین آنها کوتاهتر است و بن باله لگنی نمی‌رسد. دومین رشته باله سینه‌ای رشد خوبی کرده و بلندتر از بن باله لگنی است.

بالای سر و تنه کمی نقره‌ای تیره و در قسمتهای پایینی روشنتر می‌شود. حاشیه باله اول و دوم پشتی سیاه رنگ است. بقیه بدن کمی تیره و سیاه است. در گونه‌های بزرگی که به ۳۵۰mm طول استاندارد برسند، رنگ باله زرد

روشن یا مات می گردد. رشته‌های سینه‌ای سفیداند. بن باله مخرجی زرد است و بقیه قسمت‌های آن شیری رنگ می‌باشد. بن باله دمی نیز زرد است اما مابقی قسمت‌های آن سیاه رنگ است (FAO species catalogue for fishery purposes).

کیسه شنا در لاروها بخوبی رشد می یابد و تنها آثاری از آن در ماهیان جوان و بالغ باقی می ماند. فرم عمومی بدن در لاروهای ۱۵ میلی متری نمایان می شود.

بزرگترین نمونه صید شده حدود ۲ m طول و ۱۴۵ کیلو گرم وزن داشته است و توسط kailola و Stewart در سال ۱۹۹۳ گزارش شده است.

۶-۱-۱-۲-۵- صید

یکی از مهمترین گونه‌های صیادی در کشور کویت، هند، تایلند، ویتنام، سنگاپور و اندونزی است و یکی از بیشترین ماهیان است که در صید گاه‌های بنگلادش، میانمار، کامبوجیا و شمال استرالیا صید می شود. این ماهی عموماً توسط تور گوشگیر صید شده و البته گاهی توسط تور Trawl نیز صید می شود. محل صید عمدتاً در آب‌های کم عمق دریاها و در رودخانه‌های بزرگ است. در استرالیا صید این ماهی توسط قلاب یکی از ورزش‌های تفریحی است.

عرضه در بازار: بصورت تازه، منجمد و نمک سود شده می باشد.

۷-۱-۱-۲-۵- زیستگاه

عموماً در آب‌های ساحلی (Continental shelves) و بسترهای گلی و ماسه‌ای زیست می کنند. این ماهی بویژه در گونه‌های نابالغ (Juvenile) در آب‌های شور زندگی می کنند.

لاروهای (T.L) * ۷-۳۰ mm عموماً از کوبه پودها، میگو، نوزاد میگو و بعضاً لارو میگو تغذیه می کنند. لاروهای ۳-۶۰ mm(T.L) عمدتاً از Mysid سخت‌پوستان و گونه‌های بالغ بعنوان منبع غذایی استفاده می کنند گونه‌های بالغ نیز از ماهیان مانند Sillaginids, Mugilids و Sciaenids و گاهی از هم‌نوعان کوچکتر خود تغذیه می نمایند.

* T. L= Total length

دریا بستر بسیار مناسبی جهت تحقیق و توسعه است. اما تاکنون همه پتانسیلهای آن شناخته نشده است. حتی در مورد موجودات زنده شناخته شده نیز دانش کافی جهت مدیریت کارا و بهره‌برداری بهینه از آنها وجود ندارد. این لذا اهمیت و ارزش بیوتکنولوژی دریایی در بهره‌برداری بهنه و پایدار از منابع دریایی بیشتر نمود می‌یابد. (آزادی، ۱۳۷۸)

موجودات زنده دریایی بخش اعظمی از ذخایر زیستی کره زمین را تشکیل می‌دهند. از آنجائیکه حیات از دریاها و اقیانوسها سرچشمه گرفته است، لذا بخش اعظمی از موجودات نخستین و منحصر به فرد در دریاها زندگی می‌کنند. بنابراین، دریاها منبع عظیم ذخایر ژنتیکی به شمار می‌روند. اقیانوسها و دریاها بیش از سه چهارم سطح زمین و موجودات دریایی، بخش اعظمی از تنوع بیولوژیکی آن را تشکیل می‌دهند. این تنوع، منبع ترکیبات منحصر به فردی است که دارای پتانسیلهای صنعتی در زمینه‌هایی همچون تولید مواد دارویی، آرایشی، افزودنی‌های غذایی، کاوشگرهای مولکولی، آنزیمها، مواد شیمیایی ظریف و مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی است (احمدیان، ۱۳۷۷).

استفاده از منابع آبزیان دریایی بصورت مطمئن و پایدار، یکی از ملزومات صید از دریاهاست. صید بی‌رویه باعث صدمه یافتن اکوسیستم‌های دریایی شده و حتی به از بین رفتن برخی گونه‌ها می‌انجامد. به همین دلیل و با افزایش رشد جمعیت و نیاز به منابع دریایی، اهمیت مدیریت اصولی ذخایر روشن می‌شود. بسیاری از محدودیتهای روشهای مختلف اصلاح نژاد و شناسایی ساختارهای ژنتیکی آبزیان دریایی ریشه در فقدان ابزارهای مناسب برای مطالعات ژنتیکی دارد. مارکرهای مولکولی و نشانگرهای DNA ابزار مناسبی هستند که براساس آن می‌توان جایگاه ژنی و کروموزومی ژنهای تعیین کننده صفات مطلوب را شناسایی کرد.

امروزه جمعیت اغلب ماهیان مهم تجاری در اکثر اکوسیستم‌های جهان و از جمله خلیج فارس و دیای عمان بعلت صید غیرمجاز به شدت کاهش یافته و اندک ذخایر باقیمانده ماهیتن هم به جهت تخریب بسترهای تخم‌ریزی و فشار صید بی‌رویه، صید غیرقانونی و آلودگی با مشکلاتی مواجه شده است. لذا تکثیر طبعی آنها کاهش یافته است. تصمیمات کنوانسیون CITES، کشورهای مشترک در یک اکوسیستم آبی باید هر یک از گونه‌های خود را براساس نتایج گشت دریایی ارزیابی ذخایر کنند لذا احتمال می‌ورد که در آینده تعیین سهمیه صید و مدیریت آن بر مبنای جمعیت‌های شناسایی شده از هر گونه صورت پذیرد (سالاری، ۱۳۸۷). لذا گسترش

برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیتهای بازسازی ذخایر ماهی راشگو هنگامی مفید است که ابتدا تنوع ژنتیکی ساختار جمعیت آن انجام پذیرد.

۱-۲-۱-۲-۵-راشگوی شش خطی

Polynemus sextarius (Bloch & Schneider 1801)
(*Poly dactylus sextarius*)

۲-۲-۱-۲-۵-نام علمی

Blacksport threadfin



شکل ۸۱-۵ راشگو شش خط (*Polynemus sextarius*)

۳-۲-۱-۲-۵-مشخصات عمده

پوزه جلو آمده. چشمها بوسیله یک پرده ژلاتینی پوشیده شده است. دهان بزرگ و تا عقب چشم می رسد. فک بالا فلسی. سه تا نوک پوزه از فلس پوشیده شده است. سوراخهای قدامی و فلسی بینی نزدیک یکدیگرند. پیش سرپوش برانشی دندانان دندانان دار است. یک خار کوتاه و کمی قوی در مبدا شروع خط جانبی وجود دارد. لب بالا کم و لب پایین بخوبی رشد کرده و تا سمفیز ادامه پیدا نکرده است. فکها دارای نواری از دندانهای رشته ای شکل و یک نوار شبیه به آن روی سقف قرار دارد. استخوان تیغه بینی بدون دندان است و خط جانبی حدود ۵۰ فلس دارد. در خط عرضی بدن ۵ فلس روی خط جانبی و یک فلس روی آن خط و ۸-۹ فلس زیر آن قرار دارد. اولین باله پشتی دارای ۸ خار و دومی دارای ۱ خار و ۱۳ شعاع است. باله مخرجی با ۳ خار و ۱۳ شعاع و باله سینه ای با ۶ شعاع آزاد و دو تای بالایی بلندترند + ۱۴ شعاع و باله شکمی با ۱ خار و ۵ شعاع، باله پشتی و باله مخرجی و قسمت قاعده ای باله دم فلسی اند. باله دم عمیقا دو شاخه و شاخه ها نوکدارند. بعلت اندازه کوچک ان از

لحاظ اقتصادی خیلی مورد توجه نمی باشد. در مناطق کم عمق ماسه ای زندگی می کند و از سخت پوستان کوچک عمدتا میگو و ماهیان و کف زیان تغذیه می کند.

رنگ: بالا زیتونی طلایی و پایین تن نقره ای. باله ها زرد با خالهای مشکی و سرپوش برانسی با خالهای مشکی و یک کله بزرگ سیاه زیر قسمت جلویی اولین باله پشتی در روی خط جانبی وجود دارد. روی باله ها تعداد زیادی خالهای کوچک سیاه دیده می شود. سائز حداکثر ۳۰cm عموما ۲۰-۱۵cm است

۴-۲-۱-۲-۵-تشار جغرافیایی: از شمال منطقه ۷۱ و ۵۷ صیادی ولی تا سواحل شمالی استرالیا کشیده نمی شود. همچنین از غرب مناطق صیادی مذکور تا پاکستان.

شکل ترال کف کش صید



Polynemus Plebeius(Br

شکل ۸۲-۵ - راشگو پنج خط (*Polynemus Plebeius*)

۳-۳-۱-۲-۵- مشخصات عمده

بدن کشیده و گاهی فشرده. پوزه جلو آمده. چشمها بوسیله یک پرده ژلاتینی پوشیده شده است. دهان بزرگ و دندانهای کوچکی دارد. لب بالایی وجود نداشته و لب پایینی بخوبی گسترش یافته است. چشمها درشت و بوسیله یک پرده ژلاتینی پوشیده شده است. باله سینه ای ۵ شعاع آزاد ۲ تای بالایی بلند ترند و به باله شکمی می رسند. باله دمی برابرند. فلسهای کوچک و زبراند. رنگ زیتونی با خطوط تیره باریک. باله سینه ای سیاه است و وسط باله لگنی سفید و اطراف آن خاکستری است. باله کمری و دمی خاکستری تیره است. این ماهی عمدتا در کف آبهای کم عمق گلی و در نواحی قاره ای بسر می برند و عمدتا از سخت پوستان کوچک خصوصا میگو و خرچنگهای کوچک، ماهیها و کف زیان تغذیه می کنند. سائز حداکثر ۴۵ cm و عموما ۳۰-۲۵ cm است

۴-۳-۱-۲-۵- انتشار جغرافیایی: بخش شمالی منطقه ۷۱ و ۵۷ صیادی و شمال تا سواحل استرالیا و غرب تا شرق آفریقا.

۵-۳-۱-۲-۵- محل صید: عمدتاً از آبهای کم عمق صید می شوند و بیشتر توط تورهای عمودی در سواحل و تورهای trawl کف کش صید میشوند.

۴-۱-۲-۵- راشگوی هفت خط

Polynemus heptadactylus (Cuvier), 1829

Polydactylus heptadactylus (Cuvier), 1829

Polydactylus multiradiatus (Gunther), 1860

Seven finger Threadfin

۱-۴-۱-۲-۵- نام انگلیسی:



شکل ۸۳-۵ - راشگوی هفت خط (*Polynemus heptadactylus*)

۲-۴-۱-۲-۵- مشخصات عمومی: بدن کشیده و گاهی فشرده. پوزه کشیده، دهان بزرگ با دندانهای کوچک. لب بالایی وجود ندارد. اما لب پایینی بخوبی گسترش یافته. چشمها بزرگ اند و با یک پرده ژلاتینی پوشیده شده اند. باله سینه ای دو قسمتی است. قسمت بالا دارای شعاعهای بدون انشعاب است. بخش پایین قسمت باله سینه ای ۷ رشته ای است و سومین، چهارمین و پنجمین رشته بلندتر از بقیه اند بطوریکه به ابتدای باله مخرجی میرسند. باله دمی چنگالی است و لبهای آن یک اندازه اند. دارای پولکهای زبراند.

عمدتا در آبهای کم عمق و گلی و کف آبهای نواحی قاره ای و آبهای نیمه شور زیست می کند. تغذیه: عمدتاً از سخت پوستان کوچک (مخصوصاً میگو)، ماهیها و کف زیان. رنگ: انتهای ماهی قهوه ای است و پهلوها طلایی است. باله سینه ای و حاشیه بقیه باله ها مشکی است. - اندازه: حداکثر ۲۵ cm و عموماً بین ۱۵-۱۲ cm

۳-۴-۱-۲-۵- انتشار جغرافیایی

شمال غرب ناحیه ۷۱ و ۵۷ صیادی (به جز جنوب دریای چین)، جنوب تا شمال سواحل استرالیا و غرب ناحیه مذکور تا پاکستان.

۴-۴-۱-۲-۵- صید

از آبهای کم عمق نواحی قاره ای و دریاچه های نیمه شور بزرگ صید شده اند و توسط تور ترال کف کش، تور گوش گیر و آلات صید رایج به دام می افتند.

۲-۲-۵- مروری بر مطالعات انجام شده

مطالعات ژنتیکی که مخصوصاً روی ماهی راشگو انجام شده باشد یافت نگردید و می توان گفت تحقیق مذکور در نوع خود منحصر به فرد می باشد. اما از دو روش به کار گرفته نشده در این تحقیق جهت مطالعه تنوع ژنتیکی سایر ماهیها و آبزیان در ایران و جهان انجام یافته است که به برخی از آنها اشاره می گردد:

۱-۲-۲-۵- مطالعات انجام شده در ایران

قرایی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RAPD توانست دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی را از هم تفکیک کند. قنواتی (۱۳۸۹) با بکارگیری نشانگر RAPD به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت درختان حرا در سواحل استان هرمزگان پرداخت.

یعیش بچاری (۱۳۸۹) با بکارگیری نشانگر RAPD به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی گل خورک *Periophthalmus waltoni* در مناطق هندیجان و خور زنگی و دلوار پرداخت.

۲-۲-۲-۵- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

Shedlock et al., 1997 با استفاده از روش PCR-sequencing ارتباط تکاملی ماهی آزاد اقیانوس آرام *Pacific Salmon* را بر اساس تعیین توالی مستقیم از روی محصولات PCR ناحیه D-loop در mtDNA مورد بررسی قرار دادند و تجزیه و تحلیل های قبلی را در مورد روابط فیلوژنی خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) مورد تایید قرار دادند.

Alvarado Bremer et al., 1998 برای مطالعه ساختار ژنتیکی *Thunnus obesus* در اقیانوس اطلس، هند و آرام از روش Sequencing و PCR-RFLP استفاده نمود که با استفاده از ۳ آنزیمی که در ناحیه D-loop به کار بردند، ۱۳ هاپلوتیپ را شناسایی کردند و در آنالیز فراوانی پراکنش، نمونه های اقیانوس اطلس از نظر ژنتیکی با نمونه اقیانوس آرام و هند مجزا بود و اختلاف کم بین ماهیان اقیانوس اطلس و آرام را ناشی از جریان ژنی بین دو منطقه دانست. نتایج آنها نشان داد که تئوری جمعیت جهانی از ماهی تن چشم درشت بی اساس است.

Douglas et al., 2003 با استفاده از Sequencing ژنهای میتوکندریایی ALP_{ase6} و ATP_{ase8} و ND_2 نسبت به شناسایی جمعیت های *Castostomus latipinnis* در آمریکا اقدام نمودند و ۲۴ جمعیت تشخیص دادند و ۴۹ هاپلوتیپ مختلف در این جمعیتها مشخص نمودند.

Martins cesar et al., 2003 با بکارگیری Sequencing مستقیم ژن D-loop میتوکندریایی ماهی *Leporinus elongates* در برزیل جمعیتهای وحشی رودخانه پارنا را مشخص نمودند.

Wirgin, 2002 ساختار جمعیتی تاس ماهی اطلس را براساس Sequencing ناحیه کنترتی mt DNA بررسی کرد و وجود حداقل ۷ ذخیره ژنتیکی را در میان زیر گونه مشخص دارد.

Ludwing et el., (2000) در بررسی هتروپلاسمی ناحیه کنترلی mtDNA تاس ماهیان سه جنس (*Acipenser*, *Scaphirhynchu*, *Huso*) از تعیین توالی mtDNA D-loop استفاده کردند و عنوان کردند که واحدهای تکراری ماهیان خاویاری بین 38-74bp طول دارند و در *Polydon spathula* واحدهای تکراری وجود ندارند. عموماً

واحدهای تکراری در قسمت TA (Termination Associated Sequence) وجود دارند و حدود ۵۰ درصد از موتاسیون گونه ای که در D-loop وجود دارد در 10pb بالادست و پایین دست TSA اتفاق می افتد.

(2007) Shen *et al.*, با بررسی Sequencing ژنوم میتوکندریایی از دو میگو *Vannamei leptopenaeus* و *Fenneropenaeus chinensis* روابط خانواده Penacidae را ارائه دادند.

(2004) Larvery *et al.*, با بررسی ۱۹ گونه از جنس *Penaeus* بوسیله Sequencing ژن Col و 16s rRNA نتیجه مطالعات قبلی که زیر جنس های *Farfantepenaeu* و *Litopenaeus* پارافیلتینگ فرض می شد را رد کردند و نشان دادند که آنالیزهای فیلوژنی صحت ۶ زیر جنس (یا جنس) را تأیید نمی کند.

۳-۵- مواد و روشها

۱-۳-۵- نمونه برداری

پس از مطالعات اولیه کتابخانه‌ای و میدانی، راشگو ماهیان صید شده از عملیات صیادی شناورهای تحقیقاتی مرکز تحقیقات شیلات ایران و صیدگاه استانهای خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان از تابستان ۸۶ تا بهار ۸۹ انجام شده بود، جدا شدند. قطعات ۳-۵gr از بافت نرم و تازه باله‌های سینه‌ای و پشتی آنها در اتانول خالص تثبیت شدند. (Barber and Erdman, 2000) سپس نمونه‌های مذکور به آزمایشگاه انتقال یافتند.

جدول ۱-۵- تعداد نمونه‌های جمع آوری شده و موقعیت جغرافیایی ایستگاههای نمونه برداری

موقعیت جغرافیایی	تعداد نمونه	صیدگاه (ایستگاه)	استان (ناحیه)
48/26E و 29/49N	۸۳	۱- چوئیده ۲- بوسیف ۳- خور موسی	خوزستان
۲۸/۹۲ N و ۵۰/۷۹E	۹۲	۱- دیلم ۲- دیر	بوشهر
۲۷/۱۲ N و ۵۶/۲۱ E	۴۴	۱- جاسک ۲- بندر عباس ۳- میدانی	هرمزگان
۲۵/۳۲ N و ۶۰/۲۹ E	۱۶	۱- چابهار ۲- تنگ ۳- پزم ۴- بریس	سیستان و بلوچستان

توضیح: نمونه‌های *Polynemus plebeius* (۴۶ عدد) و *Polynemus sextarius* (۳۰ عدد) و *Polynemus* *heptadactylus* (۲۶ عدد) هم از صیدگاههای سیستان و بلوچستان بدست آمد.

۲-۳-۵- استخراج DNA و PCR و الکتروفورز

استخراج DNA و الکتروفورز مشابه بخش ۱، انجام گردید و PCR با استفاده از پرایمرهای آمده در جدول زیر با ترکیب محلول واکنش و برنامه حرارتی و زمانی دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر به اجرا در آمده است.

۵-۳-۳- طراحی و آماده سازی آغازگرها

۵-۳-۱-۱- پرایمرهای Sequencing (تعیین توالی)

طراحی دو آغازگر پیشرو (Forward) و معکوس (Reverse) از روی توالی ژن rRNA میتوکندری گونه *Eleutheronema tetradactylum* که حاصل جستجوی اینترنتی از بانک ژنی NCBI (WWW.Ncbi.nlm.nih.gov) بود انجام شد.

BASE COUNT 152 a 161 c 201 g 144 t
ORIGIN

```
1 cgcatgaatg gatgaacgag attcccactg tcctaccta ctatctagcg aaaccacagc
61 caaggaacg ggcttgccg aatcagcggg gaaagaagac cctgtgagc ttgactctag
121 tctggcactg tgaagagaca tgagaggtgt agaataagtg ggaggctctg gccagcggtg
181 aaataccact actctatcg tttttcact taccgggtga ggccgggagg cgagccccga
241 gcgggctctc gtttctggcg tcaagegcc ggccccgcgc cgggcgcgac ccgctccggg
301 gacagtggca ggtggggagt ttgactgggg cggtagacct gtcaaacggt aacgcaggtg
361 tcctaaggcg agctcaggga ggacagaaac ctcccgtgga gcagaaggcg aaaagctcgc
421 ttgatctga ttttcagat gaatacagac cgtgaaagcg gggcctcacg atccttctga
481 cttttgggt ttaagcagg aggtgtcaga aaagttacca cagggataac tggctgtgg
541 cggccaagcg tcatagcga cgtcgcttt tgatcctcg atgctggctc ttctatcat
601 tgtgaagcag aattaccaa gcgttgatt gtcacccac taataggga cgtgagct
```

شکل ۵-۸۴- توالی ژن rRNA (WWW.Ncbi.nlm.nih.gov) NCBI

توالی آغازگرهای مذکور که بمنظور شناسایی و تکثیر قطعه ۶۵۸bp از ژنوم rRNA میتوکندری گونه *E.tetradactylum* طراحی شده بودند، بدین ترتیب است.

F: CAG GAT TCC CAC TGT CCC TAC
R: GAT AGG AAG AGC CGA CAT CG

این آغازگرها با نرم افزار Generuller آنالیز شده و از شرکت خریداری شدند و پس از رقیق سازی به نسبت $\frac{1}{10}$ توسط آب مقطر استریل (D.W) جهت واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR بکار گرفته شدند.

محصول PCR این بخش از تحقیق به تعداد ۲۰-۱۵ نمونه از گونه *E.tetradactylum* (چهار رشته ای) و ۴-۳ عدد از

گونه های *Polynemus sextarius* (۶ رشته ای)، *Polynemus plebeius* (۵ رشته ای) و *Polynemus heptadactylum* (۷

رشته ای) جهت تعیین توالی (Sequencing) به کشور کره جنوبی ارسال گردید.

۲-۱-۳-۵- پرایمرهای نشانگر RAPD

آغازگرهای نشانگر RAPD با مشخصات زیر به شرکت TAG دانمارک سفارش و خریداری شد. (جدول ۲-۵)

جدول ۲-۵ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش RAPD

نام	توالی آغازگر	دمای اتصال °C	درصد GC%
ACS 32	5'-CCC AGC GAT - 3'	۴۴	۷۰
AUBC 516	5' - AGC GCC GAC G - 3'	۴۴	۸۰
AOPG ₁₀	5'- GGC TGC ACA A- 3'	۴۳	۶۰
AOPA ₁₀	5'- GTG ATC GCA G- 3'	۴۵	۶۰
AOPA ₂	5'- TGC CGA GCT - 3'	۴۳	۷۰
AOPG ₉	5'- CGA AGC AGC - 3'	۴۵	۶۰
AOPG ₁₅	5' - AAC TGG ACT G - 3'	۳۶	۵۰
AOPA ₃	5' AGT CAG CCA C - 3'	۴۵	۶۰
AOPA ₅	5' AGG GGT CTT G- 3'	۴۵	۶۰

۵-۳-۳-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و بهینه سازی آن

جهت تکثیر قطعه ژن هدف از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. نوع و حجم مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در نشانگر RAPD و Sequencing در ذیل آمده است. برنامه دمایی که به دستگاه Thermocycler داده شد برای نشانگر RAPD و Sequencing به ترتیب در جدول (۴-۵) آمده است.

جدول ۳-۵- نوع و حجم مواد مورد استفاده واکنش زنجیره ای پلیمرز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA استخراجی	متغیر $100 \leq \text{ngr}$	۰/۷ میکرولیتر برای RAPD ۱ میکرولیتر برای تعیین توالی
Taq DNA Polymerase	۵ u/μ	۰/۲ میکرولیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	۰/۸ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۲/۵ میکرولیتر
آغازگر در روش RAPD	۱-۱/۵ Pmol	۱ میکرولیتر
آغازگر در روش تعیین توالی	۱-۱/۵ Pmol	۱ میکرولیتر
آب مقطر	-	تا ۲۵ میکرولیتر
dNTP _s	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر

جدول ۴-۵ برنامه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز RAPD و تعیین توالی (Sequencing)

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۵ :R	۳'	۱
	۹۵ :S		
واسرشته سازی ^۱	۹۵ :R	۴۵"	۳۰
	۹۵ :S		
الحاق ^۲	R: متغیر برای هر آغازگر	۴۵"	۳۰
	۶۴ :S		
بسط ^۳	۷۲ :R	۴۵"	۱
	۷۲ :S		
بسط نهایی	۷۲ :R	۳'	۱
	۷۲ :S		

جهت بهینه سازی شرایط واکنش و انتخاب دمای مناسب واکنش هر آغازگزار گرادینت دمایی یا شیب حرارتی استفاده شد. محصولات واکنش PCR جهت سنجش کیفیت واکنش برای هر آغازگردردماهای مختلف، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. برای سنجش وزن محصولات از نشانگر (Marker) ۱۰۰ bp Plus استفاده گردید.

^۱ : Denaturation
^۲ : Annealing
^۳ : Extention

۴-۵- نتایج

۱-۴-۵- تنوع ژنتیکی

در بررسی و مطالعات تنوع ژنتیکی درون جمعیتی یک گونه از معیارهای همچون تعداد الل واقعی و موثر، شاخص شانون و هتروزیگوسیتی برای هر ژنوتیپ مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان متوسط الل واقعی، الل موثر، شاخص شانون و هتروزیگوسیتی و تعداد و درصد لوکوسهای پلی مورف برای هر کدام از جمعیتها ی مورد مطالعه در جدول زیر آمده است.

جدول ۵-۵ تنوع ژنتیکی، تعداد الل واقعی و موثر و شاخص شانون برای هر کدام از جمعیتها ی مورد مطالعه na: الل واقعی، ne: الل موثر، h: هتروزیگوسیتی و I شاخص شانون، تعداد و درصد لوکوسهای پلی مورف

درصد لوکوسهای پلی مورف	تعداد لوکوسهای پلی مورف	I	h	ne	na	
۹۳,۰۶	۱۶۱	۰,۳۶±۰,۱۸۳	۰,۲۲±۰,۱۳	۱,۳۲±۰,۲۴	۱,۹۳±۰,۲۵	بوشهر
۹۲,۴۹	۱۶۰	۰,۳۶±۰,۱۸۵	۰,۲۲±۰,۱۳	۱,۳۲±۰,۲۴	۱,۹۲±۰,۲۱۴۴	بندر عباس
۸۷,۸۶	۱۵۲	۰,۳۲±۰,۲	۰,۱۹۷±۰,۱۴۳	۱,۲۹±۰,۲	۱,۸۷±۰,۳۲	خوزستان
۶۳,۰۱	۱۰۹	۰,۲۶±۰,۲۵	۰,۱۷۱±۰,۱۷۵	۱,۲۷±۰,۳۱	۱,۶±۰,۴۸	چابهار
-	-	۰,۳۷±۰,۱۴	۰,۲۲±۰,۱	۱,۳۱±۰,۱۸	۲±۰,۰	کلیه مناطق

۲-۴-۵- تمایز ژنتیکی و جریان ژنی:

میزان تمایز و جریان ژنی برای همه ژنوتیپها در همه لوکوسها در جدول زیر آمده است. میزان متوسط تمایز در بین ژنوتیپها ۰,۰۸۴±۰,۰۱ و متوسط جریان ژنی ۰,۰۱±۰,۳۹ می‌باشد.

جدول ۶-۵- میزان تمایز Gst و جریان ژنی بین ژنوتیپها

*Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm
OPA01-1	158	0.0202	0.0196	0.0309	15.6597
OPA01-2	158	0.0305	0.0290	0.0472	10.1005
OPA01-3	158	0.0158	0.0157	0.0092	53.9494
OPA01-4	158	0.0744	0.0740	0.0055	90.2209
OPA01-5	158	0.3934	0.2889	0.2657	1.3816
OPA01-6	158	0.0790	0.0739	0.0648	7.2117
OPA01-7	158	0.1712	0.1590	0.0710	6.5376
OPA01-8	158	0.1601	0.1541	0.0376	12.7808
OPA01-9	158	0.2883	0.2784	0.0345	13.9835
OPA01-10	158	0.1457	0.1282	0.1201	3.6646
OPA01-11	158	0.1953	0.1756	0.1010	4.4515
OPA01-12	158	0.2057	0.1819	0.1159	3.8125
OPA01-13	158	0.2190	0.2057	0.0610	7.6906
OPA01-14	158	0.1583	0.1443	0.0886	5.1453
OPA01-15	158	0.3702	0.3305	0.1072	4.1655
OPA01-16	158	0.2561	0.2481	0.0314	15.4213
OPA01-17	158	0.2467	0.2310	0.0637	7.3487
OPA01-18	158	0.1152	0.1089	0.0549	8.6029
OPA01-19	158	0.0353	0.0340	0.0374	12.8855
OPA01-20	158	0.0409	0.0383	0.0639	7.3188
OPA03-1	158	0.0464	0.0439	0.0546	8.6547
OPA03-2	158	0.0561	0.0537	0.0430	11.1302
OPA03-3	158	0.3462	0.3168	0.0851	5.3775
OPA03-4	158	0.1661	0.1616	0.0272	17.8709
OPA03-5	158	0.2371	0.2278	0.0392	12.2668
OPA03-6	158	0.2216	0.2157	0.0266	18.3043
OPA03-7	158	0.1310	0.1219	0.0698	6.6587
OPA03-8	158	0.1511	0.1319	0.1269	3.4414
OPA03-9	158	0.3042	0.2884	0.0520	9.1134
OPA03-10	158	0.2194	0.2006	0.0856	5.3392
OPA03-11	158	0.1688	0.1618	0.0418	11.4526
OPA03-12	158	0.2104	0.1905	0.0946	4.7876
OPA03-13	158	0.2497	0.2187	0.1240	3.5316
OPA03-14	158	0.3215	0.3151	0.0198	24.7619
OPA03-15	158	0.2463	0.2217	0.1000	4.5006
OPA03-16	158	0.2904	0.2756	0.0510	9.3108
OPA03-17	158	0.2826	0.2757	0.0245	19.9193
OPA03-18	158	0.2738	0.2326	0.1507	2.8184
OPA03-19	158	0.3091	0.2362	0.2358	1.6202
OPA03-20	158	0.3211	0.1248	0.6113	0.3179
OPA04-1	158	0.1108	0.0923	0.1672	2.4906
OPA04-2	158	0.3600	0.3267	0.0924	4.9128
OPA04-3	158	0.0751	0.0732	0.0247	19.7206
OPA04-4	158	0.2745	0.2728	0.0064	78.2255
OPA04-5	158	0.2178	0.2142	0.0163	30.1100
OPA04-6	158	0.2529	0.2388	0.0557	8.4703
OPA04-7	158	0.2067	0.2004	0.0306	15.8612
OPA04-8	158	0.2548	0.2244	0.1193	3.6917
OPA04-9	158	0.1463	0.1407	0.0383	12.5576
OPA04-10	158	0.1309	0.1220	0.0674	6.9153
OPA04-11	158	0.1253	0.1220	0.0268	18.1628
OPA04-12	158	0.2477	0.2267	0.0848	5.3990
OPA04-13	158	0.1438	0.1352	0.0604	7.7794
OPA04-14	158	0.2970	0.2916	0.0183	26.8504
OPA04-15	158	0.2744	0.2648	0.0349	13.8153

OPA04-16	158	0.3235	0.3072	0.0503	9.4315
OPA04-17	158	0.3602	0.3582	0.0057	87.6090
OPA04-18	158	0.3410	0.3400	0.0030	168.5607
OPA04-19	158	0.1500	0.1465	0.0228	21.4201
OPA07-1	158	0.1443	0.1295	0.1030	4.3557
OPA07-2	158	0.0266	0.0263	0.0141	34.8735
OPA07-3	158	0.1705	0.1612	0.0541	8.7400
OPA07-4	158	0.3289	0.3065	0.0682	6.8273
OPA07-5	158	0.3351	0.2992	0.1071	4.1670
OPA07-6	158	0.2755	0.2431	0.1177	3.7477
OPA07-7	158	0.2824	0.2692	0.0465	10.2425
OPA07-8	158	0.2470	0.2443	0.0109	45.2369
OPA07-9	158	0.2704	0.2620	0.0310	15.6277
OPA07-10	158	0.2577	0.2460	0.0455	10.4995
OPA07-11	158	0.3451	0.3179	0.0787	5.8536
OPA07-12	158	0.2401	0.2269	0.0552	8.5607
OPA07-13	158	0.3288	0.2846	0.1344	3.2194
OPA07-14	158	0.1836	0.1771	0.0355	13.5654
OPA07-15	158	0.4574	0.3863	0.1554	2.7166
OPA07-16	158	0.2593	0.2465	0.0492	9.6710
OPA07-17	158	0.2827	0.2391	0.1545	2.7372
OPA07-18	158	0.2736	0.2542	0.0708	6.5665
OPA07-19	158	0.1111	0.1030	0.0730	6.3508
OPA07-20	158	0.2417	0.1999	0.1730	2.3904
OPA07-21	158	0.0741	0.0692	0.0670	6.9657
OPA08-1	158	0.2486	0.2335	0.0606	7.7493
OPA08-2	158	0.3559	0.3145	0.1162	3.8044
OPA08-3	158	0.2748	0.1990	0.2761	1.3108
OPA08-4	158	0.4772	0.3559	0.2541	1.4676
OPA08-5	158	0.4743	0.4026	0.1513	2.8046
OPA08-6	158	0.3389	0.3237	0.0448	10.6521
OPA08-7	158	0.3515	0.3442	0.0207	23.6062
OPA08-8	158	0.1800	0.1765	0.0196	25.0105
OPA08-9	158	0.2853	0.2813	0.0138	35.6597
OPA08-10	158	0.1514	0.1399	0.0758	6.0922
OPA08-11	158	0.3312	0.3237	0.0228	21.4601
OPA08-12	158	0.3290	0.2863	0.1297	3.3564
OPA08-13	158	0.3309	0.2972	0.1019	4.4044
OPA08-14	158	0.1630	0.1492	0.0848	5.3965
OPA08-15	158	0.4672	0.3491	0.2527	1.4783
OPA08-16	158	0.2281	0.2133	0.0651	7.1774
OPA08-17	158	0.1009	0.0878	0.1303	3.3370
OPA08-18	158	0.0984	0.0822	0.1642	2.5447
OPA08-19	158	0.0117	0.0115	0.0178	27.6627
OPA09-1	158	0.1829	0.1759	0.0384	12.5192
OPA09-2	158	0.2978	0.2756	0.0748	6.1851
OPA09-3	158	0.2020	0.1863	0.0774	5.9592
OPA09-4	158	0.1519	0.1472	0.0306	15.8144
OPA09-5	158	0.4515	0.4388	0.0281	17.2968
OPA09-6	158	0.2466	0.2249	0.0880	5.1837
OPA09-7	158	0.2355	0.2201	0.0655	7.1281
OPA09-8	158	0.2505	0.2360	0.0578	8.1439
OPA09-9	158	0.1837	0.1783	0.0291	16.6769
OPA09-10	158	0.1357	0.1247	0.0815	5.6364
OPA09-11	158	0.3407	0.2877	0.1556	2.7136
OPA09-12	158	0.3481	0.3290	0.0549	8.6062
OPA09-13	158	0.1252	0.1204	0.0382	12.5794
OPA09-14	158	0.1552	0.1381	0.1106	4.0200
OPA09-15	158	0.1653	0.1198	0.2751	1.3176
OPA09-16	158	0.0837	0.0758	0.0947	4.7822
OPA09-17	158	0.0117	0.0115	0.0178	27.6627

OPA09-18	158	0.0469	0.0452	0.0375	12.8402
OPA10-1	158	0.0305	0.0290	0.0472	10.1005
OPA10-2	158	0.1221	0.1176	0.0371	12.9613
OPA10-3	158	0.0365	0.0361	0.0109	45.4850
OPA10-4	158	0.2634	0.2494	0.0529	8.9464
OPA10-5	158	0.0609	0.0585	0.0405	11.8494
OPA10-6	158	0.2120	0.2102	0.0085	58.2331
OPA10-7	158	0.2804	0.2517	0.1022	4.3935
OPA10-8	158	0.2483	0.2375	0.0436	10.9613
OPA10-9	158	0.2889	0.2760	0.0448	10.6707
OPA10-10	158	0.3838	0.3762	0.0198	24.7837
OPA10-11	158	0.4003	0.3603	0.1001	4.4950
OPA10-12	158	0.2770	0.2676	0.0342	14.1081
OPA10-13	158	0.3746	0.3439	0.0819	5.6049
OPA10-14	158	0.3379	0.3306	0.0217	22.5269
OPA10-15	158	0.3130	0.2876	0.0810	5.6745
OPA10-16	158	0.2039	0.1993	0.0226	21.6159
OPA10-17	158	0.1029	0.1010	0.0178	27.6309
OPA10-18	158	0.1165	0.0958	0.1781	2.3069
OPA10-19	158	0.1269	0.1072	0.1555	2.7163
OPA10-20	158	0.0567	0.0516	0.0903	5.0399
OPA11-1	158	0.1933	0.1896	0.0191	25.6151
OPA11-2	158	0.2927	0.2834	0.0316	15.3240
OPA11-3	158	0.2537	0.2514	0.0090	54.9413
OPA11-4	158	0.1819	0.1806	0.0071	69.5735
OPA11-5	158	0.3263	0.3006	0.0787	5.8492
OPA11-6	158	0.2787	0.2684	0.0371	12.9870
OPA11-7	158	0.3384	0.3314	0.0205	23.9362
OPA11-8	158	0.4681	0.4448	0.0497	9.5554
OPA11-9	158	0.2577	0.2422	0.0604	7.7777
OPA11-10	158	0.2842	0.2744	0.0345	14.0050
OPA11-11	158	0.3127	0.2818	0.0987	4.5668
OPA11-12	158	0.3310	0.2791	0.1568	2.6887
OPA11-13	158	0.2430	0.2334	0.0396	12.1161
OPA11-14	158	0.1454	0.1401	0.0368	13.0787
OPA11-15	158	0.1407	0.1310	0.0685	6.7955
OPA11-16	158	0.0783	0.0716	0.0857	5.3350
OPA11-17	158	0.0479	0.0474	0.0124	39.7927
OPA11-18	158	0.1313	0.1234	0.0597	7.8714
OPA11-19	158	0.0416	0.0389	0.0651	7.1757
OPA12-1	158	0.1397	0.1352	0.0321	15.0861
OPA12-2	158	0.1850	0.1765	0.0459	10.3874
OPA12-3	158	0.1873	0.1633	0.1282	3.4007
OPA12-4	158	0.1407	0.1340	0.0475	10.0153
OPA12-5	158	0.4726	0.4118	0.1286	3.3879
OPA12-6	158	0.2371	0.2109	0.1106	4.0220
OPA12-7	158	0.2848	0.2706	0.0500	9.5096
OPA12-8	158	0.2972	0.2930	0.0142	34.8330
OPA12-9	158	0.2149	0.2096	0.0248	19.6949
OPA12-10	158	0.1028	0.0975	0.0516	9.1913
OPA12-11	158	0.2692	0.2554	0.0515	9.2181
OPA12-12	158	0.2218	0.1956	0.1183	3.7273
OPA12-13	158	0.1826	0.1766	0.0327	14.7672
OPA12-14	158	0.1775	0.1694	0.0458	10.4058
OPA12-15	158	0.3863	0.2236	0.4213	0.6869
OPA12-16	158	0.1615	0.1559	0.0342	14.1262
OPA12-17	158	0.1360	0.1313	0.0343	14.0628
Mean	158	0.2219	0.2031	0.0848	5.3959
St. Dev			0.0119	0.0095	

=====

۳-۴-۵- محاسبه میزان شباهت و فاصله بین مناطق نمونه برداری

براساس فاصله Nei(1972) بیشترین فاصله بین نمونه های مناطق خوزستان و بوشهر (۰,۹۸۱۶) و کمترین فاصله بین نمونه های مناطق بوشهر و چابهار (۰,۹۵۲۳) به دست آمد.

جدول ۷-۵- شباهت ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (زیر قطر) براساس فاصله Nei(1972)

چابهار	خوزستان	بندر عباس	بوشهر	
۰,۹۵۲۳	۰,۹۸۱۶	۰,۹۷۸۱	۱	بوشهر
۰,۹۵۵۲	۰,۹۷۸۴	۱	۰,۰۲۲۱	بندر عباس
۰,۹۶۷۲	۱	۰,۰۲۱۸	۰,۰۱۸۶	خوزستان
۱	۰,۰۳۳۲	۰,۰۴۵۸	۰,۰۴۸۸	چابهار

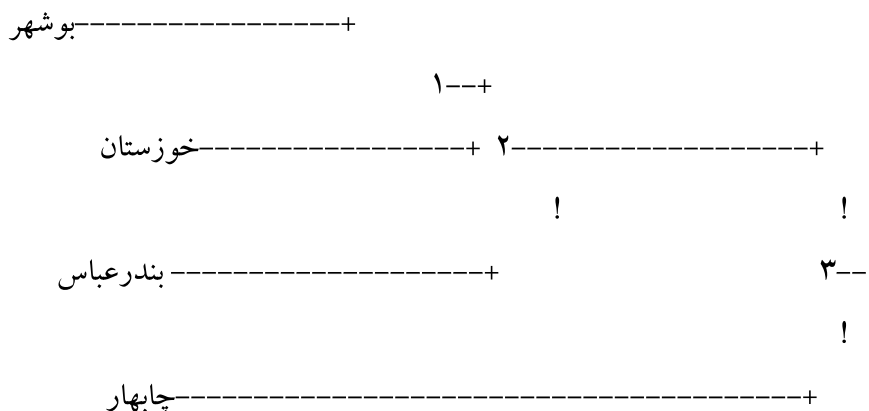
براساس فاصله Nei(1978) بیشترین فاصله بین نمونه های مناطق خوزستان و بوشهر (۰,۹۸۴۷) و کمترین فاصله بین نمونه های مناطق بوشهر و چابهار (۰,۹۵۷۱) به دست آمد.

جدول ۸-۵- شباهت ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (زیر قطر) براساس فاصله Nei(1978)

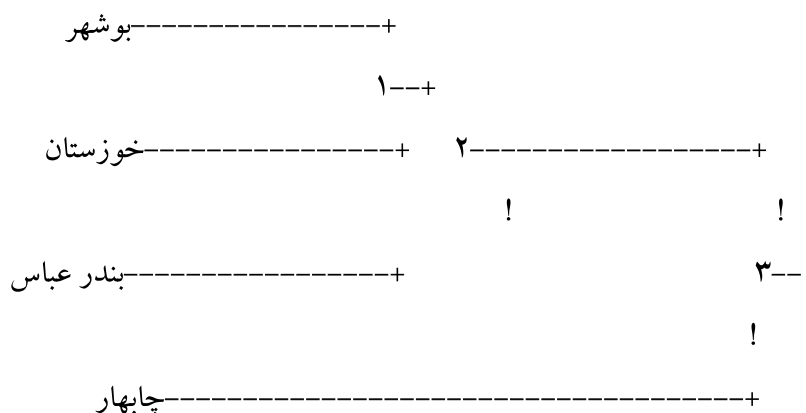
چابهار	خوزستان	بندر عباس	بوشهر	
۰,۹۵۷۱	۰,۹۸۴۷	۰,۹۸۱۷	۱	بوشهر
۰,۹۶۰۳	۰,۹۸۱۳	۱	۰,۰۱۹۰	بندر عباس
۰,۹۷۷۰	۱	۰,۰۱۸۹	۰,۰۱۵۹	خوزستان
۱	۰,۰۷۸۴	۰,۰۴۰۵	۰,۰۴۳۸	چابهار

۴-۴-۵- دندروگرام گروههای مختلف سائزی

دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) و Nei(1978) نمونه های مناطق بوشهر و خوزستان را در یک گروه قرار داد و نمونه های چابهار را در یک گروه جداگانه قرار داد.



شکل ۸۵-۵ - دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) با استفاده از متد UPGMA



شکل ۸۶-۵ - دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1978) با استفاده از متد UPGMA

۵-۵-۵ بحث

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد (Beardmore *et al.*, 1997). پورکاظمی و همکاران (۱۳۸۶) در مطالعه لرنه آ اسپریناسه و لرنه آ فارینگودنی با استفاده از روش RAPD میزان تنوع ژنتیکی لرنه آ فارینگودنی در استان گیلان را (۱,۱۵٪) بیشتر از استان خوزستان (۰٪) اعلام کردند ولی در لرنه آ اسپریناسه در خوزستان (۲۷,۴۶٪) ۷,۲۴ برابر بیشتر از استان گیلان (۳,۷۸٪) اعلام کردند و آن را به تامین بچه ماهی از سایر استانها نسبت دادند. از طرف دیگر ۷۸ درصد تفاوت بین دو گونه مشاهده شد که نشان می دهد دو گونه مستقل از هم می باشند. در این مطالعه بیشترین میزان تنوع در نمونه های بوشهر و بندر عباس به دست آمد که می توان علت آنرا با فرصت بیشتر برای تکثیر طبیعی، بهره برداری بهینه از منابع شیلاتی، عدم تخریب زیستگاه های طبیعی، بالا بودن میزان جریان ژنی (N_m)، برون زادآوری و... تفسیر نمود

تنوع آلی با حساسیت بیشتری نسبت به هتروزیگوسیتی می تواند اختلاف ژنتیکی را اندازه گیری کند زیرا تنگناهای ژنتیکی همانند وقایعی که موجب کاهش تعداد آلی می شود (بویژه نمونه های کمیاب) بدون داشتن اثر قابل مشاهده روی هتروزیگوسیتی هنگامی که اندازه نمونه ها مشابه هستند، دیده می شود. ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف آبزیان ممکن است به طور قابل ملاحظه ای بین گونه ها بسته به اهمیت نسبی رانش، جریان ژنی، انتخاب، مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلند مدت همچون تجمع افراد و جمعیت ها بعد از عصر یخبندان تغییر کند. در میان ماهیان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین تری را نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می دهند در حالی که ماهیان آب شیرین تنوع ژنتیکی پایین و تمایز ژنتیکی بالاتری را نسبت به ماهیان دریایی نشان می دهند و این تمایز به اندازه بزرگ جمعیت موثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیط های دریایی و اندازه کوچک جمعیت موثر و جریان ژنی محدود در جمعیت های آب شیرین نسبت داده می شود (Norris *et al.*, 1999).

بر اساس تعاریف، یک جمعیت گروهی از افراد هستند که در درون خود آمیزش دارند و از نظر تولید مثلی از

گروه‌های دیگر همان گونه جدا هستند اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیت‌ها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیت‌ها) به عنوان گونه مطرح نمی‌گردند. در حقیقت رفتارهای تولید مثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولیدمثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت می‌باشد (صفری، ۱۳۸۵). در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه برداری کرد، معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم پوشانی نسلی هستند بنابراین، اطلاعات ژنتیک جمعیت اغلب افراد را از نسل‌های مختلف بررسی می‌کند. وقتی نمونه‌برداری در جایی در بیش از یک زمان صورت می‌گیرد راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی آزمون تمایز بین نمونه‌ها است (Viard *et al.*, 1997). در این بررسی میزان متوسط تمایز در بین زوتیپها 0.084 ± 0.01 و متوسط جریان ژنی 0.39 ± 0.01 به دست آمد.

درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس روش Neighbor-Joining توده‌های بز بومی ایران با استفاده از روش RAPD (جوانروح علی‌آباد و همکاران ۱۳۸۳) نمونه‌های مورد مطالعه را در دو گروه قرار داد: گروه اول شامل توده‌های کرکی راینی، تالی، کرکی جنوب خراسان و نجدی بوده و گروه دوم شامل توده‌های مرخز و سیاه لری بود. یوسفی و همکاران (۱۳۸۴) در بررسی تنوع ژنتیکی صدف خوراکی *Sacostra caculata* در سواحل خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش RAPD نمونه‌های استانهای بوشهر و هرمزگان را جدا از نمونه‌های سیستان و بلوچستان قرارداد و علت را به خصوصیت تفاوت منطقه و اقلیم نسبت دادند.

در مطالعه دهقان زاده و همکاران (۱۳۸۵) تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت از مرغهای بومی استانهای مازندران، فارس، یزد، آذربایجان غربی و اصفهان با استفاده از روش RAPD درخت فیلوژنی هم نمونه‌های مرغهای بومی استانهای فارس، یزد، آذربایجان غربی و اصفهان را در یک خوشه و نمونه‌های مازندران را در یک خوشه مجزا قرار داد.

جرفی و همکاران (۱۳۸۷) در مطالعه ساختار ژنتیکی ماهی صبور در استان خوزستان با استفاده از روش RAPD وجود دو جمعیت متفاوت ماهی صبور ایرانی و عراقی را به جهت قرار گرفتن نمونه‌های ماهی کارون و سواحل خلیج فارس در یک سو و اروندرود و بهمنشیر در سوی دیگر را با توجه به درخت UPGMA نشان دادند.

در این بررسی دندروگرام فاصله ژنتیکی براساس فاصله Nei(1972) و Nei(1978) نمونه های مناطق بوشهرو خوزستان را در یک زیرگروه و هر دو با نمونه های بندر عباس در یک گروه قرار داد و نمونه های چابهار را در یک گروه جداگانه قرار داد که نشان دهنده تمایز این جمعیتها از هم می باشد.

جرفی و همکاران (۱۳۸۷) در مطالعه ساختار ژنتیکی ماهی صبور در استان خوزستان با استفاده از روش RAPD بیشترین فاصله ژنتیکی را بین نمونه های صید شده از اروندرود و خلیج فارس (۰,۱۹۸۷) و کمترین فاصله را بین نمونه های صید شده از اروندرود و بهمنشیر (۰,۰۸۲۴) مشاهده کردند.

در مطالعه دهقان زاده و همکاران (۱۳۸۵) تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت از مرغهای بومی استانهای مازندران ، فارس ، یزد ، اذربایجان غربی و اصفهان با استفاده از روش RAPD بیشترین فاصله ژنتیکی را بین مرغهای استان فارس و مازندران و کمترین فاصله ژنتیکی را بین استانهای فارس و اصفهان مشاهده کردند.

جوانروح علی اباد و همکاران (۱۳۸۳) در بررسی تنوع ژنتیکی شش توده بز بومی ایران با استفاده از روش RAPD بیشترین فاصله ژنتیکی را بین بزهای سیاه لری و کرکی جنوب خراسان (۰,۲۲۷) و کمترین فاصله ژنتیکی را بین بزهای تالی و کرکی رائینی (۰,۰۸۱) مشاهده کردند.

در بررسی صفری در سال ۱۳۸۵ بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های نواحی گرگان و سفیدرود (۰/۸۵۳) و کمترین شباهت میان نمونه های نواحی سفیدرود و کیاشهر (۰/۳۲۷) مشاهده شد.

در بررسی ریحانی در سال ۱۳۸۷ بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های انزلی و خلیج گرگان (۰/۹۸۵) و کمترین میان نمونه های انزلی و روسیه (۰/۷۶۵) مشاهده شد.

در بررسی سالاری در سال ۱۳۸۷ بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های مناطق دیر و بریس وجود داشت. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های مناطق بندر عباس و بندر لنگه وجود داشت. در این بررسی براساس فاصله Nei(1972) بیشترین فاصله بین نمونه های مناطق خوزستان و بوشهر (۰,۹۸۱۶) و کمترین فاصله بین نمونه های مناطق بوشهر و چابهار (۰,۹۵۲۳) به دست آمد. Shaklee و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Thorpe و Sol-Cave در سال ۱۹۹۴ فاصله ژنتیکی برای جمعیتهای هم گونه به طور میانگین (۰/۰۷-۰/۰۰۲) ، برای گونه های هم جنس به طور میانگین (۰/۰۳-۰/۶۱) و برای جنس های با خانواده مشترک بین ۰/۵۸ تا ۱/۲۱ می باشد. فاصله ژنتیکی به دست آمده در رنج جنس های با خانواده مشترک نشان دهنده انشقاق ژنتیکی آنها می باشد.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به ارزیابی مقادیر به دست آمده از فراوانی آلی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی-واینبرگ، ماهی سفید دریای خزر در مناطق مختلف نمونه برداری به نظر می رسد که علی رغم تخریب زیستگاه، فشار صیادی، آلودگی های شدید زیست محیطی و کاهش شدید ذخایر ماهی سفید در خزر هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی نسبتاً بالا بوده و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد. همچنین در سواحل جنوبی دریای خزر بیش از یک جمعیت ماهی سفید وجود دارد. نتایج آنالیز آماری، جدایی جمعیت کورا را از جمعیت ماهی سفید نواحی جنوبی خزر نشان داد ولی به جهت اینکه حداکثر و حداقل تمایز بین نمونه های سواحل ایران به دست آمد و تمایز نمونه های کورا در رنج این حداکثر و حداقل بود همچنین با توجه به اینکه آذربایجان نقشی در تکثیر این ماهی ندارد صحبت در مورد وجود جمعیت ماهی سفید کورا احتیاج به مطالعات بیشتری دارد. جمعیت ماهی سفید تالاب انزلی دارای وضعیت بهتری نسبت به سایر جمعیت ها می باشد زیرا دارای تنوع ژنتیکی بالاتری بوده و این امر سبب افزایش سازگاری با تغییرات ناگوار زیست محیطی می گردد. کاهش اختلاف ژنتیکی منجر به کاهش پتانسیل ژنتیکی و کاهش سازگاری با تغییرات محیطی می شود، بنابراین نظارت بر هر تغییر در ساختار ژنتیک جمعیت های این گونه ضروری است. کمترین مقدار تنوع ژنتیکی در نمونه های جمعیت کورا دیده شد که علت آن تخریب زیستگاه های طبیعی ناشی از توسعه تاسیسات و صنایع حاشیه این رودخانه می باشد. وجود دخالت های انسانی و فعالیت های مدیریتی در دهه های اخیر در این گونه غالب بر فعالیت های طبیعت شده است، در حقیقت گسترش حمل و نقل زیاد نمونه ها بین مکان های مختلف می تواند ساختار طبیعی جمعیت را تحت تاثیر قرار دهد. بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می رسد نمونه های ماهی کلمه نواحی منطقه جنوب دریای خزر مربوط به یک جمعیت بوده و از نمونه های شمال آن مجزا می باشد در نتیجه ماهی کلمه دریای خزر علی رغم تخریب زیستگاه، فشار صیادی، آلودگی های زیست محیطی دارای تنوع کافی برای موضوع اصلاح نژاد و آبری پروری می باشد.

با توجه به ارزیابی مقادیر بدست آمده از فراوانی آلی، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی-واینبرگ، R_{st} ، F_{st} و ترسیم درخت فیلوژنی ماهی سوکلا در مناطق مختلف نمونه برداری می توان جمع بندی نمود که ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان احتمالاً دارای ۳ جمعیت مجزاست که عبارتند از: ۱- جمعیت بوشهر ۲- جمعیت هرمزگان

۳- جمعیت چابهار که بهتر است برای مدیریت این ذخایر، ساختار جمعیت آن به هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود. به نظر می‌رسد جمعیت ماهی سوکلا بندرعباس وضعیت بهتری نسبت به سایر جمعیت‌ها داشته باشند زیرا دارای تنوع ژنتیکی بالاتری بوده و این امر سبب افزایش سازگاری با تغییرات ناگوار زیست محیطی می‌گردد.

با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش فرض‌های معلوم می‌توان جمع بندی کرد که نشانگرهای ریزماهواره‌ای ابزار بسیار توانمندی برای بررسی تنوع درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت‌ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی می‌باشند و برتری‌های انکار ناپذیری را در این رابطه دارا می‌باشند.

Abstract

Sampling was done using 235 *Polynemus Plebeius* from Persian Gulf and Oman Sea. Between June and April of 2007. Genomic DNA was extracted from fin tissue using phenol-chloroform method. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out using 9 RAPD loci and PCR products were separated on 3% Agarose gel. The observed heterozygosity in the Bushehr and Bandar abbas (0.22 ± 0.13) was the highest and in Chabahar the lowest (0.171 ± 0.175). The highest genetic distance (0.9816) was between Khozestan and Bushehr and the lowest (0.9523) between Bushehr and chabahar. Neighbour-joining resulted in two groups, the first including Khozestan and Bushehr and the second chabahar

Key word: *Polinomidae* populations genetic; Persian Gulf; Oman Sea; RAPD.

پیوست

ساخت بافرها (منبع LAB FUQS)

SDS ۲۰ درصد (سدیم دودسیل سولفات)

مواد مورد استفاده: SDS ، HCL و آب مقطر

طرز تهیه: مقدار ۱۰۰ گرم کریستال SDS در ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۶۸°C حل گردید. با اضافه کردن HCl ، pH را به ۷/۲ رسانده و سپس حجم این محلول را به ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محصول در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید.

بافر TAE

مواد مورد استفاده: Tris ، NaEDAT و اسید استیک گلاسیال

طرز تهیه: مقدار ۴۸/۴ گرم تریس در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید ، سپس ۲۰ میلی لیتر Na₂ EDTA نیم مولار و ۱۱/۴۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به بافر اضافه شد. حجم محلول با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده و در دمای اتاق نگهداری گردید .

بافر سنگین کننده (Loading buffer)

مواد مورد استفاده: برموفنل بلو ۱٪، زایلین سیالین ۱٪، گلیسرول ۵۰٪، تریس.

طرز تهیه: مقدار ۲۵۰ گرم برموفنل بلو با ۲۵۰ گرم زایلین سیالین را در ۳۳ میلی لیتر تریس ۱۵۰ میلی مولار با pH=۷,۶ حل نموده و پس از آن مقدار ۶۰ میلی لیتر از ماده گلیسرول و مقدار ۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و محلول فوق در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید.

آمونیم پر سولفات (A.P.S)

مواد مورد استفاده: پودر آمونیم پر سولفات، آب مقطر

طرز تهیه: ۱۰ گرم پودر آمونیم پر سولفات را در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در نهایت حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و در دمای ۴°C نگهداری می شود.

TEMED

این ماده به صورت محلول بوده و فوق العاده سمی است و این ماده دارای خاصیت کاتالیزوری جهت تسریع پلیمریزه شدن ژل اکریل آمید است.

اکریل آمید ۳۰ درصد :

مواد مورد استفاده: اکریل آمید، متیلن بیس اکریل آمید، آب مقطر

طرز تهیه: ۲۴ گرم اکریل آمید به همراه یک گرم متیلن بیس اکریل آمید (N,N methylen bis acrylomid) در ۷۰ لیتر آب مقطر به ۱۰۰ سی سی رسانده می شود و در دمای ۴ درجه نگهداری می شود.

۱۰(x)TBE

مواد مورد استفاده: تریس، اسید بوریک، EDTA نیم مولار و آب مقطر

طرز تهیه: برای تهیه یک لیتر ۱۰(x)TBE، ۱۰۸ گرم تریس باز به همراه ۵۵ گرم اسید بوریک (۴۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار (pH = ۸) مخلوط نموده و حجم نهایی به وسیله آب مقطر دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده می شود.

: STE

مواد مورد استفاده: تریس ۰/۰۵ مولار، EDTA ۰/۰۱ مولار، NaCl ۰,۱ مولار

طرز تهیه: برای تهیه یک لیتر STE ۰/۰۵ مولار تریس ۰/۰۵ مولار و EDTA ۰/۰۱ مولار و NaCl ۰/۱ مولار را در ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل نموده و pH را به ۸ رسانده و حجم نهایی به یک لیتر افزایش داده میشود.

فنل کالیبره :

مواد مورد استفاده: فنل کریستالی، ۸-هیدروکسی کوئینولین، تریس، آب مقطر

روش آماده سازی :

۱- مقدار ۵۰۰ گرم فنل کریستالی را در حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده تا ذوب شود.

- ۲- میزان ۰/۱ درصد حجم فنل آنتی اکسیدان ۸- هیدروکسی کونئولین به آن اضافه می شود (۱, ۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر) این ماده رنگ زرد به فنل می دهد .
- ۳- ۵۰۰ میلی لیتر Tris - HCl ۰/۵ M با pH= ۸ به محلول اضافه می شود .
- ۴- با استفاده از دستگاه همزن به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت پایین هم زده می شود .
- ۵- محلول را در دمای اتاق ساده قرار داده تا دو فاز آبی و آلی آن از هم جدا شود به آرامی فاز بالایی را با پسیپت جدا کرده و در ظرف پیمانه فنل ریخته شود .
- ۶- ۵۰۰ میلی لیتر Tris-HCl ۰/۵M با (pH= ۸) به فاز پائینی (آلی) اضافه می گردد . سپس مراحل چهارم و پنجم تکرار می گردد . تا اینکه pH محلول به حدود ۸ برسد.
- ۷- در نهایت ۲۵۰ میلی لیتر Tris-HCl ۰/۵ M (pH= ۸) با بافر TE (pH= ۸) به فنل اضافه می شود و در بطریهای شیشه‌ای تیره در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری میشود. برای جلوگیری از سوختگی و آسیبهای فنل ، تمام مراحل کار زیر هود شیمیایی انجام می شود و در حین کار از دستکش ، عینک محافظ و ماسک استفاده می شود ضمناً تمام مواد پسمان فنل و وسایل یکبار مصرف آلوده به فنل باید طبق مقررات آزمایشگاهی به طور جداگانه دفع شود.

محل انجام عملیات آزمایشگاهی



شکل ۸۵-۶- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در خزرآباد شهرستان ساری



شکل ۸۶-۶- بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

تجهیزات مورد استفاده



شکل ۸۷-۶- دستگاه مستند سازی ژل



شکل ۸۸-۶- دستگاه مستند سازی ژل یا دستگاه ترانس
ایلو میناتور مدل DOC-008.XD ساخت کمپانی UVI



شکل ۸۹-۶- دستگاه ترمال سایکلر (CR) Corbett Research



شکل ۹۰-۶- دستگاه اسپکتروفوتومتر ساخت کمپانی Eppendorf



شکل ۹۱-۶- دستگاه سانتریفوژ ساخت کمپانی Eppendorf



شکل ۹۲-۶- دستگاه الکتروفورز افقی مدل EPS-7601 و الکتروفورز عمودی مدل VEU-7305



شکل ۹۷-۶- هود لامینار

منابع

افزایی بندپی، م. ۱۳۸۵. بررسی سن، رشد، رژیم غذایی و رسیدگی جنسی شگک ماهی برانشی کوی (*Alosa braschnikowii*) در آبهای ایرانی دریای خزر (آبهای مازندران). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۸۲ ص.

افشین، ی. ۱۳۷۳. رودخانه های ایران، وزارت نیرو شرکت مهندسين مشاور جاماب، تهران. امینی، ف. ۱۳۷۴، مبانی ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان، انتشارات وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی ۳۴۴ ص

امینیان فتیده، ب. ۱۳۸۵. بهگزینی مولدین ماهی سفید در بخش جنوبی دریای خزر با استفاده از شاخصهای زیستی، پایان نامه دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۳۸ ص.

برتقی، ر.، وادگی، س.، ۲۰۰۰. آنالیز ژنتیکی دو گله ماهی مولد کپوربوسيله نشانگرهای ریزماهواره (Microsatellite) و RAPD، ترجمه: دهقان زاده، ه.، ۱۳۸۳. بخش بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی.

بنابازی، م. ح.، ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۳۰ ص.

پاتیمار، ر.، ۱۳۸۳. تعیین تنوع درون و بین جمعیتی ماهی کلمه *Rutilus rutilus caspius* در چهار آبگیر استان گلستان (رودخانه گرگانرود، تالاب گمیشان، دریاچه های آلا گل و آلا گل). رساله دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، ۱۲۵ ص.

پورغلام، الف.، ۱۳۸۷. پیشینه پردازی رهاکرد و صید ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در ۲۵ ساله اخیر و دورنمای آینده، اولین همایش ملی دریای خزر، ۲۸-۲۷ آبان، گرگان.

پورکاظمی، م.، ۱۳۷۹. مدیریت و بازسازی ذخایر پایدار. مجموعه مقالات بازسازی ذخایر. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج تهران. ص ۳۰-۱۷.

پورکاظمی، م.، بردران نویری، ش.، نوروز فشخامی، م.، ر.، ۱۳۸۳. مروری بر شناسایی جمعیت ونژادهای تاسماهیان دریای خزر، موج سبز، بهار ۱۳۸۳. صفحه ۲۵-۲۱.

پور نقشبند، ز.، ۱۳۸۰. آشنایی با PCR، انتشارات صنم، تهران.

پیری، م.، رضوی، د.، غنی نژاد، ع.، ۱۳۷۸. ماهیان استخوانی دریای خزر (آبهای ایران) گذشته، حال، آینده توسعه پایدار. مرکز تحقیقات شیلات گیلان. بندر انزلی.

تهامی، ف.، ۱۳۸۰. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی سفید به روش آلوزاین. پایان نامه کارشناسی ارشد. ص ۲۸-۱۴.

جوانروح علی آباد، ع.، ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی شش توده بز بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهورای. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

خار، ح.، ۱۳۸۳. بررسی وجود تنوع مورفومتریک، مریستیک و ژنتیک مولکولی درون گونه ای ماهی سیم *Abramis (brama orientalis)* در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر، دریاچه سد ارس و جمهوری اذربایجان، پایان نامه دکتری شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲۳۰ ص.

خوش خلق، م.، ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی و روسی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورای. پایان نامه دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۵۰ ص.

دانشور آملی، ع. ر.، ۱۳۸۳. بررسی پلی مورفیسم تعدادی از نشانگرهای ریزماهورای در جمعیت گوسفند بلوچی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. گرایش ژنتیک و دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۰۰ ص.

درویش، م.، ۱۳۸۳. اهمیت حفظ منابع طبیعی از منظر تنوع زیستی. ماهنامه علمی کشاورزی زیست محیطی، سال اول، شماره نهم، خرداد ۱۳۸۳، صفحه ۲۰.

رحمانی، ح.، ۱۳۸۵. پویایی شناسی جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی شاه کولی *Chalacalbernus chalacoides* در رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود، رساله دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، ۱۰۵ ص.

رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۲. تعیین نژادهای ماهی سفید با استفاده از الکتروفوروز پروتئین های سرم، خون دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ۱۱۵ ص.

رضوی صیاد، ب.، ۱۳۶۷. زندگی ماهی سفید. سازمان شیلات ایران- انزلی.

رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۴. ماهی سفید. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۵ ص.

- رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران.
- ریحانی، س.، ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه سواحل ایران و روسیه با استفاده از روش میکروساتلایت، پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات. ۷۴ص.
- زرین کمر، ح.، ۱۳۷۵. بررسی فیزیولوژیکی تغذیه و عادات غذایی ماهی سفید در محدوده بندر انزلی. پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۵۰ص.
- زمانی، س. ق.، ۱۳۸۰. حفاظت از تنوع زیستی در حقوق بین‌الملل. نشریه صلح سبز، شماره هفتم، پاییز ۱۳۸۰، صفحه ۱۸.
- سادلایف، ک و همکاران.، ۱۹۶۵. گزارش فنی اقتصادی در مورد تولید ذخایر ماهیهای شیلاتی در دریای خزر، قسمت آبهای ایرانی، سازمان تحقیقات شیلات ایران بندرانزلی.
- سالاری علی آبادی، م. ع.، ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش مولکولی ریزماهوره. رساله دکتری رشته بیولوژی دریا گرایش جانوران دریا، گروه بیولوژی دریا، ۱۵۰ص.
- شعبانی، ع.، ۱۳۸۴. مقایسه جمعیت‌های مولدین ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus*) دربخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی دریای خزر با روشهای مولکولی (PCR-RFLP) موفولوژیکی و برخی از نرماتیوهای تکثیر آن، پایان نامه دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۲۰ص.
- شیلات، ۱۳۸۶. سالنامه آماری شیلات، ۱۶۸ص.
- صفری، ر.، ۱۳۸۵. بررسی ساختار جمعیتی ماهی شپ در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش مایکروساتلایت، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ص.
- عبدلی، الف.، ۱۳۷۸. ماهیان آبهای داخلی ایران، موزه طبیعت و حیات وحش ایران (چاپ اول)، ۲۵۵ص.
- عطایی، ف.، ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدبهبشتی، ۱۵۷ص.

- عرفانی مقدم، و.، ۱۳۸۲. حفاظت شدگی و توانایی ایجاد پلی مورفیسم ریزماهوره‌های EST در تعدادی از گونه‌های مرتعی خانواده Leguminosae ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۴ ص.
- عبدالملکی، ش و همکاران، ۱۳۸۷. وضعیت صید و ذخایر ماهی سفید (*Rutilus frisii*) (*kutum*) در سواحل ایرانی دریای خزر، اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران-لاهیجان.
- عبدالملکی، ش و همکاران، ۱۳۸۳. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۸۴-۸۳، پژوهشکده آبرزی پروری کشور، بندر انزلی، ۱۴۳ ص.
- غنی نژاد. د.، عبدالملکی، ش.، ۱۳۸۱. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۸۱-۸۰ مرکز تحقیقات شیلات گیلان بندرانزلی. ۹۸ ص.
- غنی نژاد، د.، ۱۳۸۴. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۱۳۸۳-۱۳۸۲، تحقیقات شیلات ایران، ۶۴ ص.
- قاسم الف. ع.، ۱۳۷۵. متن سخنرانی علمی. مرکز تحقیقات شیلات استان گیلان- بندرانزلی.
- قاسمی، ا.، ۱۳۸۲. مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۴ ص.
- قرایی، الف.، ۱۳۸۰. تشخیص مولکولی گونه تاسماهی ایران و تاسماهی روس با استفاده از روش RAPD پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۸۱ ص.
- قره یاضی، ب.، ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۴-۷ شهریور، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- قلی اف، ذ. م.، ۱۹۹۷. کپورماهیان و سوف ماهیان حوزه جنوبی و میانی دریای خزر (ساختار جمعیتها، اکولوژی، پراکنش و تابیری جهت بازسازی ذخایر)، ترجمه یونس عادل، مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، بندر انزلی، ۴۴ ص.

- موسوی، م.، ۱۳۸۴. گزارشی در خصوص تکثیر و پرورش ماهی سفید. شرکت سهامی شیلات ایران. ۴۵ ص.
- نصرالله زاده، ح.، ۱۳۸۰. بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محدوده مصب رودخانه تجن در زمان مهاجرت ماهی سفید، موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. مرکز تحقیقاتی شیلاتی استان مازندران. ص ۱۰-۶.
- نبوی، س. م. ب.، ۱۳۸۵. مرگ خاموش مرجانهای خلیج فارس. نشریه مهر، ۶ بهمن ۱۳۸۵، صفحه ۱۰.
- نوروزی، م.، ۱۳۸۶. بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی اوزون‌برون دریای خزر با استفاده از روش مولکولی ریزماهواره. پایان نامه دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۶۹ ص.
- نویدی، م.، ۱۳۸۵. بررسی ساختار جمعیتی ماهی آزاد (*Salmo trutta*) دریای خزر با استفاده از روش مولکولی ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه گیلان. ۱۱۲ ص.
- Abdolhai, H., 1388. Population Genetic of *Rutilus frissi kutum* in Tajan, Sefidrud, Lemir, Shirud. using microsatellite. *Iranian Journal of Fisheries sciences* (in publish),
- Adams, B. K., Hutchings, A., 2003. Micro geographic population structure of brook char: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62: 517-533.
- Aguilar, A., Banks, j. D., Levine, K. f., wayne, R. K., 2005. Population genetics of northern pike (*Esox lucius*) introduced into Lake Davis, California, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62: 1589-1599.
- Alam, S., Islam, S., 2005. Population genetics structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 230: 65-80.
- Alarcon, J. A., Magoulas, A., Alvarez, M. C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European population of the gill head sea bream. *Aquaculture*, 230: 65-80.
- Appleyard, S. A., Ward, R.D., Grewe, P. M., 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellite. *Jornal of Fish Biology*, 60. 767-770.
- Aurelle, D., Guillemaud, T., Afonso, P., Morato, T., Wirtz, P., Santos, R. S., Leonor, M., 2003. Genetic study of *Coris julis* (osteichthyes, Perciformes, Labridae) evolutionary history and dispersal abilities. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 771-785.
- Ayllon, F., Martinez, j. L., Garcia-Vazquez, E., 2006. Loss of regional population structure in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following stocking ICES. *ICES journal of marine Science*, 63: 1269-1273.
- Azari Takami, G., Razavi, B., Hosseinpoor, N., 1990. A study on artificial propagation and culturing of the white fish *Rutilus frissi kutum* in Iran. *Journal of the Veterinary Faculty of the University of Tehran*, 45:69-90.
- Balloux, F., Brunner, H., Lugon-Moulin, N., Hausser, J., Goudet, J. 2000. Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution*, 54: 1414-1422.
- Barber, J. S. F., Selvaraj, O. S., Mukherjee, O., 1999. Genetic variation within and relationships among population of Asian water buffalo. *Animal genetic*, 28: 1-13.
- Banks, M. A., Rashbrook, V. K., Calavetta, M. J., Dean, C. A., Hedgecock, D., 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of Chinook salmon.
- Bannaud, L., Boucher – Rodoni, R., Monnerot, M., 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 7(1):57-78.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196: 80-83.
- Bartfai, R., Egedi, F., Yue, G.F., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L., Orban, L., 2006. Genetic analysis of to common cod brood stock by RAPD and Microsatellite markers. *Aquaculture*, 219:157-167.
- Beacham, T. D., McIntosh, B., Macconnachie, C., 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. *Journal of Fish Biology*, 61: 1021-1032.
- Beardmore, J. A., Mair, G. C., Lewis, R. I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 28: 829-839.
- Benetti D. D., Alarcon J. F., Stevens O. M., 2003. Advances in hatchery and grow out technology of marine finfish candidate species for offshore aquaculture in the Caribbean. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 54: 473-487.

- Berg, L.S., 1946. Fresh water fishes of Iran and adjacent Countries. Trudy zoologicheskogo Instituta Akademii Neuk SSSR, 8 :783-858 (in Russian).
- Biocapt, M.W., Version 99.03 for windows .copyright 1999.
- Brigitte, J., Hansel, M., Loeschker, V., 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. *Biology Journal of Linnean Society*, 84: 1-11.
- Bonnaud, L., Boucher-Rodoni, R., Monnerot, M., 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7 (1): 57-78.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W., 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 6: 314-332.
- Carvalho, G. R., 1998. Advances in the molecular analysis of fish population structure. *International Journal of Zoology*, 65: 21-23.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.Y., Grasshoff, P.M., 1991. High resolution DNA amplification .fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9: 553-557.
- Chauhan, T., Lal, K.K., Mohinra, V., Singh, R., Punia, P., Gopalakrishnan, Prakash, C.S. Lakra, W.S., 2007. Evaluating genetic differentiation in wild populations of Indian major carp, *Cirrhinus mirgala* evidence from allozyme and microsatellite. *Aquaculture*, 269: 135-149.
- Charlesworth, B., 1998. Measures of divergence between populations. *Molecular evolution and edition*, 15: 538-543.
- Charlotte, A., David, R. D., Tuni, S. A., 1996. Biodiversity in the seas, IUCN-WWF, CIEL.
- Charrier, G., Durand, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2006. An investigation of the population genetic structure of Pollack (*Pollachius pollachius*) based on microsatellite markers. *ICES journal of marine Science*, 63: 1705-1709.
- Coad, B. W., 2000. Criteria for assessing the conservation status of taxa (as applied to Iranian freshwater fishes). *Biologia, Bratislava*, 55: 539-557.
- Coltman, D. W., Pilkington, T., 1999. Parasitic mediated selection against inbred soya sheep in a free-living island population. *Evolution*, 53: 1259-1267.
- Corujo, M., Blanco, G., Vazquez, E., Sanchez, J. A., 2004. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta*) Loci. *Hereditas*, 141: 258-271.
- Crow, J. F., 1964. Hardy-Weinberg and language impediments. *Genetics*, 152: 821-825.
- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J., Groenen, M.A.M., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinu scarpio* L.). *Animal Genetics*. 28: 129-134.
- Cui, J. z., Shen, X. Y., Yang, G. P., Gong, Q. L., Gu, Q. Q., 2005. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. *Aquaculture*, 250: 129-137.
- Dahle, G., Jorstad, K. E., Rusaas, H. E., Ottera, H., 2006. Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morpha*) populations. *ICES journal of marine Science*, 63: 209-215.
- Dewoody, J. A., Avise, J. C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473
- Dimoski P., Toth G.P., Bagley M.J., 2000. Microsatellite characterization in (Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 9: 2187-2189
- Ditty, J. G., Shaw, R. F., 1992. Larval development, distribution, and ecology of cobia *Rachycentron canadum* (Family: Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*, 90: 668-677.
- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutation in the germ line. *Trends Genet*, 16: 551-558.
- Etscheid, M., Riesner, D., 1998. Modification for the important of TGGE and SSCP. *Molecular tools for screening biodiversity*. (150-152)
- Ezenewa, V. O., Peter, J. M., Zhu, Y., Arevola, E., Hastings, M. D., Seppa, P., Pedesem, J. S., Zacchi, F., Queller, D. C., Strassmann, S. E., 1995. Ancient conservation of trinucleotide microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 482-489.
- FAO, 2008. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. 10/06/2008.
- Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., Mcmeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., Hynes, R. A., 1995. The application of molecular marker to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, 47: 103-126
- Ferraris, J. D., Palumbi, S. R., 1996. *Molecular Zoology*. Wiley-Liss Inc. New York. 210p.

- Fitzsimons, N. N., Moritz, C., Moore, S. S., 1995. Conservation and dynamics of microsatellite Loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 432-440.
- Franks, J. S., Brown-Peterson, N. J., 2002. A review of age, growth and reproduction of Cobia, *Rachycentron canadum*, from U.S. waters of the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. Proceedings of the 53d annual Gulf and Caribbean fisheries institute, Biloxi, Mississippi, pp. 553-569.
- Ghasemi, A., Keivanshokoo, S., Shahriri-Moqadam, M., Kara., H., 2007. Genetic comparison of Iranian and Azeri populations of the oriental bream *Abramis brama orientalis* (Berg) using microsatellite. *Aquaculture Research*, 1-5.
- Goldstein, D. B., Schlotterer, C., 1998. *Microsatellite: Evolution and Application*. Oxford university press, 320 p.
- Hansen, M., 2004. Application of Molecular Markers in Population and Conservation Genetics, With Special Emphasis on Fishes. MSc thesis, Submitted to the Faculty of Natural Sciences, University of Aarhus, 100 p.
- Hartl, D. L., Clark, A. G., 1989. Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts. U. S. A. 107 p.
- Hatada, I., Hayashizoki, Y., Hirotsune, S., Komatsubara, Hand Mukai, T., 1991. A genomic scanning method for higher organisms using restriction site as landmarks. *Acad Sci: USA*, 88:9523-9527.
- Heckel, G., Zbinden, M., Mazzi, D., Kohler, A., Reckeweg, G., Bakker, T.C.M., Largiader, C., 2002. Microsatellite markers for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) and their applicability in a freshwater and anadromous population. *Conservation Genetics*, 3:79-81.
- Hedrick, P. W., 1999. Genetic of population. Arizona State University, 553 p.
- Herwerden, L., Benzie, J., Davies, C., 2003. Microsatellite variation and population genetic structure of the red throat emperor on the Great Barrier Reef. *Journal of Fish Biology*, 62: 987-999.
- Hillis, D. M., Moritz, C., 1990. Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U. S. A. 120 p.
- Hoelzel, A. R., Dover, G. A., 1991. Molecular genetic ecology. Oxford University Press, New York, 270 p.
- Israel, J. A., Cordes, F., Biumberg, M. A., May, B., 2004. Geographic Patterns of Genetic among Collections of Green Sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management*, 24: 922-931.
- Jaime, C., Ania, P., Miguel, H., Carmen, B., 2005. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture*, 261: 1194-1203.
- Jeffery, W.R., 1985. Identification of proteins and mRNAs in isolated yellow crescents of ascidian eggs. *Journal of embryology and experimental morphology*, 89: 275-287.
- Jug, T., Berrebi, P., Snoj, A., 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout population as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, 123: 381-388.
- Kalinowski, S. T., 2005. Polymorphic loci require large sample size to estimate genetic distance. *Heredity*, 94: 33-36.
- Kimura, M., Ota, T., 1973. Mutation and evolution at the molecular level. *Genetics*, 73:19-35.
- Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 24: 189-216.
- Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C., Economidis, P.S., 1991. Morphological variability among seven populations of brown trout, salmon *trutta* L., in Greece. *Journal of Fish Biology*. 38: 807-817.
- Keyvanshokoo, S., Ghasemi, A., Shahriri-Moqadam, M., Nazari, R.M., Rahimpour, M., 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran by microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 38:953-956.
- Kitanishi, S., Yamamoto, T., Higashi, S., 2008. Microsatellite variation reveals fine-scale genetic structure of masu salmon, *Oncorhynchus masou*, within the Atsuta River. *Ecology of Freshwater Fish*, 1-7.
- Li, W. H., 1997. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates Inc Publishers. Sanderland, Massachusetts. U.S.A. 160p.
- Liu, C., Liu, L., Wang, Z., Li, Y., 2005. Studies on molecular genetic characteristics of cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of tropical oceanography*, 44: 77-85.
- Lu, C. C., 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 18 (2): 331-340.
- Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Natali, M., Panara, F., 2006. Microsatellite Polymorphism in Italian population of northern pike (*Esox Lucius* L.). *Fisheries Research*, 80: 251-262.

- Ludwig, A., Belfiore, M., Christian, P., Svirsky, V., Jennekenes, I., 2001. Genome duplication events and functional reduction of polyploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 158: 1203-1215.
- Lugon-Moulin, N., Brenner, H., Wytenbach, A., Hausser, J., Goudet, J., 1999. Hierarchical analysis of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora, soricidae). *Aquaculture*, 250: 36-45.
- Lundrigan, T. A., Reist, J. D., Ferguson, M. M., 2005. Microsatellite genetic variation within and among Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture*, 244: 63-75.
- Makarov, I. A., Alekperov, A. P., Zerbahjat, T. S., 1991. Present Status of Spawning run of ship sturgeon *Acipenser nudiventris*, in the Kura River. *J. Ichthyology*, 31(5):17-22.
- Martin, A. P., Humphreys, R. and Palumbi, S. R., 1992. Population genetic structure of the armorhead, *Pseudopentaceros wheeleri* in the North Pacific Ocean: application of the polymerase chain reaction to fishery problem. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 49:2386-91.
- May, B., Charles, C., Krueger, C., Kincaid, L., 1996. Genetic variation at Microsatellite loci in sturgeon primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54:1542-1547.
- Mayr, E., Ashlock, P. D., 1991. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, International edition, New York, 345 p.
- McDonald, J. H., Seed, R., Kochen, R. K., 1991. Allozyme and morphometric characters in three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. *Marine Biology*, 11: 323-333.
- McQuown, E., Krueger, C. C., Kincaid, H. L., Gall, G. A. E., May, B., 2003. Genetic comparison of Lake Sturgeon population: differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite Loci. *Journal of Great Lakes Research*, 29: 3-13.
- Medina, M. N., Walsh, P. J., 2000. Comparison of four Mendelian Loci of the Coast of California Sea Hare (*Aplysia California*) from Populations of the Coast of California and the Sea of Cortez. *Marine Biotechnology*, 2: 449-455.
- Meffe, G. K., Carroll, C. R., 1997. Genetics: conservation of diversity within species. In principles of conservation biology, eds. G. K. Meff C. R. Carrol, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc: Publisher. pp. 161-201.
- Messier, W., Li, D., Stewart, C., 1996. The birth of microsatellite. *Nature*, 381: 483-497.
- Miller, M. P., 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3. A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Morgan, T. H., 1961. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science*, 34, 384.
- Mullis, K. B., Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 239: 487-491.
- Myers, R. M., Lumelsky, N., Lerman, L. S., Maniatis, T., 1987. Detection of single base substitution in total genomic DNA. *Nature*, 313(6002)495-498.
- Nagyaki, T., 1998. Fixation indices in subdivided population. *Genetics*, 148: 1325-1332.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Norris, A. T., Bradley, D. G., Cuning, E. D., 1999. Microsatellite genetic variation between and with in farmed and wild Atlantic salmon populations. Department of Genetics, Trinity College Dublin, Ireland, pp. 247-264.
- O'Reilly, P., Wright, J. M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, 47: 29-55.
- O'Connell, M., Skibinski, D. O. F., Beardmore, J. A., 1997. Absence of restriction site variation in the mtDNA and ND6 gene of Atlantic salmon amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Fish Biology*, 47: 910-913.
- Parden, I., Michelmore, R., 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:985-993.
- Peakall, M., Smouse, A., 2005. Gene Alex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian national university, Canberra, Australia.
- Petit, E., Mayer, F., 1999. Male dispersal in the noctule bat (*Nyctalus noctula*): Where are the limits? *Proceedings of the Royal Society of London*, 266: 1717-1722.
- Phillips, R. L., Vasil, I. K., 2001. DNA-Based Markers in Plants. 2nd Edition, Kluwer Academic Pub.
- Porta, J., Porta, J. M., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M. C., 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea Senegalensis*) inferred by microsatellite. *Aquaculture*, 251: 46-55.
- Pourkazemi, M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph. D Thesis, School of Biological sciences, university of Wales, Swansea. 260p.

- Pruett, C. L., Saillant, E., Renshaw, M. A., Patton, J. C., Rexroad, C. E., Gold, J. R., 2005. Microsatellite DNA markers for population genetic studies and parentage assignment in cobia, *Rachycentron canadum*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 84–86.
- Renshaw, M. A., Pruet, C. L., Saillant, E., Patton, J. C., Rexroad, C. E., Gold, J. R., 2005. Microsatellite Markers for Cobia, *Rachycentron canadum*. *Gulf of Mexico Science*, 23: 248-251.
- Reynolds, J., Weir, B. S., Cockerham, C. C., 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph. D Thesis. School of biological sciences, university of Wales, Swansea, U. K. 196p.
- Rezvani Gilkolaei, S., 2000. Study of mtDNA Variation of Russian sturgeon population from south Caspian Sea using RFLP the analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2 (1): 13-36.
- Rico, C. I., Hewitt, G., 1996., 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 263: 549-553.
- Rico, C., Ibrahim, K. M., Rico, I., Hewitt, G. M., 1997. Stock composition in North Atlantic population of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*, 51: 462-475.
- Rogers, J. S., 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. pp. 145-154 in "Studies in Genetics VII". University of Texas Publication no. 7213, Austin.
- Ryman, N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39: 211-224.
- Ruzzente, D.E., Wroblewski, G.S., Tadjart, C.T., Smebol, R.T., Cook, D., Goadaed. 1998. Bay-Scale population structure in costal Atlantic cod in Labrador and Newfoundland, Canada. *Journal of fish biology*, 56: 431-447.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Salari Aliabadi, M. A., Rezvani Gilkolaei, S., Savari, A., Zolgharnean, H., Nabavi, S. M. B., 2008. Microsatellite polymorphism in Iranian populations of cobia (*Rachycentron canadum* G.). *Biotechnology*, 7 (4): 92-97.
- Salgueiro, P., Carvalho, G., Collares-pereira, M. M., 2003. Microsatellite of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal. *Biological conservation*, 109: 47-56.
- Sanchez, J. A., Clabby, C., Ramos, D., Blanco, G., Flavin, F., Vazquez, E., Powell, R., 1996. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity*, 77: 423-432.
- Sarver, S. K., Foltz, D. W., 1993. Genetic population structure in species complex of blue mussels (*Mytilus* sp.). *Marine Biology*, 117: 105-112.
- Saura, M., Caballero, P., Caballero, A., Mora, N. P., 2006. Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Populations in the Ulla and Le Rez Rivers, Galicia, Spain. *ICES Journal of Marine Sciences*, 63: 1290-1296.
- Schrey, A. W., Heist, E. J., 2007. Stock structure of pallid sturgeon analyzed with microsatellite loci. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 297–303.
- Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F., Okoshi, K., 2003. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology*, 5: 227-233.
- Shaffer, R. V., Nakamura, E. L., 1989. Synopsis of biological data on the Cobia, *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical report NMFS 82, FAO fisheries synopsis 153. 21p.
- Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O Connell, M., Carvalho, G. R., 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*) with direct comparison to allozym and mtDNA RFLP analyses. *Heredity*, 83: 490-499.
- Skaala, Q., Hoyheim, B., Glover, K., Dahle, G., 2004. Microsatellite analysis in domesticated and Wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240: 131-143.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Targon, M. L. P., Machado, M. A., Colettafilho, H. D., Cristofani, M., 2000. Genetic polymorphism of sweet orange varieties by random amplified polymorphic DNA. Proceeding of the first International Symposium on Citrus Biotechnology, pp. 51-54.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G., 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major Source of genetic variation. *Nature*, 322: 652-653.
- Taylor E. B., Tamkee, P., Sterling, G., Hughson, W., 2007. Microsatellite DNA analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from western Alberta, Canada: native status and evolutionary distinctiveness of "Athabasca" rainbow trout. *Conservation Genetic*, 8: 1–15
- Taylor, J. S., Durkin, M. H., Breden, F., 1999. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 220-229
- Templeton, N. S., 2004. Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies. Marcel Dekker, New York.

- Turner, J. P., Rooker, J. R., 2005. Effect of dietary fatty acids on the body tissues of larval and juvenile cobia and their prey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 322: 13-27.
- Viard, F., Justy, F., Jarne, P., 1997. Population dynamics inferred from temporal variation at microsatellite Loci in the selfing snail *Bulinus truncates*. *Genetics*, 14: 6973-6982.
- Waples, R. S., 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 41: 385-400.
- Watts, P. C., Nash, R. D. M., Kemp, S. J., 2004. Genetic structure of juvenile plaice *Pleuronectes platessa* on nursery grounds within the Irish Sea. *Journal of sea Research*, 51: 191-197.
- Welsh, J., Mecllelland, M., 1990. Finger printing genomic using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 12: 7212-7213
- William, F. H., Gary, R. C., Stuart, R., 2001. Marked genetic structuring in localized spawning populations of cod *Gadus morhua* in the North Sea and adjoining waters, as revealed by microsatellites. *Marine Ecology Progress Series*, 223: 251-260.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wirgin, I., Waldman, J., Stabile, J., Lubinski, B., King, T., 2002. Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analysis in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 313-319.
- Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago
- Vrijenjoek, R. C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53(Supplement A) 394-412.
- Xia, J., Zheng, J., Wang, D., 2005. Exist conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*) as measured from microsatellite and mtDNA diversity. *ICES Journal of Marine Science*, 62: 1711-1716.
- Yamamoto, S., MaeKawa, K., Tamate, T., Koizumi, I., Hasegawa, K., Kubota, H., 2006. Genetic evaluation in artificially isolated populations of White - spotted char (*Salvelinus leucomaenis*), *Fisheries Research*, 78: 352-358.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T., 1999. POPGENE, Version 1.31: Microsoft Window-Based Free Ware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, Alta.
- Yue, G. H., Li, Y., Lim, L. Sh., Orba, L., 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellite. *Aquaculture*, 237: 89-102.
- Zabeau, M., Vos, P., 1993. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprinting. *European patent Application*, 2: 550-570.
- Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhou, B., Brosse, S., Chang, J., 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 7-13

Abstract

Population structure of 2 species in the Caspian Sea (*Rutilus frissi kutum* and *Rutilus rutilus*) and 2 species in the Persian Gulf and Oman sea (*Rachycentron canadum* and *Polynemus Plebeius*) were studied by using Microsatellite and RAPD. For this 210 specimens of kutum (Khoshkrud, Tonekabon, Gorganrud, Anzali Lagoon and Kura River mouth), 90 (Gorgan Bay, Anzali Lagoon and Volga), 184 of cobia (Bushehr, daier, Bandarabass, bazm, lengeh) and 235 of (*Rachycentron canadum*) (Khozestan, Bushehr, Bandarabass and chabahar) were sampled. Genomic DNA was extracted of fin using the phenol-chloroform. The quantity and quality of DNA from samples were assessed by spectrophotometer and 1% agarose gel electro-phoresis. PCR was carried out using microsatellite and RAPD primers. PCR products were separated on 8% polyacrylamide gels that were stained using silver nitrate. Result showed that in kutum the average of expected and observed heterozygosity was 0.54 and 0.49 respectively. Significant deviations from Hardy-Weinberg expectations were observed almost in all of location ($P \leq 0.01$, ($P \leq 0.05$)). Using F_{st} and R_{st} there was significant difference between locations ($P \leq 0.01$). In study of *Rutilus rutilus caspicu* the average of expected and observed heterozygosity was 0.5 and 0.7 respectively. F_{st} didn't show significant difference between Iranian locations ($P \geq 0.01$) but it was significant between Iranian populations and Russian populations ($P \leq 0.05$). In cobia the average of expected and observed heterozygosity was 0.655 and 0.874 respectively. Significant deviations from Hardy-Weinberg expectations were observed almost in all of location ($P \leq 0.01$, ($P \leq 0.05$)). Significant differences ($P < 0.01$) weren't observed between R_{st} recorded in the same region specimens studied but were observed between R_{st} recorded in the different region specimens studied. In *Polynemus Plebeius*, the observed heterozygosity in the Bushehr and Bandar abbas (0.22 ± 0.13) was the highest and in Chabahar the lowest (0.171 ± 0.175).

Key word: Population Genetic, *Rutilus frissi kutum*, *Rutilus rutilus*, Caspian Sea, *Rachycentron canadum*, *Polynemus Plebeius*, Persian Gulf and Oman sea.

MINISTRY OF JAHAD-E-AGRICULTURE
AGRICULTUR RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION-MARICULTURE RESEARCH CENTER

Title: Population genetic structure of 2 species from Caspian Sea (*Rutilus frissi kutum* and *Rutilus rutilus*) and 2 species from Persian Gulf and Oman Sea (*Rachycentron canadum* and *Eleutheronema tetradactylum*) using Molecular Markers

Approved number: 2-019-200000-03-0000-86019

Author: Sohrab Rezvani Gilcolaei

Executor: Sohrab Rezvani Gilcolaei

Collaborator: Mohammad Javad Taghavi and Mohammad Momeni

Advisor: -

Location of execution: Mazandaran province

Date of beginning: 2007

Period of execution: 3 years & 6 months

Publisher: : *Irnaian Fisheries Research Organization*

Circulation: 20

Date of publishing: 2011

All Right Reserved. No Part of this Publication May be reported or Transmitted wiyh out indicating the original refrence

**MINISTRY OF JAHAD-E-AGRICULTURE
AGRICULTUR RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION-MARICULTURE
RESEARCH CENTER**

Title:

**Population genetic structure of 2 species from Caspian Sea
(*Rutilus frissi kutum* and *Rutilus rutilus*) and 2 species
from Persian Gulf and Oman Sea (*Rachycentron canadum*
and *Eleutheronema tetradactylum*) using Molecular
Marker**

Executor :

Sohrab Rezvani Gilkolaei

2011.1468