وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – پژوهشکده اکولوژی دریا ی خزر

عنوان:

شناسایی ساختار ژنتیکی ماهی استخوانی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره

مجری:
سهراب رضوانی گیل‌کلائی

شماره ثبت:
۸۹/۱۱۳۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مـؤسسه تحـقیقـات شیـلات ایـران- اکولوژی دریای خزر

- **عنوان پروژه/ طرح :** شناسایی ساختار ژنتیکی ماهی استخوانی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) حوزه جنوبی دریـای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره
- **شماره مصوب:** ۸۹۰۲۹-۱۲-۱۲-۴
- **نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارندگان:** سهراب رضوانی گیل کلائی
- **نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):-**
- **نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان:** سهراب رضوانی گیل کلائی
- **نام و نام‌خانوادگی همکاران:** سمیرا محمدیان- محمد جواد تقوی- فرامرز لالـوئی- محجوبـه نیرانـی- داوود کـر- حـسین طالشیان
- **نام‌ونام‌خانوادگی مشاور(ان) :** -
- **محل اجرا:** استان مازندران
- **تاریخ شروع:** ۱۳۸۹
- **مدت اجرا:**۱سال
- **ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران**
- **شمارگان(تیتراژ):۲۰ نسخه**
- **تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۰**

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکـر مأخـذ بلامـانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

طرح / پروژه: شناسایی ساختار ژنتیکی ماهی استخوانی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره

کد مصوب : ۸۹۰۲۹-۱۲-۱۲-۴

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۱۱۳۱ تاریخ:۸۹/۹/۲۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سهراب رضوانی گیل کلائی دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته ژنتیکی مولکولی می‌باشد.

طرح/پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۳۸۹/۷/۲۱ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹/۱۰و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح یا پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز□ ایستگاه□

با سمت مشاور رئیس موسسه و عضو هیئت علمی در ستاد موسسه مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- اهداف ۴
۱-۲- دریای خزر ۴
۱-۲-۱- گرگانرود ۵
۱-۲-۲- بابلرود ۵
۱-۲-۳- تالاب انزلی ۵
۱-۲-۴- رودخانه حویق ۶
۱-۳- ویژگی کپور ماهیان- گونه سیاه کولی *Vimba vimba persa* (Palla, 1814) ۶
۱-۳-۱-راسته کپور ماهی شکلان ۶
۱-۳-۲-جایگاه سیاه کولی در رده بندی ماهیان استخوانی ۶
۱-۴- ژن و تغییرات ژنتیکی ۹
۱-۵- صفات مندلی ۹
۱-۵-۱- فراوانی اللی ۱۰
۱-۵-۲- تعادل هاردی- واینبرگ (Hardy – Weinberg Equlibrium) ۱۰
۱-۶- توصیف تمایز و اختلاف ژنتیکی ۱۱
۱-۷- تنوع ژنی یا هتروزایگوسیتی ۱۱
۱-۸- الل های واقعی ۱۲
۱-۹- الل های موثر ۱۲
۱-۱۰- فاصله ژنتیکی ۱۲
۱-۱۱- جریان ژنی ۱۳
۱-۱۲- نشانگر ژنتیکی ۱۳
۱-۱۲-۱ -کاربرد نشانگر ژنتیکی ۱۳
۱-۱۲-۲-انواع نشانگرها ۱۴
۱-۱۳- سابقه مطالعات و تحقیقات انجام شده ۱۸
۱-۱۳-۱- مطالعات انجام شده در خارج از کشور ۱۸

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۲-۱۳-۱- مطالعات انجام شده در داخل کشور ۲۰
۲- مواد و روش ها ۲۲
۲-۱- نمونه برداری ۲۲
۲-۲-مواد مصرفی و تجهیزات ۲۳
۲-۲-۱- مواد مصرفی مورد نیاز ۲۳
۲-۲-۲- تجهیزات مورد استفاده ۲۳
۲-۳- استخراج DNA ۲۴
۲-۴- بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد ۲۵
۲-۵- آماده سازی آغازگرها ۲۵
۲-۶- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۶
۲-۷- الکتروفوز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و ژل پلی آکریل آمید 8 درصد ۲۹
۲-۷-۱- مواد مورد استفاده جهت الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد ۳۱
۲-۷-۲- تجهیزات مورد استفاده جهت الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد ۳۱
۲-۷-۳- روش تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد ۳۱
۲-۸- رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از نیترات نقره ۳۲
۲-۹- ثبت تصاویر ۳۳
۲-۱۰- سنجش وزن مولکولی محصول PCR و امتیازدهی باندها ۳۳
۲-۱۱- آنالیز آماری ۳۳
۳-نتایج ۳۴
۴- بحث ۴۰
۵- نتیجه گیری نهایی ۴۴
پیشنهادها ۴۵
منابع ۴۷
چکیده انگلیسی ۵۴

چکیده

ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سیاه کولی دریای خزر (*Vimba vimba persa*)در چهارمنطقه از سواحل جنوبی دریای خزر (تالاب انزلی و رودخانه حویق واقع در استان گیلان، رودخانه بابلرود واقع در استان مازندران و رودخانه گرگانرود واقع در استان گلستان) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی استخراج ژنوم DNA از بافت باله ۱۲۱ ماهی با استفاده از روش فنول- کلروفرم صورت گرفت و واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره انجام شد. از ۱۷ جفت آغازگر استفاده شده ۱۳ جایگاه شناسایی شد که ۱۰ جایگاه پلی مورف و۳جایگاه مونومورف بود. در مجموع ۲۹۶ الل مورد شناسایی قرار گرفت، بیشترین تعداد الل های مشاهده شده با میانگین اللی در هر جایگاه 7.55 بدست آمد. میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار بترتیب ۰/۸۰۵ و ۰/۷۲۲ بود. بیشتر مناطق انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند، مقادیر محاسبه شده Fst چهار جمعیت مجزا که از نظر آنالیز آماری معنی دار هستند از ماهی *Vimba vimba persa* در سواحل جنوبی دریای خزر را نشان داد.

کلمات کلیدی: سیاه کولی، ژنتیک جمعیت، ریزماهواره، دریای خزر، ایران.

۱- مقدمه

دریای خزر بزرگترین دریاچه جهان است که پنج کشور آذربایجان، ایران، قزاقستان، روسیه و ترکمنستان در حوزه این دریا قرار دارند، (Aladin & Plotnikov, 2004). دریای خزر به سه بخش شمالی، مرکزی و جنوبی (عمدتا سواحل ایران) تقسیم می شود (Aubrey *et al*., 1994)، تقریبا 76تا۱۲۶ گونه از ۱۷ خانواده ماهی در آن دیده می شود که بیشترین آن مربوط به خانواده کپور ماهایان(۳۳٪) و گاوماهیان(۲۸٪) می باشد (Vladimir, 2002).

ماهی سیاه کولی به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) تعلق داشته و بومی دریای خزر می باشد که در تمامی سواحل از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب مشاهده می شود (Nikolskii, 1954; Kazanchof, 1981). این ماهی ها رودکوچ هستند و در فصل بهار به آبهای شیرین و لب شور جهت تخم ریزی مهاجرت می کنند و اغلب جهت تخمریزی به رودخانه ها بویژه رودخانه آستاراچای، ارس، شفارود، کرگانرود، ناورود، تالاب انزلی، حویق، گرگانرود، سفیدرود، خشکرود، تنکابن، سردآبرود، بابلرود، چالوس، هراز، قره سو، تجن و خلیج گرگان مهاجرت می کنند (Berg, 1949) تخمریزی آن در رودخانه ها زیاد طولانی نبوده، برخی از ماهی شناسان آن را دریازی-رودکوچ Anadromous و برخی دیگر آن را نیمه رودکوچ گفته اند (Kiabi *et al*., Kazanchof, 1981; 1999)، لذا برخی از ماهی شناسان آن را دریازی-رودکوچ Anadromous و برخی دیگر آن را نیمه رودکوچ semi-migration گفته اند (Nikolskii,1954; Berg.1949). صید این ماهی به صورت حرفه ای و نیمه حرفه ای در دریا صورت می گیرد و میزان صید آن در سالهای اخیر (۱۳۸۶-۱۳۷۶) بین ۴۸۰-۸۰ تن متغیر بوده است (معاونت صید سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۸). طبق طبقه بندی IUCN[1] ماهی سیاه کولی جز گونه های در معرض تهدید بوده (Kiabi *et al*, 1999) که صید بیش از حد و از بین رفتن زیستگاه این گونه از مهمترین دلایل رو به زوال و کاهش جمعیت آن می باشد (Jolodar & Abdoli, 2004). فعالیت های متعدد بشر اعم از ایجاد آلودگی ها، صید بی رویه، تخریب زیستگاه، مسدود کردن مسیر مهاجرت و تکثیر مصنوعی موجب کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی ها در طبیعت شده که از مهمترین مشکلات شیلات به شمار میرود تا جایی که افزایش تکثیر مصنوعی و رهاسازی گونه ها سبب یکسان سازی ژنتیکی شده و ساختار ژنتیکی جمعیت ها را تحت تاثیر قرار داده است (Ferguson, 1995; Zhao, 2005). ساختار ژنتیکی به عنوان یک ویژگی ماندگار در بین گونه ها است که

[1]- International Union for Conservation of Natural Resources

با مرگ موجودات از بین نمی رود (Weir *et al*., 1996) از سوی IUCN به عنوان یکی از مهمترین بررسی ها جهت حفاظت از گونه ها شناخته شده است (King *et al*., 2004). مدیریت ذخایر آبزیان نیازمند مطالعات ژنتیک مولکولی می باشد، بیشتر گونه ها بیش از یک ذخیره دارند که مدیریت شیلاتی با ترکیب ذخایر و با توجه به توانمندی آن در تجدید جمعیت ها و برداشت پایا از ذخایر می تواند کمک زیادی به حفظ و تنوع ژنتیکی آنها داشته باشد در نتیجه شناسایی ذخایر از اصول مدیریت شیلاتی است (Waldman, 1999)

از سال ۱۹۹۰ با توسعه ی روش های مولکولی و استفاده از نشانگرهای DNA، مثل ریزماهوارهها توانستند اطلاعات مفیدی در مورد تنوع ژنتیکی ، تنوع اللی و پارامترهای دیگری که در ایجاد جمعیت ها نقش تعیین کننده دارند بدست آورند (Neigel, 1997; Beacham *et al*, 2000; Ward *et al*, 2001; Salini *et al*, 2004; Meng *et al*., 2009)، از بزرگترین فواید نشانگرهای ریزماهوارهها اندازه نسبتا کوچک آن، توارث همبارزو تولید پلیمورفیسم بالا، توانایی شناسایی ذخایر ژنتیکی ، تعیین روابط خویشاوندی و توارث پذیری آنها می باشد (Crooijmans *et al*., 1997; Aliah *et al*., 1999; Wei *et al*., 2001; Li *et al*., 2007; Yue *et al*., 2009).

Barinova و همکاران در سال ۲۰۰۲ اعلام داشتند که این نشانگرها ابزار مناسبی جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ها در گونه های *Leuciscus idus*، *Rutilus rutilus* و سایر ماهی های خانواده کپور ماهیان می باشند. رضوانی گیل کلائی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در سال ۱۳۸۸ ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) بررسی و سه جمعیت از این گونه را معرفی نمایند، همچنین Yue و همکاران در سال ۲۰۰۹ توانستند با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی باس دریایی اقیانوس اطلس (*Lates calcarifer*) را در آسیا مورد مطالعه قرار دهد و Aungو همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان کردند نشانگرهای ریزماهواره توانایی نشان دادن ساختار ژنتیکی جمعیت های ذخایر وحشی و در اسارت را در ماهی *Cirrhinus cirrhosus* دارا می باشند.

Abassi و همکاران در سال 2004، رحمانی و عبدلی در سال ۱۳۸۷ و همچنین نجاتی جوادی در سال ۱۳۸۸ به مطالعه مورفولوژیک و مریستیک این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر پرداختند ایشان بیان نمودند احتمالا جمعیت های متفاوتی از این گونه وجود دارد اما برای مطالعه دقیقتر و قابل استنادتر روشهای مولکولی را برای تفکیک جمعیت های مختلف سیاه کولی پیشنهاد کردند.

در این مطالعه ساختار ژنتیکی ماهی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) ازچهار منطقه (تالب انزلی و رودخانه حویق واقع دراستان گیلان،رودخانه بابلرود واقع در استان مازندران و رودخانه گرگانرود واقع دراستان گلستان) در سواحل ایرانی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بدست آمد.

۱-۱-اهداف و فرضیه های تحقیق

انجام فعالیت های بازسازی ذخایر سیاه کولی زمانی مفید واقع می شود که منجر به کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت گونه مورد نظر نشود.در نتیجه شناسایی ساختار ژنتیکی این ماهی یکی از اهداف مدیریت ذخایر می باشد از اینرو اهداف این تحقیق شامل :

۱-شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت های احتمالی مربوط به گونه ی سیاه کولی در دریای خزر

۲-معرفی نشانگرهای ژنتیکی مربوطه

با توجه به مطالعات اولیه فرضیات زیر مطرح گردید:

تنوع ژنتیکی در گونه سیاه کولی چگونه است؟

آیا تفاوت ژنتیکی در جغرافیای غرب، شرق و مرکز حوزه جنوبی دریاچه ی خزر وجود دارد یا خیر؟

آیا این تفاوت ها از نظر آماری معنی دار است یا خیر؟

۲-۱- دریای خزر

دریای خزر بعنوان بزرگترین دریاچه در جهان است . این دریا در حد فاصل عرض های جغرافیایی ۳۶ تا ۴۶ درجه شمالی و طول های جغرافیایی ۴۶ تا ۵۳ درجه شرقی واقع شده و طول دریاچه از جنوب به شمال ۱۲۰۴ کیلومتر و عرض متوسط آن ۲۰۴ کیلومتر و حجم آب آن رادر حدود ۷۷۰۰۰ کیلومتر مربع تخمین می زنند، بیش از ۱۳۰ رودخانه به این دریا وارد می شود (Aladin & Plotnikov, 2004)

۱-۲-۱- گرگانرود

این حوزه با وسعت ۱۰۲۰۰ کیلومتر مربع یکی از مهمترین رودخانه های شمال شرقی سواحل ایران است که بخش وسیعی از آن در استان گلستان واقع شده و در محدوده طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۵۶ درجه و ۲۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۳۸ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی واقع شده است. این رودخانه از رشته کوههای آلاداغ واقع در بجنورد سرچشمه گرفته و از جنوب شرقی دریای خزر در نزدیکی بندر ترکمن به این دریا می پیوندد (ساعدی و محمدی، ۱۳۸۱).

۲-۲-۱- بابلرود

رودخانه بابلرود یکی از رودخانه های استان مازندران است و بخشی از حوزه آبریز دریای خزر را تشکیل می دهد،این رودخانه در محدوده مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۲ دقیقه شمالی و ۵۲ درجه و ۳۹ دقیقه شرقی جریان دارد، رودخانه بابلرود با طول ۸۸ کیلومتر از دامنه شمالی البرز سرچشمه گرفته و در منطقه بابلسر وارد دریای خزر می شود (www.Wikipedia.com)

۳-۲-۱- تالاب انزلی

تالاب انزلی با وسعت ۱۵۰۰۰ هکتار با مختصات جغرافیایی ۳۷ درجه و ۲۸ دقیقه عرض شمالی و ۴۹ درجه و ۲۵ دقیقه طول شرقی در استان گیلان و در کنار بندر انزلی قرار دارد در این تالاب گونه های مختلف آبزیان زندگی می کنند (www.Wikipedia.com)، زهکش ها و رودخانه های کوچک و بزرگی از سمت جنوب، شرق و غرب به این تالاب وارد می شوند که از مهمترین آنها می توان به کچلک ، سیاویزان، شیله سر، بهمبر، بیجار خاله، مرغک ، خاکایی، اسفند، (سیارودخان)، کلسر، چمثقال (ماسوله رودخان)، نرگستان (روکو)، کانال مادر (سیابی)، گازرودبار (لاکسار)، سیاه درویشان، هندخانه، گازگیشه، باغبان خاله، پیربازار و خمام رود اشاره کرد و همچنین رودخانه هایی نیز از این تالاب خارج شده و به دریای خزر میریزند که می توان به رودخانه های تازه بکند، نهنگ روگا، راسته خاله، پیربازار روگا و سوسن روگا اشاره کرد (بهمنی، ۱۳۷۴)

٤-۲-۱- رودخانه حویق

رودخانه حویق با مختصات جغرافیایی 48 درجه و 38 دقیقه تا ۴۸ درجه و ۵۴ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجه و ۸دقیقه تا ۳۸ درجه و ۱۲ دقیقه عرض شمالی در جنوب غربی دریای خزر واقع در استان گیلان در جریان است، این رودخانه از نظر مهاجرت گونه های ماهی، تخمریزی و تغذیه ماهیان مصبی و همچنین به دلیل دارا بودن جمعیت های بومی دارای اهمیت است، این رودخانه از ارتفاعات کوه تالش سرچشمه گرفته و در ۴۵ کیلومتری جاده تالش- آستارا به دریای خزر وارد می شود (عباسی، ۱۳۸۴).

۳-۱- ویژگی کپور ماهیان- گونه سیاه کولی (*Vimba vimba persa* (Palla, 1814

۱-۳-۱-راسته کپور ماهی شکلان[1]

راسته کپور ماهی شکلان شامل ۵ خانواده Balitoridae، Cobitidae، Catostomidae، Gyrinocheilidae و Cyprinidae می باشد که خانواده کپور ماهیان یکی از گسترده ترین و متنوع ترین خانواده از ماهیان در جهان است. این خانواده در شمال آمریکا، اروپا، آسیا و آفریقا یافت می شود. حدود ۲۰۰ جنس و بیش از ۲۴۲۰ گونه و حدود ۸/۵٪ از ماهیان دنیا را در بر می گیرد. در ایران ، این خانواده نزدیک به ۳۳ جنس بومی دارد. حداقل در تمام حوضه آبی یافت می شود که در دریای خزر این تعداد به ۲۹ جنس می رسد (Coad, 1995) از جمله آن گونه *Vimba vimba persa* می باشد.

۲-۳-۱-جایگاه سیاه کولی در رده بندی ماهیان استخوانی: (Winfield & Nelson, 1991)

Phylum: Chordata
Subphylum: Vertebrata
Grade: Pisces
Class: Osteichthyes
Sub class: Actinopterygii
Infra class: Neopterygii
Division: Halocostomi
Subdivision: Teleoseti
Infradivision: Euteleoseti
Supra order: Ostearіophsii
Order: Cypriniformes
Sub order: Cyprinidei
Family: Cyprinidae
Subfamily: Leuciscinae
Genus: *Vimba*
Species: *Vimba elongate*
Vimba melanops
Vimba vimba

[1] Cypriniformes

جنس سیاه کولی دارای سه گونه و پنج زیر گونه شامل *Vimba vimba bergi, Vimba vimba carinata, Vimba vumba persa, Vimba vimba tenella, Vimba vimba vimba* است که هر کدام چندین جمعیت یا نژاد را تشکیل می دهند (مرادخانی، ۱۳۷۳).

- **نام های متداول *Vimba vimba persa***

نام محلی این ماهی در سواحل گیلان ، کولی (Kooli یا Cooli)، در سواحل مازندران پشت سیاه، در زبان آذربایجانی Garasol و در زبان روسی Chemospinka, Kaspiiski، Southern white- eye و Vimba و در زبان انگلیسی Caspian vimba خوانده می شود (Abdoli & Jolodar 2004,).

- **اختصاصات گونه سیاه کولی**

دارای بدن کشیده و از طرفین به هم فشرده بوده و از نظر طولی و عرضی بزرگ نیستند. حد متوسط طول این ماهی ها ۲۰ تا ۳۰ سانتی متر و وزن آنها ۹۰ تا ۲۵۰ گرم است.دهان هلالی ، زیرین، گوشتالود و در قسمت خارجی تیره رنگ می باشد . دندان ها حلقوی و یک ردیفی و با فرمول ۵-۵ می باشد. خط جانبی فشرده و در امتداد آن ۴۸ تا ۶۴ عدد فلس وجود دارد. تعداد خارهی آبششی ۱۹-۱۴ عدد می باشد، قسمت انتهایی باله پشتی به طور عمود در مقابل قسمت ابتدایی باله مخرجی قرار دارد. قسمت مخرج فاقد فلس بوده و برجستگی های کیل (keel) روی ساقه دمی دیده می شود (عسگری، ۱۳۸۴).

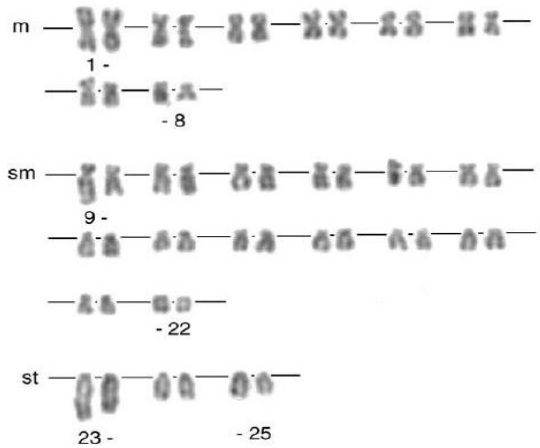
قسمت پشتی بدن به رنگ قرمز قهوه ای تا آبی توسی ، پهلوها به رنگ نقره ای و قسمت سطح شکمی زرد رنگ است . باله های زوج در قسمت پایه قرمز و در قسمت رأس صورتی رنگ است. باله مخرجی قسمت قاعده اش به رنگ قرمز و بقیه باله ها از خاکستری تا بیرنگ می باشند. در فصل تخم ریزی نوارهای سیاه رنگ در طول سطح پشتی و شکمی بدن دیده می شود، این ماهی از قسمت مرکزی اروپا تا حوضه دریای خزر دیده شده است. در ایران از ارس تا رودخانه اترک در دریای خزر در سفید رود و در مرداب انزلی و خلیج گرگان و جنوب شرقی دریای خزر و جنوب غربی دریای خزر و بخش مرکزی دریای خزر مشاهده شده است (Abdoli, & Jolodar 2004).

سن مهاجرت این گونه در سفید رود ۲-۴ سالگی می باشد. جنس ماده بالغ بین ۱۶-۲۳ سانتی متر و نرها بین ۱۳-۱۹ سانتی متر می باشد. ماهی های بزرگتر اول تخم ریزی می کنند و ماهی های کوچکتر در انتهای فصل تخم ریزی، تخم ریزی را انجام می دهند.جنس نر در سن ۲ تا ۶ سالگی و جنس ماده در سن ۳ تا ۷ سالگی بالغ می شوند زمان تخم ریزی بر حسب دمای آب، ماههای اردیبهشت تا تیر است. محل تخم ریزی در ناحیه ای از رودخانه که از گیاهان آبزی پوشیده شده است، می باشد.در زمان تخم ریزی سر و پشت بدن سیاه رنگ، پهلوها و باله های زوج و مخرجی به رنگ نارنجی تا قرمز درمی آیند و علاوه بر این بر روی سر و بدن ماهیان نر، دانه های مروارید شکل نیز ظاهر می شوند . تعداد تخم ۸۰ تا ۳۰۰ هزار عدد و در زیر گونه ماهی سیاه کولی تعداد تخم ۲۵ تا ۵۸ هزار عدد است (Berg, 1949).

این ماهی به صورت حرفه ای و نیمه حرفه ای در دریا ، تالابها و رودخانه ها با آلات صید مختلف شامل پره های تعاونی ، دام ، لاکش ، ماشک ، کالو ، (ساچوک) و انواع قلاب صید می گردد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۳)

- **تعداد کروموزومها و کاریوتایپ ماهی سیاه کولی**

تعداد کروموزومهای این ماهی ۲n=۵۰ می باشد. با استفاده از نسبت طول بازوی بلند کروموزوم به طول بازوی کوتاه آن فرمول کروموزومی ۸ جفت متاسنتریک، ۱۴ جفت ساب متاسنتریک و ۳ جفت ساب تلوسنتریک (ST3+SM14+M8) محاسبه شده است (R´abov´a, *et al.*, 2003).



شکل ۱-۱- کاریوتایپ ماهی سیاه کولی

٤-١- ژن و تغییرات ژنتیکی

واحدهای بنیادی وراثت را ژن می نامند، به بیان دیگر ژن عبارت است از واحد وراثتی که حاوی کد یا رمز مربوط به صفت و یا پروتئین خاصی می باشد (Hartle, 1998). یک ژن در واقع آرایش خطی زیرواحدهایی ویژه است و خود نیز قطعه ی کوچکی از مولکول بزرگ اسید دزوکسی ریبونوکلئیک[1] (DNA) می باشد، محل هایی را که ژن روی کروموزوم و یا بخشی از DNA اشغال می کند را جایگاه ژنی (Locus) می گویند. ژن ها می توانند اشکال متفاوتی داشته باشند، ژنی که فقط یک الل در یک جمعیت داشته باشد را تک شکلی (Monomorphic) و ژنی که دو یا چند الل داشته باشد را چند شکلی (Polymorphic) می نامند. هر فرد در هر جایگاه ژنی خود دارای یک و یا دو نوع الل می باشد، افرادی که یک نوع الل در یک جایگاه معین داشته باشند در آن جایگاه خالص یا هموزایگوس[2] و اگر دو نوع الل در یک جایگاه معین داشته باشند، در آن جایگاه ناخالص و یا هتروزایگوس[3] خوانده می شوند (امینی، ۱۳۷۴)

٥-١- صفات مندلی

بر اساس ژنتیک مندلی زمانی که یک الل جایگزین الل دیگر در جایگاه ژنی مشخص می شود تغییرات عمده ای رخ می دهد (Hallerman, 2003).

جهت بررسی تغییرات ژنتیکی باید فراوانی ژنوتیب مربوطه نشان داده شود از اینرو برای بیان رابطه بین فراوانی اللها و فراوانی ژنوتیب وجود مدل ضروری است، مدلی که در سال ۱۹۰۸ توسط Hardy و Weinberg به طور جداگانه مطرح گردید، مهمترین مدلی است که فراوانی اللی و ژنتیب را به هم ربط می دهد.

[1] Deoxyribonucleic Acid
[2] Homozygous
[3] Heterozygous

۱-۵-۱- فراوانی اللی

فراوانی اللی با فرمول زیر محاسبه می گردد:

$$\text{فراوانی اللی} = \frac{2N_{xx} + N_{XY}}{2N}$$

N : تعداد نمونه ها Nxx: تعداد افراد هموزایگوت

Nyx: تعداد افراد هتروزایگوت.

۱-۵-۲- تعادل هاردی- واینبرگ (Hardy – Weinberg Equlibrium)

بر اساس مدل هاردی واینبرگ فراوانی اللی می تواند از نسلی به نسل دیگر همواره ثابت بماند البته با این پیش فرض که :

۱: طی نسل های مختلف، اندازه جمعیت بزرگ و ثابت باقی بماند.

۲: آمیزش ها به صورت تصادفی باشد، به این مفهوم که جامعه مورد مطالعه، جمعیتی یکنواخت (panmictic) یا دارای اخطلاط خوب داشته باشد.

۳: اعضای جامعه دیپلوئید باشد.

۴: نسل ها با هم همپوشانی نداشته باشند.

۵: تولید مثل جنسی باشد.

۶: جهش، مهاجرت یا انتخاب، تاثیرات ناچیزی بر جامعه داشته باشند.

انحراف از هریک از این پیش فرض ها به منزله فاصله گرفتن جمعیت از تعادل هاردی- واینبرگ می باشد.

تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون Chi-square مورد بررسی قرار می گیرد.

$$X^2 = \sum_{i-1}^{k} \frac{(O-E)^2}{E}$$

O: تعداد ژنوتیپ مشاهده شده در افراد E: تعداد ژنوتیپ قابل انتظار در افراد.

۱-۶- توصیف تمایز و اختلاف ژنتیکی

جهت توصیف تمایز ژنتیکی در یک زیرجمعیت و مقایسه آن نسبت به اختلاف ژنتیکی کل از فاکتورهای F_{ST} و R_{ST} استفاده می شود و هر یک مستقیما و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هر دو روش برآورد مرسوم در تمایز ژنتیکی(F_{ST}) و برآورد کننده تمایز ژنتیکی مخصوص ریزماهواره ها(R_{ST}) به طور معمول در مطالعاتی که نشانگرهای ریزماهواره استفاده می گردد، گزارش می شوند. (نوروزی، ۱۳۸۸).

محاسبهFst بر حسب فراوانی:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_e}{H_T}$$

H_T: هتروزایگوسیتی کل H_e: هتروزایگوسیتی قابل انتظار.

محاسبه F_{ST} و R_{ST}براساس AMOVA:

$$R_{ST} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})} \qquad F_{ST} = \frac{V_{AP} + V_{AR}}{(V_{WP} + V_{AP} + V_{AR})}$$

V_{AP} : اختلاف بین جمعیت ها V_{AR}: اختلاف بین مناطق V_{WP}: اختلاف داخل جمعیت ها

۱-۷- تنوع ژنی یا هتروزایگوسیتی[1]

هتروزایگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در جمعیت دارد، زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است. هتروزایگوسیتی اختصاصی بوده و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تاثیر آن است. (Beardmore *et al*, 1997). راههای مختلفی برای بررسی وجود دارد که ساده ترین آن اندازه گیری فراوانی الل ها یا ژنوتیپ ها می باشد. فراوانی هتروزیگوت ها از این جهت اهمیت دارد که هر هتروزیگوت ناقل الل های متفاوتی است و این نشاندهنده وجود تنوع می باشد. به همین دلیل معمول ترین معیار تنوع ژنی در جمعیت، میزان هتروزایگوسیتی می باشد.

[1] Gene Variation or Hetrozygosity

$$H_e = 1 - \sum P_i^2 \qquad H_{o=\frac{N_o - Of - H_{ets}}{N}}$$

H_e: هتروزایگوسیتی قابل انتظار P: فراوانی اللی در هر جایگاه H_o: هتروزایگوسیتی مشاهده شده N: تعداد نمونه

۸-۱- الل های واقعی[1]

تعداد الل های واقعی عبارت است از تعداد الل های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی،که این معیار تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و به همین علت این امکان وجود دارد که در آزمایش های گوناگون با تعداد نمونه های متفاوت، تعداد الل های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین به دست آید (Ruzzante 1998; Peakal & Smous, 2005).

۹-۱- الل های موثر[2]

این معیار بیانگر تعداد الل هایی است که هتروزایگوسیتی یکسان ایجاد می کنند. در شرایطی که همه الل ها دارای فراوانی یکسان بوده و با الل های نادر ($p \leq 0.01$) تحت تاثیر قرار نگیرند، تعداد الل های موثر در یک جمعیت برابر تعداد الل های واقعی خواهد بود.

$$N_e = \frac{1}{1 - H_e}$$

Ne: تعداد الل موثر، H_e: هتروزایگوسیتی قابل انتظار

۱۰-۱- فاصله ژنتیکی N_{ei}[3] (1972, 1978)

فاصله ژنتیکی طرحی برای بیان تفاوت میان جمعیت ها است. اگر هیچ تفاوتی وجود نداشته باشد، فاصله ژنتیکی صفر خواهد بود و اگر جمعیت ها در هیچ یک از مکان های ژنی الل مشترک نداشته باشند، فاصله ژنتیکی حداکثر یعنی مساوی یک خواهد بود.

[1] Real allele
[2] Effective allele
3 Genetic distance

$$N_{ei} = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_X J_Y)}}$$

N_{ei} فاصله ژنتیکی، J_{xy}, J_X, J_Y: بر اساس فراوانی هر الل در جمعیت x و y.

۱۱-۱- جریان ژنی[1]

جریان ژنی به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل اطلاق می شود، که این میزان با مهاجرت بین مناطق نسبت مستقیم و با تنوع ژنتیکی نسبت عکس دارد یعنی هرچه میزان جریان ژنی بیشتر باشد مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده در نتیجه تنوع ژنتیکی کاهش می یابد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴)

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

N_m جریان ژنی، F_{ST} درجه تمایز ژنتیکی جمعیت

۱۲-۱- نشانگر ژنتیکی

مشخص شده است که ژنوم موجودات تفاوتهایی در ردیف بازهای خطی خود دارند که این تغییرات گوناگونی در افراد یک جمعیت یا چند شکلی ژنتیکی را ایجاد می نماید، که این تفاوت ها را می توان به عنوان نشانه یا نشانگرهای ژنتیکی در نظر گرفت. برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد باید حداقل دارای دو ویژگی باشد (Ciftci & Okumus., 2002):

الف- چند شکلی (polymorphism) نشان دهند

ب- به ارث برسد

۱-۱۲-۱ -کاربرد نشانگر ژنتیکی

الف- تعیین اصل و نسب: تعیین اصل و نسب با استفاده از نشانگرهای ملکولی تا 90 درصد موفقتر از تعیین آن توسط روش های بیوشیمیایی (۴۰-۶۰ درصد) و یا گروههای خونی (۷۰-۹۰ درصد) می باشد (بزرگی پور، ۱۳۷۳).

[1]. Gene flow

ب- تخمین فواصل ژنتیکی: نشانگرهای ملکولی روش قابل قبولی برای ارزیابی فواصل ژنتیکی در بین جمعیت ها هستند (عصفوری، 1376).

پ- تعیین جنسیت: با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی می توان جنسیت فرد مورد نظر را تعیین نمود (بزرگی پور، ۱۳۷۳)

ت- تشخیص ناقلین بیماری: بسیاری از بیماریهای خطرناک ناشی از عفونت باکتری و ویروس نیستند بلکه ناشی از نقص در ژنوم میزبان آنهاست .چند شکلی DNA تنها در یک ژن منجر به شناخت مکانیسم ملکولی و کنترل ژنتیکی بسیاری از بیماریهای متابولیکی و ژنتیکی میگردد .همچنین سبب تشخیص افراد ناقل هتروزیگوسی میشود که از نظر فنوتیپی از افراد معمولی قابل تشخیص نیستند.(قره ریاضی، ۱۳۷۵)

ث- طرح ریزی ژنی: نشانگرهای ملکولی سبب تشخیص مستقیم ژن دلخواه بجای تولیدات آن ژن میگردد (Gibson, 1979).

ج- انتخاب به کمک نشانگر:

۱- پلی مورفسم در توالی رمز شونده: پلی مورفیسم DNA که درون یا اطراف توالی های ساختاری منظم از یک ژن با اهمیت فیزیولوژیکی رخ میدهد مستقیماً روی ظهور ژن اثر میگذارند پس بر تغییرات فنوتیپی در افراد و سلامتی و تولید آنها اثر دارد .این پلی مورفیسم DNA که در ژنها صورت میگیرد به عنوان نشانگرها معرفی میگردند (Abhijit Mitra *et al.*, 2002).

۲- پلی مورفیسم در توالی غیر رمز شونده: در این بررسی تغییراتی در توالی هایی کد نشده به صورت غیر مستقیم صورت میگیرد (Abhijit Mitra *et al.*, 2002).

۲-۱۲-۱-انواع نشانگرها

- **نشانگرهای مورفولوژیک**

نشانگرهای مورفولوژیک جز نخستین نشانگرها محسوب می شوند که به طور مستقیم در فنوتیپ موجود زنده قادر به تشخیص هستند، این نشانگرها دامنه وسیعی از ژن های کنترل کننده صفات فنوتیپی را در بر می گیرند، از جمله معایب این روش می توان به تحت تاثیر شرایط محیطی و مرحله رشد موجود قرار گرفتن، برخوردار بودن از فراوانی و تنوع کم، گاها مجبور به منتظر ظهور آنها ماندن جهت مشاهده وثبت آنها اشاره نمود(Morgan,1996).

- **نشانگرهای مولکولی**

با کشف انواع مختلف آنزیم های محدودکننده توسط اسمیت و ویکلوس در سال ۱۹۷۰ و کشف واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) توسط مولیس و فالونا در سال ۱۹۸۷ فرصت مناسبی برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات در سطح DNA امکانپذیر شد، علت استفاده عام از این نشانگرها را می توان به دلیل فراوانی فوق العاده این دسته از نشانگرها، عدم تاثیرپذیری آنها از شرایط محیطی خارجی و داخلی موجود، امکان به کارگیری آنها در مراحل نخستین رشد جنینی حیوانات، دقت و قابلیت مطلوب تفسیر نتایج، هم بارز بودن بسیاری از این نشانگرها، امکان استفاده از آنها در مورد گونه های منقرض شده، سهولت تشخیص افراد ناخالص از خالص، سهولت امتیازدهی و تجزیه وتحلیل نتایج و دسترسی به برنامه های رایانه ای قوی برای تجزیه و تحلیل و تفسیر سریع نتایج دانست (Hallerman, 2003)

نشانگرهای مولکولی خود شامل نشانگرهای پروتئینی و نشانگرهای DNA می باشند.

الف- نشانگرهای پروتئینی

در سال ۱۹۶۶ برای اولین بار بررسی گسترده ای درباره پلی مورفیسم پروتئین ها در جمعیت های مگس سرکه صورت گرفت، چنین نتیجه ای حاصل شد که بین ۲۰ الی ۵۰ درصد ژن های حاوی رمز پروتئین در یک موجود هستند. نشانگرهای پروتئین خود به دو دسته آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می شوند از معایب این نشانگرها می توان به محدود بودن آنها، تحت تاثیر قرار گرفتن تغییرات پس از ترجمه، تظاهر کم برخی از آنزیم ها و پروتئین ها تحت تاثیر مرحله رشد ، نیاز به مقدار زیاد نمونه تازه یا تازه فریزشده که نیازمند کشتن موجود زنده می باشد، پلی مورفیسم پائین این نشانگرها، محدود بودن روشهای رنگ آمیزی و سخت بودن آنالیز داده ها خصوصا در پلی پلو ئیدها اشاره کرد (Ferguson , 1995).

ب-نشانگرهای DNA

این نشانگرها می توانند توالی کوتاهی از DNA و یا توالی طولانی از آن باشند که جایگاه مخصوصی روی کروموزوم دارند و به صورت اختصاصی و یا غیر اختصاصی استفاده می شوند، این نشانگرها به صورت هم بارز[1] و غیر هم بارز[2] وجود دارند. انواع مختلفی از نشانگرهای DNA با تفاوت های زیادی از نظر روش تولید، نحوه

1 Dominate
2 Codominate

کاربرد، تجزیه، تحلیل و تفسیر نتایج و امتیازدهی وجود دارند، یکی از انواع این دسته از نشانگرها که بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد نشانگرهای ریزماهوار می باشند (Chistiakov, 2006).

- **نشانگرهای ریزماهواره**

ژنوم بیشتر ارگانیسم ها شامل سه دسته از توالی های تکراری DNA می باشند که بر اساس اندازه به سه دسته ماهواره ها، ماهوارک ها و ریزماهواره ها تقسیم میشوند.

واژه ریزماهواره در سال ۱۹۸۵ توسط Jeffery مطرح گردید، ریزماهواره ها کوچکترین توالی های تکراری می باشند. برخی محققین اندازه ریزماهواره ها را ۲ تا ۸ جفت باز برخی دیگر ۱ تا ۶ جفت باز برخی دیگر ۱ تا ۵ جفت باز و برخی نیز ۲ تا ۶ جفت باز عنوان نموده اند (Semagn *et al*., 2006) که در دو ناحیه کد شونده و غیر کد شونده وجود دارند و معمولا با درجه بالایی از پلی مورفیسم مشخص می شوند (Zane, 2002).

ریزماهواره ها به سه گروه عمده تکرارهای کامل (CACACACACACACACACACA)، تکرارهای ناکامل (معمولا توسط بازهای غیرتکرارشونده قطع می شوند) (CACATTCACACATTCATTCA) و تکرارهای مرکب (CACACACACAGAGAGAGAGA) تقسیم می شوند و ترکیب بین این سه گروه هم امکان پذیر است (Weber, 1990) تعداد تکرار در هر واحد بسیار متفاوت است، حداقل تعداد واحدهای تکرار شونده برای ریزماهواره های دو و سه نوکلئوتیدی به ترتیب ده و هفت بار تکرار تعیین شده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

ریزماهره ها یا ردیف های تکراری ساده (SSRs[3]) گروهی از ردیف های تکرار شونده اند که با نام های مختلف همچون تفاوت طول ردیف های ساده (SSLPs[4]) ردیف های کوتاه تکراری (STRs[5])، موتیف های با ردیف ساده (SSMs[6]) و نقاط ریزماهواره نشانمند از ردیف (STMs[7]) نیز خوانده می شوند.

نشانگرهای ریزماهواره این امکان را بوجود می آورند که الل های نمونه های مختلف به طور مستقیم مورد بررسی قرار بگیرند و به نتایج سایر گروه های تحقیقات ارتباط داده شوند. به دلیل همبارز بودن این نشانگر شناسایی و آنالیز الل ها آسان می باشد، . از آنجا که برای یک جایگاه که آغازگر ریزماهواره بر اساس آن

3 Simple Sequence Repeat
4 Simple Sequence Length Polymorphism
5 Short Tandem Repeats
6 Simple Sequence Motifs
7 Sequence Tagged Microsatellite sites

طراحی می شود، آلل های متعددی یافت می شود، از این نشانگرها می توان در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده نمود.(Jewell., 2006) این توالی های ساده تکراری در سراسر ارگانیسم های یوکاریوت پراکنده هستند و از سطح بالایی از پلی مورفیسم برخوردار می باشند و از قوانین وراثت مندلی و تکامل ظاهری ساده ای تبعیت می کنند. گرایش به استفاده از این نشانگرها در سالهای اخیر به طور قابل ملاحظه ای رو به افزایش می باشد به طوری که فقط در سال ۱۹۹۵-۲۰۰۰ بالغ بر ۸۰۰۰ ریزماهواره شناسایی و جدا شدند، البته این نشانگرها معایبی نیز دارند، عملیات شناسایی ریزماهواره ها، تعیین توالی بازی آنها، طراحی و ساخت آغازگرها مستلزم صرف وقت و هزینه فوق العاده است، کمبود تعداد ریزماهواره های شناخته شده در برخی موجودات باعث محدود کردن استفاده از آنها در مکان یابی ژن ها می باشد، این نشانگرها با ایجاد الل های صفر ایجاد تکثیر ضعیف می کنند و یا پس از تکثیر و تفکیک قابل روئیت نیستند. وجود جهش در توالی های مجاور ریزماهواره ها (Flanking) مانع از اتصال آغازگرها می شوند و در نتیجه در PCR هیچ فرآورده ای تولید نمی شود (Hansen, 2004)، باندهای متعددی در اثر لغزش DNA پلیمراز رخ می دهد که همچون سایه در اطراف باند اصلی قرار گرفته است و باعث ایجاد خطا در خواندن الل ها می شود، معمولا این باندها از وضوح کمتری نسبت به باندهای اصلی برخوردارند که اگر با فراورده های فرد هتروزیگوت همپوشانی داشته باشد آنگاه تشخیص این دو باند مشکل می شود (O'Reilly & Wright., 1995).

عوامل مؤثر بر پدید آمدن و توزیع ریزماهواره‌ها روی ژنوم موجودات به خوبی شناخته نشده‌اند ولی اخیراً دو فرضیه جهت بوجود آمدن این رده از DNA های تکراری ارایه شده است.

الف- الحاق و جایگزینی نوکلئوتیدها ، اساس این فرضیه بر جهش‌های نقطه‌ای الحاقی و جایگزینی استوار است. به دلیل اینکه جایگزینی‌ها خیلی متداول‌تر از الحاق‌ها هستند بنابراین گمان می‌رود که جایگزینی‌ها منبع اصلی ریزماهواره‌های دو بازی باشند. وقوع جهش‌هایی از نوع الحاقی نادرتر است ولی بیش از ۷۰ درصد جهش‌های الحاقی ۴-۲ بازی باعث مضاعف شدن توالی‌های مجاور نقطه جهش می‌شوند و بیش از نیمی از این‌ها مناطق جدید تکراری را بوجود می‌آورند. سهم جایگزینی ها در مکان‌های ژنی جدید تکراری بیشتر از الحاقی ها است ولی اهمیت نسبی آنها با افزایش تعداد تکرارها افزایش می‌یابد. به طوری که می‌توان گفت مراحل مضاعف شدن تکرارها، در بوجود آمدن ریزماهواره‌های با واحدهای بزرگتر، سهم بیشتری دارند (Goldestein, 1998).

ب- عناصر متحرک و بوجود آمدن ریزماهواره‌ها اساس این فرضیه بر تحرک رتروپوزون‌هایی است که هسته مرکزی آنها دارای توالی‌های پیش ریزماهواره است. از عمده‌ترین این عناصر متحرک می‌توان به عناصر mini-mi اشاره کرد .این عناصر به طور گسترده‌ای در تمام ژنوم‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند و تخمین زده شده است که حدود ۱/۲ درصد از ژنوم مگس سرکه را تشکیل می‌دهند. این مسئله نشان‌دهنده استعداد زیاد این عناصر به عنوان منبع ریزماهواره‌ها است. وجود توالی‌های معکوس در دو انتهای این عناصر و وجود یک ناحیه مضاعف شده در انتهای ۵ این عناصر باعث ایجاد یک ساختمان سنجاق‌سری می‌شود که بالقوه می‌تواند ساختار یک ریزماهواره را بوجودآورد (Goldsteine, 1998).

نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات رده‌بندی، بررسی تنوع ژنتیکی و ترکیب نقشه‌های لینکاژی گونه های مختلف (NakaoKubo, 2008) و بررسی تکامل موجودات کاربردهای فراوانی دارند(Varshney & Tuberosa, 2007) دستاوردهای مطالعات ژنتیک در دهه های گذشته در پاسخگویی به سؤالات اکولوژی بسیار سودمند وگسترده بودند. ریزماهواره‌ها به جهت دارا بودن پتانسیل تخمین مهاجرت، یکی از مهمترین نشانگرها به شمار می آیند، زیرا قدرت تفکیک برای تشخیص نسبت بالای خویشاوندی می باشند (Kimberly *et al.*, 2006) این نشانگرها بعلت تنوع پذیری بالایی که دارند بعنوان نشانگر مولکولی توانمند، کاربردهای فراوانی در مباحثی چون ژنتیک جمعیت ها، حفظ منابع طبیعی و مدیریت منابع بیولوژیکی را دارا می باشند(Zane, 2002) . این نشانگرها برای مطالعات ژنتیک جمعیت پیشرفته به منظور یافتن ساختار ژنتیک جمعیت، تست روابط نسبی و غیرنسبی و مطالعه تاریخچه جمعیت معرفی می شوند (Zhangh, 2000). نشانگرهای مولکولی ریزماهواره در حال تبدیل به ابزار مهمی برای محدوده وسیعی از کاربردها نظیر مطالعات نقشه ژنوم و بررسی تنوع ژنتیکی (Jewell, 2006) و بررسی پیوستگی نشانگرهای مولکولی با ژن های صفات اقتصادی بکار می روند(Galaev, 2006) .

۱۳-۱- سابقه مطالعات و تحقیقات انجام شده

۱-۱۳-۱- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

تحقیقات متعددی که با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ها صورت گرفته و اختلافاتی را در ساختار ژنتیکی گونه هایی از ماهیان که زیستگاههای متفاوتی داشته اند نشان داده است. این تحقیقات اختلاف مشخص در مورد

میزان تمایز ژنتیکی در جمعیت هایی از گونه های دریایی و آب شیرین نشان داده که بر اساس این مطالعات بطور کلی در گونه های دریایی، تمایز بین جمعیت ها کم ولی تنوع زیاد بوده است (Dewoody & Avis ,2000).

Kohlman و همکاران در سال ۲۰۰۳ تنوع و ساختار ژنتیکی کپور معمولی در نواحی از اروپا، آسیای مرکزی و آسیای شرقی/جنوب شرقی با نشانگر های ریزماهواره ای، آلوزایم ها و DNA میتوکندری مورد مطالعه قرار دادند. آنان با استفاده از آلوزایم ها ۲۳ جمعیت و با mtDNA ۲۱ جمعیت را شناسایی کردند. در این بررسی تغییر پذیری ریز ماهواره ها نسبت به آلوزایم ها بسیار بیشتر بود.

Alarcon و همکاران در سال ۲۰۰۴ به کمک نشانگر های آلوزایم، میتوکندری و ریزماهواره به مطالعه ی جمعیت های وحشی و پرورش ماهی سیم سرطلایی اروپا در آبهای آتلانتیک و مدیترانه پرداختند. آنها گزارش کردند که ریزماهواره ها بیشترین چندشکلی را در این جمعیت نشان دادند. همچنین یافته های آنها نشان داد نژادهای اهلی نسبت به انواع وحشی از تنوع ژنتیکی کمتری برخوردارند.

Skala و همکاران در سال ۲۰۰۴ با بهره گیری از ۱۲ نشانگر ریزماهواره به بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت ماهی آزاد وحشی و اهلی آتلانتیک در نروژ پرداختند. نتایج این مطالعات نشان داد تمامی نژادهای اهلی شده نسبت به نژاد وحشی از تنوع ژنتیکی کمتری برخوردار هستند.

Turner و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از ۸ نشانگر ریز ماهواره کپور ماهیان آمریکای شمالی را مورد مطالعه قرار دادند.

Jug و همکاران در سال ۲۰۰۵ توزیع جمعیت ماهی قزل آلای غیر بومی و ورود آن به جمعیت اسلوونی را با استفاده از ۵ نشانگر ریزماهواره ای مورد ارزیابی قرار دادند. آنها ۷۲ الل در این جایگاه گزارش نمودند و گزارش کردند که نتنها گونه ی قزل آلای مرمری در سوااحل اسلوونی در معرض انقراض قرار دارد بلکه ماهی قزل آلای قهوه ای دانوبی هم در معرض خطر قرار دارد. آنها نشانگرهای ریزماهواره ای را ابزار بسیار مناسبی برای ارزیابی ژنتیکی جمعیت و حفاظت از گونه های در معرض انقراض معرفی نمودند.

Mia و همکاران در سال ۲۰۰۵ هیبریداسیون بین گونه های چینی کپور نقره ای را در محل تخمریزی ماهیان مولد در بنگلادش با بکارگیری ۳ نشانگر ریزماهواره ای مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آنها روشن ساخت در

حالی که برخی از این ماهی ها هیبرید نسل اول می باشند بنظر میرسد بسیاری از آنها ژنوتیب پیچیده ای داشته و نسل چندم هیبرید باشند که این مسئله میتواند موجب افت تولید شیلاتی گردد.

Lucentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ پلی مورفیسمریزماهواره را در ده جمعیت اردک ماهی (*lucius Esox*) شمال ایتالیا و شرق اروپا در هفت لوکوس ریزماهواره انجام دادند. نتایج بررسی های جمعیت اردک ماهی شمال ایتالیا نشان داد که تفاوتهای فردی بین جمعیت ها وجود داشته که بر اثر فشارهای وارد شده توسط انسان با روش های ذخیره سازی بوجود می آید که باید در برنامه های مدیریتی و حفاظتی در آینده در نظر گرفته شود.

Vyskoilov و همکاران در سال ۲۰۰۷ به با استفاده از نشانگر ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی گاو ماهی (*Neogobius kessleri*) پرداخته و اختلاف مشخصی را نیز مشاهده نمودند.

Yoon و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه آنالیز میتوکندریایی و ریزماهواره ای جمعیت های (*Oncorhynchus keta*) تنوع ژنتیکی بالاتری را در روش ریزماهوارهی نسبت به روش DNA میتوکندریایی مشاهده و اعلام نمودند.

Li و همکاران در سال ۲۰۰۷ تنوع ژنتیکی موجود در کپور معمولی وحشی (*Cyprinus carpio*) را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار داد.

Yue و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی باس دریایی اقیانوس اطلس(*Lates calcarifer*) را در آسیا مورد مطالعه قرار داد.

Divu و همکاران در سال ۲۰۰۹ دو جمعیت متفاوت از میگو (*Macrobrachium rosenbergii*) را با استفاده از نشانگر ریزماهواره به عنوان یک نشانگر DNA در شمال هندوستان را اعلام داشتند.

Aung و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان کردند نشانگرهای ریزماهواره توانایی نشان دادن ساختار ژنتیکی جمعیتهای ذخایر وحشی و در اسارت *Cirrhinus cirrhosus* در مایانمار را دارا می باشند.

۲-۱۳-۱- مطالعات انجام شده در داخل کشور

خوش خلق و همکاران در سال ۱۳۸۶ با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره به بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی سواحل شمالی و جنوبی دریای خزر پرداختند و نتیجه این بررسی نشان دهنده تنوع بالای ژنتیکی در

این گونه به رغم فشار صید و کاهش ذخایر بوده است، همچنین اعلام داشتند تاسماهی روسی در بخش شمالی و جنوبی دریای خزر جمعیت مستقل را تشکیل می دهند.

صفری و همکاران در سال ۱۳۸۷ با استفاده از نشانگر ریزماهواره توانست ساختار جمعیت ماهی (Acipenser nudiventris) در سواحل جنوبی دریای خزر و اورال ارزیابی نماید

رضوانی گیل کلائی و همکاران در سال ۱۳۸۸ با استفاده ازروش مولکولی مایکروستلایت در بررسی ساختارجمعیت‌های ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) توانست سه جمعیت از این ماهی را در بندرعباس، بوشهر و چابهار مشاهده نماید.

کاوان و همکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در ایران و آذربایجان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره پرداختند و گزارش کردند که این ماهی از تنوع ژنتیکی کمی در این دو منطقه برخوردار است.

نوروزی (۱۳۸۸) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) با استفاده از روش میکروستلایت تعداد ۳۶۱ نمونه در کل و ۵۴–۱۸ نمونه در هر منطقه را نمونه برداری و با استفاده از پانزده جفت پرایمر مورد ارزیابی قرار داد.

پورغلام (۱۳۸۸) با استفاده ازروش مولکولی مایکروستلایت در بررسی تنوع ژنتیکی گاو ماهی سرگنده (*Neogobios gorlap*) را در حوزه جنوبی دریای خزر بدست آورد.

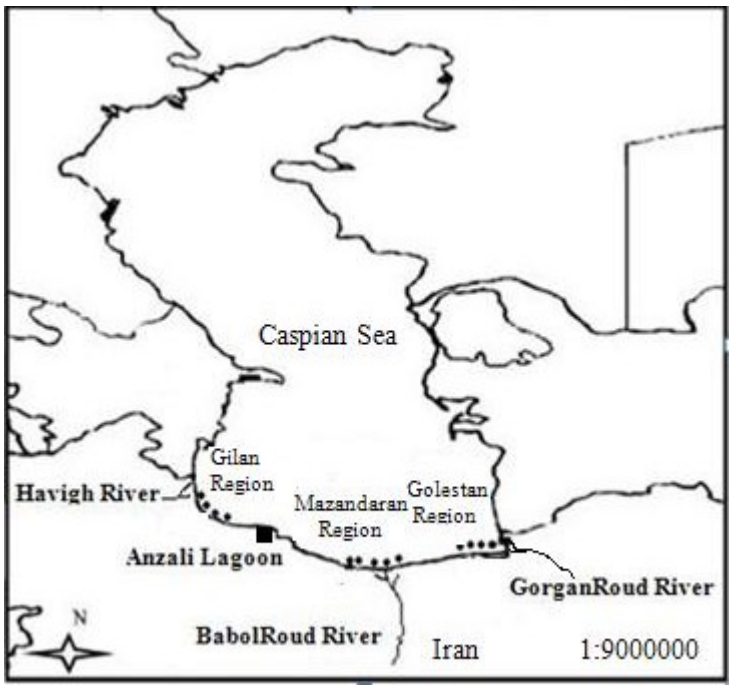
قریب خوانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سوف (*Sander lucioperca*) اقدام نمودند و سه جمعیت متفاوت از این گونه را در حوزه جنوبی دریای خزر گزارش کردند.

گلستانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی حلوا سفید (*Pampus argenteus*) در خلیج فارس و دریای عمان پرداختند که بیشترین تمایز ژنتیکی را بین ذخایر کویت و بوشهر و کمترین تمایز ژنتیکی را بین ذخایر چابهار و بوشهر و همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی را بین ذخایر خوزستان و چابهار و کمترین فاصله ژنتیکی را بین ذخایر بوشهر و چابهار بدست آوردند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه برداری

تعداد ۱۲۱ نمونه بوسیله صید پره از سواحل جنوبی دریای خزر شامل ۳۰ نمونه از رودخانه گرگانرود واقع در استان گلستان، ۳۰ نمونه از رودخانه بابلرود واقع در استان مازندران، ۱۸ نمونه از رودخانه حویق واقع در استان گیلان و ۴۳ نمونه از تالاب انزلی واقع در استان گیلان که در شکل ۳ نشان داده شده جمع آوری شد.



شکل۲-۱- دریای خزر و موقعیت مناطق نمونه برداری

۲ -۳ گرم از بافت باله پشی ۱۲۱ نمونه جمع آوری شده جدا و در تیوب های اپندرف ml۱,۵ حاوی اتانل ۷۶٪ نگهداری و جهت انجام مطالعات به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در شهر ساری منتقل شد.

در آزمایشگاه، DNA ژنومی نمونه ها از بافت باله پشتی با استفاده از روش فنل- کلروفرم (Hillis & Moritz, 1990) استخراج گردید که به شرح ذیل می باشد:

۲-۲- مواد مصرفی و تجهیزات

۲-۲-۱- مواد مصرفی مورد نیاز

فنل متعادل شده (pH=۷,۵-۸) ساخت کمپانی Merck، کلروفرم ساخت کمپانی Merck، اتانول مطلق و ۷۰ درصد ساخت کمپانی Merck، آنزیم پروتئیناز K (MBI Fermentas)، سر سمپلر (Treff)، میکروتیوپ ۱,۵، ۰,۵ و ۰,۲ میلی‌لیتری (Treff)، STE [1] تهیه شده از شرکت سیناژن، SDS [2] تهیه شده از شرکت سیناژن، ده جفت پرایمر اختصاصی کپورماهیان ساخت کمپانی MWG-Biotech، استات سدیم با pH=۵/۲ تهیه شده از شرکت سیناژن، آگارز، شاخص‌های وزنی DNA (50bp DNA Ladder و pBR322 DNA/AluI 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 =7.5)، آنزیم Taq DNA Polymerase (حاوی ۵ واحد Taq DNA Polymeraseدر هر میکرولیتر محلول) تهیه شده از شرکت سیناژن، آنزیم RNase، اتیدیم بروماید ساخت شرکت Sigma، بافر TBE[3] (pH=۸) تهیه شده از شرکت سیناژن، $MgCl_2$ تهیه شده از شرکت سیناژن با غلظت ۵۰ میلی مولار، بافر PCR (10X) (شامل KCl ۵۰۰ میلی مولار و Tris-HCl ۲۰۰ میلی مولار) تهیه شده از شرکت سیناژن، بافر سنگین کننده[4]، پلی‌آکریل‌آمید (آکریل‌آمید + بیس آکریل‌آمید) تهیه شده از شرکت سیناژن، نیترات نقره تهیه از شرکت سیناژن، فرمالدئید ساخت کمپانی Merck، پودر $NaBH_4$ تهیه شده از شرکت سیناژن، A.P.S[5] تهیه شده از شرکت سیناژن، TEMED ساخت کمپانی Merck، روغن معدنی PCR تهیه شده از شرکت سیناژن، نمونه باله سینه‌ای و باله پشتی ۱۲۱ عدد از ماهی های سیاه کولی از مناطق مختلف، آب مقطر استریل، دستکش یکبار مصرف.

۲-۲-۲- تجهیزات مورد استفاده

سمپلرهای متغیر ساخت کمپانی Eppendorf، دستگاه بن ماری، سانتریفوژ مدل Hettich با قدرت چرخش ۱۳۰۰۰rpm، دستگاه انکوباتور، الکتروفورز افقی مدل 7601-EPS شرکت پایا پژوهش، الکتروفورز عمودی مدل

[1] Sodium Chloride Tris EDTA
[2] Sodium Dodecyl Sulfate($C_{12}H_{15}O_4SNa$)
[3] Tris Boric acid EDTA
[4] Loading buffer(Bromophenol Blue)
[5] Ammonium Per Sulfate

VEU-7305 شرکت پایا پژوهش، دستگاه ترانس ایلومیناتور مدل DOC-008.XD ساخت کمپانی UVI، دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Bwacon 2000، دستگاه ترمو سایکلر
ساخت کمپانی Eppendorf و ورتکس.

۳-۲- استخراج DNA

برای استخراج DNA از باله حدود ۵۰ میلی‌گرم نمونه را جدا کرده پس از آنکه بوسیله کاغذ صافی کاملاً خشک گردید به لوله اپندرف (تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری) منتقل و باله ها با قیچی کاملا خورد شدند.

مراحل استخراج:

۱- برای هضم بافت مدنظر ، مخصوصا پروتئین در اپندورف ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE ، ۵۰ میلی لیتر SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۲۰٪ ، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید.

۲- اپندورف حاوی سوسپانسیون حاصله را برای فعال سازی آنزیم پروتئاز K روی شیکر پلیت به مدت ۳۰-۴۵دقیقه و سپس به مدت یک شبانه روز در دستگاه بن ماری با دمای ۵۵-۶۰ درجه سانتی گراد گذاشته شد.

۳- ۵۰۰ میکرولیتر فنول جهت دناتوره شدن پروتئین و حل چربیها اضا فه کرده و سپس اپندورف را در به مدت چند ثانیه در ورتکس لوله جهت اختلاط فازهای تشکیل شده در محلول تا تشکیل رنگ شیری مایل به زرد گذاشته شد.

۴- سپس در شیکر پلیت به مدت ساعت و نیم در دمای اتاق قرار داده شد.

۵- ۵ دقیقه در سانتریفوژ ۸۵۰۰ دور قرار داده تا ۳ فاز مجزا شامل DNA در فاز بالایی ، پروتئین در فاز میانی و فنول در فاز زیرین ایجاد شد. فاز بالا را با دقت و سرعت توسط نمونه بردار (Sampler) برداشته و به اپندورف ۱/۵ میلی لیتری جدید منتقل گردید.

۶- برای حذف بقایای فنل بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه نموده و دوباره مراحل شیکر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ ۸۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه و جداسازی فاز بالایی طبق مرحله قبل انجام شد.

۷- ۸۰۰ میکرولیتر الکل مطلق و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم به فاز بالایی اضافه شد، چند بار به آرامی اپندورف ها توسط دست سروته شده تا کلاف DNA تشکیل شد . سپس ۱۵ دقیقه سانترفوژ با دور ۸۵۰۰ صورت گرفت.

رسوب سفید رنگی که همان DNA است تشکیل شد .

الکل رویی دور ریخته شده بعد از خشک کردن به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، نمونه را با الکل ۷۰ درجه سانتیگراد شستشو داده به مدت ۲ دقیقه در سانتریفوژ ۸۵۰۰ دور قرار داده شد و سپس فاز رویی خالی شد، جهت خشک شدن و تبخیر الکل از رسوب DNA نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شدند.

۸- پس از خشک شدن، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شده و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا DNA به طور کامل در آب حل و سپس در فریزر 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

٤-۲- بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد

در درون تانک الکتروفورز افقی که حاوی بافر TBE می باشد، سینی مخصوص ژل گذاشته و سپس شانه را با فاصله یک میلی متری تا کف سینی روی آن قرار داده و دو طرف سینی توسط چسب نواری بسته شد. جهت تهیه ژل آگارز یک درصد، 0/1 گرم آگارز را به ۱۰ میلی لیتر بافر TBE در ارلن اضافه کرده و سوسپانسیون را روی شعله گذاشته و حرارت داده تا به شکل شفاف درآید. پس از سرد شدن ارلن در محیط آزمایشگاه، سوسپانسیون آن را در سینی ژل ریخته شده و اجازه داده تا بسته شود. سپس نوار اطراف سینی را برداشته و سینی ژل به آرامی درون تانک الکتروفورز قرار داده شد و شانه به آرامی خارج گردید. ۷ میکرولیتر DNA با ۱ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملا مخلوط شد و به هر یک از چاهک های ژل تزریق گردید. تانک الکتروفورژ به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق روی ۷۷ ولت تنظیم گردید. پس از این که بافر سنگین کننده به انتهای ژل نزدیک شد، جریان را قطع کرده و ژل از تانک خارج و به تانک حاوی اتیدیوم برماید جهت رنگ آمیزی منتقل شد. پس از گذشت ۵ دقیقه ژل از تانک اتیدیوم برماید به تانک حاوی آب مقطر به منظور شستشو به مدت ۱ دقیقه منتقل گردید. در انتها ژل درون دستگاه مستند سازی ژل ترانس ایلومیناتور گذاشته و کیفیت DNA از لحاظ خلوص، آلودگی فنلی، پروتئین و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت (Rezvani Gilkolaei, 1997).

۵-۲- آماده سازی آغازگرها

در این مطالعه از ۱۷ جفت آغازگر ریزماهواره ای اختصاصی خانواده کپورماهیان شامل آغازگر Rru-2

اختصاصی گونه ی *Rutilus rutilus*، آغازگر های Lid1 و Lid-11 اختصاصی گونه *Leuciscus idus*، آغازگرهای CA3, CA5, CA7 و CA9 اختصاصی گونه *Campostoma anomalum*، آغازگر MFW1 اختصاصی گونه *Coreius guichenoti*، آغازگرهای Lco1، Lco3، Lco4 و Lco5 اختصاصی گونه *Luxilus cornutus* و آغازگرهای Z21908، Z8145، Z3,4، Z7,8 و Z9,10 اختصاصی گونه *Danio rerio* در گونه *Vimba vimba persa* استفاده شد، که بر این اساس آغازگر مورد نیاز از شرکت سیناژن برای سنتز سفارش داده شد. آغازگرها 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 نگهداری شد.

٦-۲- تکثیر قطعه ژن هدف و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction) عبارت است از چرخه‌های مکرر حرارتی که در خلال آن، توالی خاصی از DNA که در بین دو آغازگر الیگونوکلئوتید (۳۰-۱۶ نوکلئوتیدی) محصور شده اند، تکثیر می‌شود. توالی این آغازگرها با یکدیگر متفاوت بوده و هر یک از آنها مکمل یکی از رشته‌های DNA الگو می‌باشد، در این واکنش هر چرخه حرارتی شامل مراحل ذیل است (White *et al*, 1989):

الف- واسرشته سازی Denaturation:

در این مرحله از درجه حرارت ^{oc}۹۵-۹۴ جهت باز شدن مارپیچ‌های DNA استفاده می‌شود تا سنتز DNA بتواند انجام شود.

ب- جفت شدن آغازگرها با توالی‌های مکمل خودشان در رشته الگو

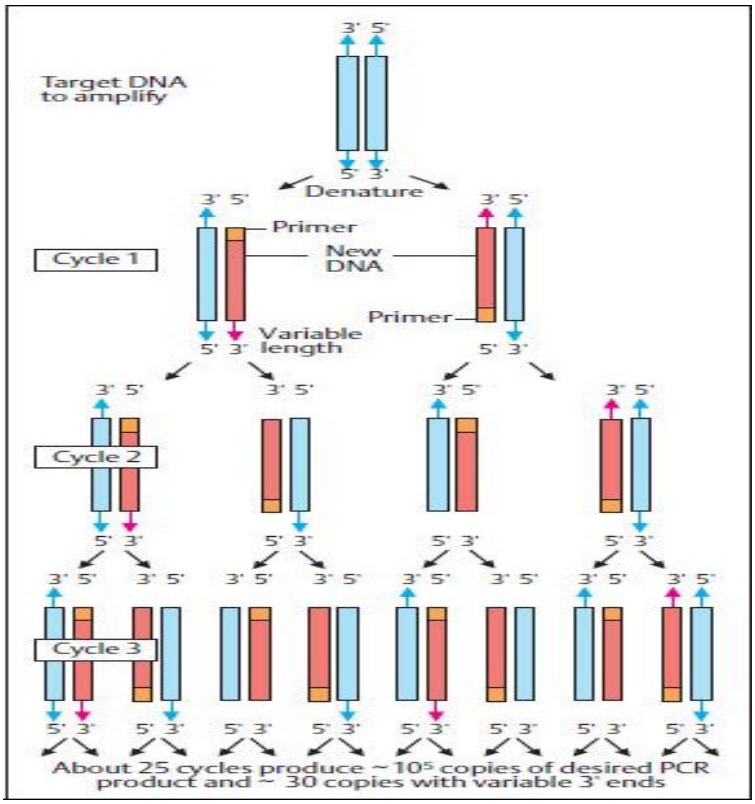
Annealing:

رشته‌های منفرد DNA چنانچه به آرامی سرد شوند مجدداً بهم متصل می‌شوند. این موضوع حتی پیش از ابداع PCR نیز شناخته شده بود و محققین مثل جولیس مارمو و پائول دوتی در سال ۱۹۶۰ نشان دادند که وقتی رشته‌های منفرد و مکمل DNA به مدت چند ساعت در شرایط پایین‌تر از دمای واسرشته سازی قرار گیرند (تقریباً ^{oc}۶۰) مجدداً بهم می‌چسبند. آنها ابراز داشتند که چنین جفت شدن‌هایی بصورت کاملاً اختصاصی انجام

می‌شود و فقط رشته‌هایی که از نظر ردیف بازی کاملاً مکمل یکدیگر باشند بهم متصل خواهند شد. در فرآیند PCR نیز هر آغازگر پس از واسرشته شدن DNA الگو به توالی مکمل خود می‌چسبد.

ج – توسعه Extension:

در اثر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از هر مولکول دو رشته‌ای DNA نسخه جدیدی بوجود می‌آید که در واقع همان ناحیه هدف است. هر یک از نسخه‌های جدید قادرند دوباره واسرشته شده و در چرخه دیگر از اتصال و تکثیر، رشته‌های مشابه خودشان را تولید نمایند. با تکرار این پدیده قطعه مورد نظر بصورت نمایی افزایش می یابد.انتهای قطعات تکثیر یافته که در واقع همان فرآورده‌های PCR هستند. در حال حاضر آغازگرها بیش از هر عامل دیگری، عامل موفقیت یا شکست در یک واکنش تکثیری هستند. معمولا چرخه های PCR ۲۵ تا ۴۰ بار تکرار می شوند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).



شکل ۲-۲- مراحل مختلف واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)

آغازگر(پرایمرها) عبارتند از دو زنجیره تک رشته‌ای کوتاه الیگونوکلئوتیدی[1] که طولی در حدود ۲۸-۱۸ نوکلئوتید دارند، الیگونوکلئوتیدها[1] مولکول های DNA دو رشته ای کوتاه هستند که هر کدام از آنها مکمل یک

1 Oligonucleotie

انتهای توالی DNA هدف می باشند . از آنجا که DNA دو رشته ای است دو نوع پرایمر در PCR مورد نیاز است . این دو پرایمر دو عمل انجام می دهند اول محل ژنی را که باید تکثیر شود را مشخص می نمایند و دوم اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند زمانیکه این دو شناساگر به دو ناحیه مختلف DNA و به سمت هم قرار می گیرند DNA پلی مراز تنها قطعات را در بین این دو ناحیه همانند سازی می کنند و به این ترتیب طول قطعات ساخته شده تعیین می شوند به عبارت دیگر یک زنجیره به عنوان آغازگر قطعه ژن مورد نظر و زنجیره دیگر به عنوان پایان‌گر قطعه ژن محسوب می شود. درجه اتصال ایده‌آل آغازگر باید بقدر کافی پایین باشد تا قادر به دورگه سازی (پهلوگیری) بین آغازگر و الگو باشد اما باید به قدر کافی بالا باشد تا از تشکیل اتصالات اشتباهی جلوگیری شود. (یزدی صمدی، ۱۳۸۰).

برای تکثیر ژن هدف و انجام واکنش ابتدا بافر و محلول های dNTP پس از خروج از فریزر در شرایط دمایی اتاق و در زیر هود لامینار قرار داده تا از حالت انجماد خارج شود سپس روی یخ، ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراجی، ۳۰ پیکومول از آغازگرها همراه ۱۰ میلی مولار dNTP ، ۵u/µ آنزیم Taq polymeras، ۲,۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR ، ۵۰ میلی مولار MgCl2 را داخل میکروتیوب های ۰,۲ که از قبل شماره نمونه روی آن ثبت شده را با هم مخلوط کرده و درانتها حجم آن را با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده و سپس تیوپ ها در دستگاه ترموسایکار (PCR) قرار داده شدند و مدت ۱,۵ ساعت برای تکمیل برنامه صرف گردید.

.برای بهینه کردن PCR در مرحله اول با دادن شیب حرارتی، بهترین دمای اتصال هر یک از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد. در مرحله بعدی جهت تظاهر بهتر باندها و حذف شکستگی، غلظت آغازگر، DNA ژنومی، $MgCl_2$و dNTPs بهینه سازی گردید. در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ تا ۸ درجه سانیگراد انتقال داده تا برای آزمایش‌های بعدی که شامل انتقال روی ژل آگارز ۲٪ برای سنجش وجود و کیفیت محصول PCR و پلی آکریل آمید که به منظور ایجاد باندهای مورد نظر می‌باشد در دسترس باشند.

جدول۱-۲- جایگاه، توالی، توالی تکرار، دمای اتصال و شماره دسترسی به بانک ژنی و رفرنس ۱۷ آغازگرهای استفاده شده

ردیف	جایگاه	توالی آغازگر	دمای اتصال	شماره بانک ژنی	رفرنس
1	CA3	GGACAGTGAGGGACGCAGAC TCTAGCCCCCAAATTTTACGG	52	AF277575	(Dimsoski *et al*. 2000)
۲	CA5	TTGAGTGGATGGTGCTTGTA GCATTGCCAAAAGTTACCTAA	-	AF277577	(Dimsoski *et al*. 2000)
۳	CA7	ACACGGGCTCAGAGCTAGTC CAAATGTCAGGAGTTCTCCGA	58	AF277579	(Dimsoski *et al*. 2000)
۴	CA9	ATCAAGCCTGCCATGCAC ATCACTGTAGACTGCGACCAG	-	AF277581	(Dimsoski *et al*. 2000)
۵	Lco1	CACGGGACAATTTGGATGTTTAT AGGGGGCAGCATACAAGAGACACTA	56	AY318777	(Turner *et al*. 2004)
۶	Lco3	GCAGGAGCGAAATCATAAAT AAACAGGCAGGACACAAA	62	AY318779	(Turner *et al*. 2004)
۷	Lco4	ATCAGGTCAGGG GTGTCACG TGTTTATTTGGGGTCTGTGT	-	AY318780	(Turner *et al*. 2004)
۸	Lco5	TTACACAGCCAAGACTATGT CAAGTGATTTTGCTTACTGC	59	AY318781	(Turner *et al*. 2004)
۹	Lid-11	CTCCTGATTCTTTGTCTGACT TTATTATTTCCTGTGGTGATTG	53	AB112736	(Barinova *et al*. 2004)
۱۰	Lid-1	TAAAACACATCCAGGCAGATT GGAGAGGTTACGAGAGGTGAG	53	AB112732	(Barinova *et al*. 2004)
۱۱	Rru-2	TTCCAGCTCAACTCTAAAGA GCACCATGCAGTAACAAT	54	AB112738	(Barinova *et al*. 2004)
۱۲	Z21908	CTCCTGATTCTTTGTCTGACT TTATTATTTCCTGTGGTGATTG	54	G40277	Shimoda *et al*., 1999
۱۳	Z3,4	TTTGACAAGTGAGTGTCCGC TAGGACCAGCTTCTGCCTGT		-	(Shimoda *et al*., 1999)
۱۴	Z8145	TTCCAGCTCAACTCTAAAGA GCACCATGCAGTAACAAT	55	G40625	(Shimoda *et al*., 1999)
۱۵	Z7,8	CTCCTGATTCTTTGTCTGACT TTATTATTTCCTGTGGTGATTG	56	-	(Shimoda *et al*., 1999)
۱۶	Z9,10	TTCCAGCTCAACTCTAAAGA GCACCATGCAGTAACAAT	64	-	(Shimoda *et al*., 1999)
۱۷	MFW1	GTCCAGACTGTCATCAGGAG CAGGTGTACACTGAGTCACGC	55	DQ377202	(Crooijmans *et al*. 1997)

۷-۲- الکتروفوز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و ژل پلی آکریل آمید 8 درصد

اساس الکتروفورز حرکت ذرات باردار در میدان الکتریکی می باشد. واژه Electro به معنای انرژی الکتریسیته و Phoresis از فعل یونانی Phoros به معنای انتقال از طریق می باشد. ترکیبات باردار با وارد شدن در محلولهای آبی به یونهای مثبت و منفی یونیزه می شوند و درصورتیکه مولکول ها دارای بار خالص باشند می‌توانند بطرف قطبین

حرکت نمایند. بیوماکرومولکولهای مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باردار هستند در نتیجه مانند یک الکترولیت یونیزه می شوند. حرکت ماکرومولکولهای زیستی در چنین سیستمی به میزان بار خالص آنها بستگی دارد که خود تابعی از pH محیط است. اگر توزیع بارها در مولکول متقارن باشد در طول یک گرادیان میدان و سرعتی که تابع بار الکتریکی، اندازه، شکل و وزن ماده است حرکت می‌کند. مولکولهای با بار و اندازه مختلف در میدان سرعت‌های متفاوتی پیدا کرده و به مناطقی تفکیک می شوند. این مناطق از هم فاصله گرفته و در یک زمان معین در طول میدان منظم می شوند که این اساس جداسازی به طریق الکتروفورز است. پارامترهایی که حرکت ماکرومولکولها را در ژل تحت تاثیر قرار می‌دهند شامل غلظت ژل، ترکیب بافری الکتروفورز، ساختار ماکرومولکول و ولتاژ دستگاه می باشد. از آنجائیکه تفکیک و جداسازی نمونه‌ها در یک محلول از طریق الکتروفورز مشکل است، سعی شده است از بسترهای مختلف بدین منظور استفاده شود. از بسترهای مهم می‌توان کاغذ صافی یا سلولز، ژل‌آکریل‌آمید، نشاسته و آگارز را نام برد که هر یک کاربرد اختصاصی خود را دارند (شاه حسینی، ۱۳۸۰).

سیستم ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE) برای آنالیز قطعات کوچکتر زنجیره DNA دو رشته‌ای و تک رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. آکریل‌آمید یک مونومر سنتتیک بوده که شدیداً نوروتوکسیک (Neurotoxic) می‌باشد. بسته به هدف از غلظت‌های متفاوت ژل استفاده می شود که معمولاً بین ۲۰-۳/۵٪ می باشد، غلظت ۳/۵w/v٪ قادر به تفکیک باندهایی به طول ۲۰۰۰-۱۰۰۰ جفت باز و غلظت ۲۰w/v٪ قادر به تفکیک باندهایی بطول ۱۰۰-۶ جفت باز می باشد. پلیمریزاسیون ژل با افزودن TEMED و آمونیوم پرسولفات در طول یک ساعت تکمیل شده و میزان پلیمره شدن ژل به فاکتورهای متعددی مثل درجه حرارت محیط و مقادیر آغازگر و کاتالیزورها بستگی دارد (Hildbrandt & Igarashi, 1999) .

آگارز یک پلی ساکارید است که از واحدهای تکرار شونده آرابینوزدی ساکارید تشکیل شده است. هنگامی که پودر آگارز در اثر حرارت در بافر خود توسط باندهای هیدروژنی بحالت ژل در می‌آید در واقع مولکولهای پلیمراز از حالت حلقوی نامنظم به شکل مولکولهای مارپیچی دوتایی درمی‌آیند. بسته به اندازه متفاوت ماکرومولکول از غلظتهای متفاوت آگارز استفاده می‌شود. غلظت استاندارد ۰/۸-۰/۷٪ قادر به تفکیک باندهای بطول ۵۰۰ kb-۱۵ می باشد. این سیستم قادر به ارزیابی قطعاتی با طول بیشتر از ۱۰Mb بوده و از فواید آن

استحکام و غیر سمی بودن می باشد (Hildebrandt & Igarashi, 1999).

جهت اطمینان از اینکه آیا آغازگر مورد استفاده توانسته باندی تولید کند یا خیر محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و اندازه قطعات حاصل از PCR با مقایسه با نشانگر DNA (pBR322 DNA/AluI Marker, 20, MBI Fermentas) روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد و با روش رنگ آمیزی نیترات نقره بدست آمد. از آنجایی که حساسیت ژل پلی‌آکریل‌آمید ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر ژل آگارز می‌باشد، در تحقیق حاضر از این ژل برای بررسی نتایج PCR استفاده گردید.

۱-۷-۲- مواد مورد استفاده جهت الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد

آب مقطر دوبار تقطیر، اکریل آمید ۳۰ درصد، TBE (10X)، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد، TEMED، بافر سنگین کننده و شناساگر pBR322 DNA/AluI Marker, 20, ساخت شرکت MBI Fermentase

۲-۷-۲- تجهیزات مورد استفاده جهت الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد

الکتروفورزعمودی و منبع تامین کننده جریان الکتریسته مدل VEU-7305 شرکت پایا پژوهش

۳-۷-۲- روش تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد

جهت تهیه ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد ابتدا ۹۲ میلی‌لیتر آب مقطر را با ۲۵/۲ میلی‌لیتر پلی‌اکریل‌آمید ۳۰ درصد و ۱۲ میلی‌لیتر بافر TBE (10X) در داخل بشر ریخته ، سپس ۱۰۲۸ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۱۳۴ میکرولیتر از محلول TEMED به مخلوط قبلی اضافه شده این ترکیب در فضای بین دو شیشه که از طرفین و قسمت زیری توسط نوار جداکننده (spacer) مسدود شده بود ریخته شد و شانه جهت تشکیل چاهک در قسمت بالایی در بین دو شیشه وارد 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 چاهک‌های ایجاد شده توسط محلول TBE (1X) (بافر الکترود)، نمونه‌های PCR را به همراه بافر سنگین کننده به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته، بعد از تزریق کلیه نمونه ها نوار جدا کننده از

پایین شیشه ها خارج شده 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 بود. زمانی که دستگاه به مولد برق با ولتاژ ۱۵۰ ولت وصل می‌گردد به مخزن بالا قطب مثبت و به مخزن پایین قطب منفی وصل می‌شود که باعث برقراری جریان از سمت مخزن بالا به سمت مخزن پایین و حرکت نمونه‌های لود شده در چاهک در این مسیر می‌شود و قطعات DNA تکثیر شده براساس وزن مولکولی خود در طول ژل از هم جدا شدند، الکتروفوز نمونه‌ها با ولتاژ ۱۵۰ وات به مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت نمایان شدن باندهای DNA از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید.

۸-۲- رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از نیترات نقره

جهت رنگ آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید سه نوع محلول بصورت زیر تهیه شدند:

۱- محلول A شامل بافر اسید استیک ۰,۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد می باشد میزان اتانول، اسید استیک و آب مقطر استفاده شده جهت تهیه این محلول به ترتیب ۸۰ میلی لیتر، ۴ میلی لیتر و ۷۲۰ میلی لیتر می باشد.

۲- محلول B شامل نیترات نقره ۰,۱ درصد به میزان ۰,۴ گرم و آب مقطر به میزان ۴۰۰ میلی گرم می باشد.

۳- محلول C شامل ۲,۶ میلی لیتر فرمالین۰,۱۵درصد، ۰,۰۶ گرم $NaBH_4$ ۰,۱ درصد، ۹ گرم NaOH ۹ درصد و ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد

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 می‌شود.

پس از اتمام زمان الکتروفورز ژل از صفحات شیشه‌ای با یک کاردک جدا و جهت رنگ آمیزی ابتدا دو بار 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 در پایان این مدت دو بار و هر بار بمدت ۴۵ ثانیه با آب مقطر شستشو داده و در نهایت تا زمانی که باندها بصورت نوارهای تیره رنگی دیده شوند در محلولC قرار داده شد. ژلهای رنگ آمیزی شده به درون پوشش پلاستیکی منتقل و جهت نگهداری پرس شدند.

با توجه به وجود یا عدم وجود جهش در محل‌های ویژه جایگاههای ریزماهواره ای، قطعات DNA با وزن

مولکولی متفاوت از محصول PCR تولید می‌گردد که تفاوت بین باندهای DNA و اختلاف در وزن مولکولی که منجر به تولید ژنوتیپ‌های مختلف می‌گردد با قرار دادن یک شناساگر (در این تحقیق مارکر pBR322 DNA/AluI Marker, 20,) در کنار نمونه‌ها قابل تخمین است و برای شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شوند. این شناساگرها چیزی نیستند جز ژنوم باکتری‌های خاص که توسط آنزیم‌های مختلف به قطعات متعدد با وزن مولکولی مشخص برش داده شده‌اند (Pourkazemi, 2001).

۹-۲- ثبت تصاویر

تصاویر ژل پلی آکریل آمید پس از رنگ آمیزی ابتدا توسط دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتور مدل DOC0080 XD ساخت کمپانی UVI همراه با برنامه نرم افزاری UVI DOC Version V.99.04 ثبت و ذخیره گردید.

۱۰-۲- سنجش وزن مولکولی محصول PCR و امتیازدهی باندها

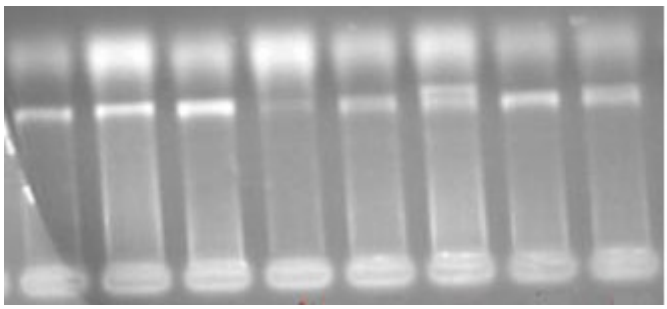
جهت سنجش وزن مولکولی باندهای محصول PCR و تعیین ژنوتیپ و اندازه الل ها، تصاویر گرفته شده از ژل پلی آکریل آمید پس از ثبت و ذخیره شدن، در نرم افزار UVI DOC Version V.99.04 مورد استفاده قرار گرفتند. مشاهده یک باند در هر ژنوتیپ به معنای هموزیگوسیتی و مشاهده دو باند به معنای هتروزیگوسیتی در نظر گرفته شدند.

۱۱-۲- آنالیز آماری

فراوانی آللی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثردر جایگاههای ریزماهواره ای، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس (Nei , 1972, 1978) ، تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس Chi-square ، مقادیر R_{ST} وF_{ST}، جریان ژنی و تست AMOVA (Analysis of Molecular Variance) در سطح احتمال ۰,۰۱ در نرم افزارGenAlex version V.6 محاسبه گردید (Peakall & Smouse, 2005).

۳- نتایج

زمانی که استخراج DNA از کیفیت خوبی برخوردار باشد، یک باند قوی و باریک روی ژل ایجاد می شود، میزان واضح بودن باندهای DNA روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی ها به روش فنول کلروفرم دارای کیفیت مناسبی برای استفاده در آزمایش های PCR بودند.



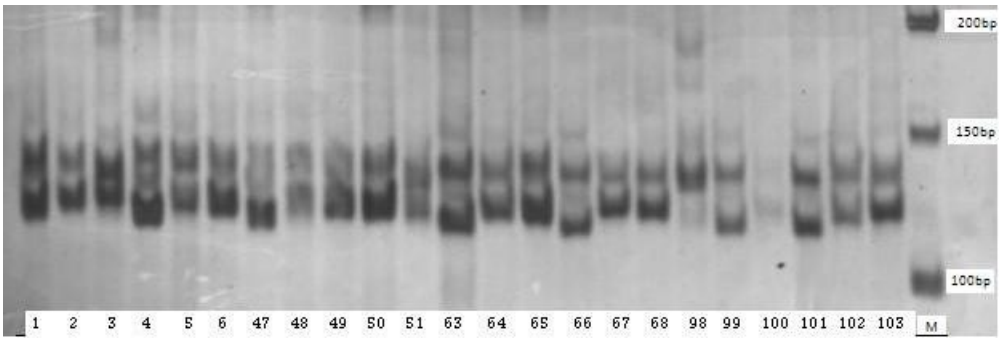
شکل ۱-۳- DNA استخراج شده به روش فنول کلروفرم روی ژل آگارز ۱٪

پس از الکتروفورز محصول PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شد که از ۱۷ جفت آغازگر اختصاصی ریزماهواره ای خانواده کپورماهیان، ۴ جفت آغازگر Z3,4، CA9، CA5 و Lco4 هیچ نوع باندی تولید نکرد اما بقیه آغازگرها توان تولید باند را داشته بودند. پس از الکتروفورز محصول PCR توسط ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد، ۱۰ جفت آغازگر باند های پلی مورف و ۳ جفت آغازگرLco5،Lid1 و MFW2 تولید باندهای مونومورف کرد ند (جدول۱-۳).

قطعات تکثیر شده در ده جایگاه ریزماهواره در PCR دامنه های متفاوت را نشان دادند. کوچکترین قطعه مربوط به جایگاه Z8145 با طول ۱۲۸-۹۲ جفت باز (bp) بود این آغازگر قطعات کوچک و سبک وزن را ایجاد نمود، بزرگترین قطعه نیز مربوط بود به جایگاه Lco3 با طول ۳۸۴-۳۰۸ جفت باز (bp) مشاهده شد (جدول۱-۳).

جدول۱-۳- اللها و اندازه آنها (جفت بازbp) در ده جایگاه پلی مورفیسم

جایگاه	دامنه الل(bp)	تعداد الل
CA3	210-320	16
CA7	148-216	12
Lco1	308-384	9
Lco3	250-292	6
Lid-11	240-296	11
Z21908	148-184	10
Z8145	92-128	4
Z7,8	116-152	10
Z9,10	116-156	10
Rru-2	148-220	13



شکل۲-۳- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی سیاه کولی با استفاده از آغازگر Z7,8 به همراه مارکر مولکولی ۵۰bp

تعداد اللهای مشاهده شده هر جفت آغازگر برای ۱۰ جایگاه ریزماهواره بین ۴ (جایگاهZ8145) تا ۱۶ (جایگاه Ca3) با میانگین ۷,۵۵ می باشد. از 302 الل مشاهده شده 243 الل با فراوانی $p<0.05$ در همه ی نمونه ها دیده شد که جایگاه Ca3 بیشترین تعداد الل ها (۳۵ الل) و جایگاه Z8145 کمترین تعداد الل ها (۱۱ الل) با فراوانی $p<0.05$ را نشان داد همچنین نمونه های رودخانه حویق کمترین فراوانی الل به میزان ۶۴ و نمونه های تالاب انزلی بیشترین فراوانی اللی به میزان ۸۹ بافراوانی با $p<0.05$ را نشان دادند.

در نمونه های منطقه تالاب انزلی حداکثر فراوانی اللی در جایگاه Z8145 با فراوانی ۰,۶۱۶ در الل شماره ۲ و به اندازه ۹۶ جفت باز دیده شد. نمونه تالاب انزلی دارای ۳ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰,۰۵ هستند که در سایر مناطق دیده نشده اند.

در نمونه های رودخانه حویق حداکثر فراوانی اللی در جایگاه Lco3 با فراوانی ۰,۶۵۰ در الل شماره ۳ و به اندازه ۲۶۴ جفت باز دیده شد. در این منطقه الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰,۰۵ وجود نداشته است.

در نمونه های رودخانه بابلرود حداکثر فراوانی اللی در جایگاه Z8145 با فراوانی ۰,۵۶۷ در الل شماره ۲ و به اندازه ۹۶ جفت باز دیده شد. نمونه رودخانه بابلرود دارای ۵ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰,۰۵هستند که در سایر مناطق دیده نشده اند.

در نمونه های رودخانه گرگانرود حداکثر فراوانی اللی در جایگاه Z8145 با فراوانی ۰,۵۶۷ در الل شماره ۲ و به اندازه ۹۶ جفت باز دیده شد. نمونه رودخانه گرگانرود دارای ۴ الل اختصاصی با فراوانی بیش از ۰,۰۵ هستند که در سایر مناطق دیده نشده اند.

همانطور که نتایج نشان می دهد نمونه های تالاب انزلی، رودخانه بابلرود و رودخانه گرگانرود حداکثر فراوانی را به طور مشترک در جایگاه Z8145 نشان دادند.

هتروزایگوسیتی مورد انتظار(He) و هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) جهت محاسبه تنوع ژنتیکی بترتیب با میانگین ۰,۷۷۲ و ۰,۸۰۵ بدست آمد که بیشترین میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده به میزان ۰,۸۲۷ در رودخانه گرگانرود و کمترین مقدار آن به میزان ۰,۷۷۷ در تالاب انزلی مشاهده شد. در هر ۴ منطقه میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده بیشتر از میزان هتروزایگوسیتی مورد انتظار میباشد.

جدول۳-۳- مقادیر،تعداد نمونه ها (N)، تعداد اللهای مشاهده شده (Na)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He) برای منطقه های نمونه برداری در ده جایگاه ریزماهواره

جمعیت	جایگاه	N	Na	Ho	He
تالاب انزلی	CA3	43	۱۶	۰.۷۶۷	۰,۹۱۱
	CA7	43	۸	۰.٤٦٥	۰,۷٦٦
	Lco1	43	۹	۰.٦۹۸	۰,۸٤٤
	Lco3	43	٤	۰.۷۹۱	۰,٦٦٦
	Lid11	43	۱۱	۰.۹۳۰	۰,۸٥۳
	Z21908	43	۹	۰.۹۷۷	۰,۸۲٥
	Z8145	43	۳	۰.۱٤۰	۰,٥۱۱
	Z7,8	43	۸	۱.۰۰۰	۰,۸۰٥
	Z9,10	43	۱۰	۱.۰۰۰	۰,۸۳٦
	Rru2	43	۱۱	۱.۰۰۰	۰,۸۸۲
رودخانه حویق	CA3	18	۱۲	۰.۷۷۸	۰.۸۹۰
	CA7	18	۷	۰.٦۱۱	۰.۸۳٦
	Lco1	18	٦	۰.۸۳۳	۰.۸٦٤
	Lco3	18	٤	۰.۷۲۲	۰.٥٥٤
	Lid11	18	٦	۱.۰۰۰	0.741
	Z21908	18	۷	۰.۸۳۳	۰.۷۱٦
	Z8145	18	۳	۰.۳۳۳	۰.٥٤۸
	Z7,8	18	٦	۱.۰۰۰	۰.۷۹۸
	Z9,10	18	۷	۱.۰۰۰	۰.۷۹۹
	Rru2	18	٦	۱.۰۰۰	۰.۷۲۱
رودخانه بابلرود	CA3	30	۸	۰.۸۰۰	۰.۸۱۹
	CA7	30	۹	۰.۷٦۷	۰.۸٦۱
	Lco1	30	۸	۰.٥۰۰	۰.۸٤۷
	Lco3	30	٦	۰.۸۳۳	۰.۷٦۲
	Lid11	30	۹	۱.۰۰۰	۰.۸٥۲
	Z21908	30	۷	۰.۹٦۷	۰.۷۹۷
	Z8145	30	۳	۰.۳۳۳	۰.٥٦٥
	Z7,8	30	٦	۱.۰۰۰	۰.۷۸٦
	Z9,10	30	٦	۱.۰۰۰	۰.۷۷۸
	Rru2	30	۹	۱.۰۰۰	۰.۸۸۱
رودخانه گرگانرود	CA3	30	۱۱	۰.۸٦۷	۰.۸۸۸
	CA7	30	۸	۰.۹۰۰	۰.۸٤۷
	Lco1	30	٥	۰.٤٦۷	۰.۷٤٦
	Lco3	30	٥	۰.۹۰۰	۰.٦۸۷
	Lid11	30	۸	۱.۰۰۰	۰.۸۱۸
	Z21908	30	۸	۰.۹۰۰	۰.۷٦۰
	Z8145	30	٤	۰.۱٦۷	۰.٥٤۲
	Z7,8	30	۹	۱.۰۰۰	۰.۷۸۲
	Z9,10	30	۹	۱.۰۰۰	۰.۸۲۲
	Rru2	30	۱۱	۱.۰۰۰	۰.۸۸۸
میانگین			۷,٥٥	۰.۸۰٤	۰.۷۷٥

بر اساس نتایج آزمون مربع کای یا χ^2 خروج از تعادل هاردی-واینبرگ در همه ی جایگاه ها ($p\leq0.01$) بجز جایگاه Lco3 در منطقه تالاب انزلی، رودخانه حویق و رودخانه بابلرود و جایگاه Ca7 در رودخانه گرگانرود مشاهده شد.

جدول٤-٣- بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در ده جایگاه ریزماهواره پلی‌مورفیک برحسب مناطق مختلف نمونه‌برداری در ماهی سیاه کولی

منطقه	عوامل تعادل χ^2	Ca3	Ca7	Lco1	Lco3	Lid11	Z21908	Z8145	Z78	Z910	Rru2
تالاب انزلی	درجه آزادی	120	28	36	6	55	36	3	28	45	55
	آزمون مربع کای	171	68	93	11	79	124	35	70	78	157
	احتمال	0.001	0.000	0.07	0.016	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
	معنی دار بودن	**	***	***	ns	*	***	***	***	**	***
رودخانه حویق	درجه آزادی	66	21	15	6	15	21	3	15	21	15
	آزمون مربع کای	175	64	58	11	126	57	31	70	48	41
	احتمال	0.000	0.000	0.000	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000	0.01	0.000
	معنی دار بودن	***	***	***	ns	***	***	***	***	***	***
رودخانه بابلرود	درجه آزادی	28	36	28	15	36	21	3	15	15	36
	آزمون مربع کای	41	72	131	16	75	39	22	44	38	52
	احتمال	0.048	0.000	0.000	0.36	0.000	0.009	0.000	0.000	0.001	0.037
	معنی دار بودن	*	***	***	ns	***	***	***	***	***	*
رودخانه گرگانرود	درجه آزادی	45	20	10	10	15	28	6	28	28	55
	آزمون مربع کای	63	25	96	18	59	66	24	69	65	122
	احتمال	0.037	0.222	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	معنی دار بودن	**	ns	***	*	***	***	***	***	***	***

*** اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۰.۱ درصد ($P<0.001$) بسیار معنی دار است. ** اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۱ درصد ($P<0.01$) معنی دار است. * اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد ($P<0.05$) معنی دار است. Ns اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد ($P<0.05$) غیر معنی دار است.

بیشترین مقدار F*st* بر اساس تست AMOVA بین نمونه های رودخانه ی حویق و رودخانه بابلرود به میزان 0.082 که دارای کمترین جریان ژنی ($Nm=2.455$) و کمترین مقدار آن بین نمونه های تالاب انزلی و رودخانه گرگانرود به میزان 0.023 که دارای بیشترین جریان ژنی ($Nm=10.69$) بودند محاسبه گردید همچنین محاسبه F*st*

بر اساس فراوانی نیز نشان میدهد که حداکثر آن بین رودخانه حویق و رودخانه بابلرود 0.054 و حداقل آن بین نمونه های تالاب انزلی و رودخانه گرگانرود ۰.۰۱۸ می باشد.

حداکثر R*st* بر اساس تست AMOVA با احتمال ۹۹ درصد بین نمونه های رودخانه حویق و رودخانه بابلرود به میزان ۰.۳۹۶ و حداقل آن بین نمونه های تالاب انزلی و رودخانه گرگانرود به میزان ۰۸۵ .۰بدست آمد.

جدول۵-۳- میزان F*st* و R*st* محاسبه شده بر حسب AMOVA (p≤0.01) برای مناطق نمونه برداری در ده جایگاه ریزماهواره.اعداد داخل پرانتز مقادیر جریان ژنی هستند، اعداد نوشته شده در بالای ماتریکس میزان F*st* بر اساس AMOVA و اعداد زیر آن میزان F*st* بر اساس فراوانی است.

	***F*st(Nm)**				
	نمونه	**تالاب انزلی**	**رودخانه حویق**	**رودخانه بابلرود**	**رودخانه گرگانرود**
R*st*	تالاب انزلی		0.052(4.52) 0.033	0.038(6. 25) 0.026	0.023(10.69) 0.018
	رودخانه حویق	0.12		0.082(2.81) 0.054	0.065(3.601) 0.041
	رودخانه بابلرود	0.17	0.39		0.069(3.355) 0.042
	رودخانه گرگانرود	0.085	0.087	0.364	

با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei، بیشترین فاصله ژنتیکی 0.442 و کمترین شباهت ژنتیکی 0.656 در بین نمونه های رودخانه حویق و رودخانه بابلرود محاسبه گردید.

جدول ٦-۳- میزان فاصله و شباهت ژنتیکی (Nei, 1972, 1978) برای منطقه های نمونه برداری در ده جایگاه ریزماهواره اعداد نوشته شده در بالای ماتریکس میزان فاصله ژنتیکی و اعداد نوشته شده در پایین ماتریکس میزان شباهت ژنتیکی را نشان می دهد

فاصله ژنتیکی					
	نمونه	تالاب انزلی	رودخانه حویق	رودخانه بابلرود	رودخانه گرگانرود
شباهت ژنتیکی	تالاب انزلی		0.78	0.79	0.85
	رودخانه حویق	0.24		0.61	0.74
	رودخانه بابلرود	0.23	0.48		0.66
	رودخانه گرگانرود	0.14	0.30	0.40	

٤-بحث

بررسی ساختار ژنتیکی سیاه کولی (*Vimba vimba persa*) به عنوان یک گونه در معرض خطر انقراض در سواحل جنوبی دریای خزر(Jolodar & Abdoli., 2004) ضروری می باشد که به نظر می رسد با کاهش چشمگیر ذخایر آن خطر از دست دادن کامل ذخایر ژنتیکی آن را به دنبال داشته باشد.

ریزماهواره ها در مناطق پهلوگیری بسیار حفاظت شده هستند آنها را می توان در گونه هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند استفاده کرد (نوروزی، ۱۳۸۸)، به طور مثال ۱۴-۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره اختصاصی از گونه ی *Scaphirhynchus platorynchus* روی گونه ی *Acipenser sinenis* استفاده شد که ۱۰ جفت آغازگر پلی مورفیسم بالا را نشان دادند (Shao *et al*., 2002)، و liu و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از ۴۵جفت آغازگر اختصاصی کپور معمولی، ۶ آغازگر با پلی مورفیسم بالا را در کپور علف خوار بدست آوردند، در این مطالعه با توجه به اینکه آغازگرهای اختصاصی ریزماهواره ای (*Vimba vimba persa*) در پایگاه ژنی (GenBank) در دسترس نبود جهت بررسی ساختار ژنتیکی این گونه آغازگرهای اختصاصی کپور ماهیان مورد استفاده قرار گرفت، که از ۱۷ جفت آغازگر غیر اختصاصی استفاده شده ۱۰ جفت آغازگر پلی مورفیسم و ۳ جفت مونومورفیسم را درگونه سیاه کولی نشان دادند که با توجه به نتایج حاصله روی ماهی سیاه کولی می توان اظهار داشت که آغازگر های غیر اختصاصی این گونه توانایی شناسایی مناطق مشابه و شروع رونویسی را دارا بودند.

بر اساس نتایج بدست آمده تعداد الل های مشاهده شده در ۱۲۱ نمونه ماهی جمع آوری شده از مناطق مورد مطالعه،بین ۳ تا ۱۶ الل با میانگین ۷.۵۵ بوده است، بنا به گزارش Wang و همکاران در سال ۲۰۰۶ تعداد الل های بدست آمده جهت بررسی ساختار ژنتیکی ماهی در هر جایگاه ریزماهواره ای باید شامل ۲ تا ۱۰ الل باشد که البته این میزان به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه ها می باشد (Ruzzante, 1998., Peakal & Smous, 2005).

Skaala و همکاران در سال ۲۰۰۴ رنج اللی بدست آمده از ۷ الل در گونه پرورشی را ۱۶ تا ۲۱ الل در گونه وحشی (*Salmo salar*) با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره داشتند که علت کاهش فراوانی الل های گونه پرورشی نسبت به گونه وحشی را به دلیل وجود اثر موسس، رانش ژنتیکی در بین نسل ها و یا آمیزش خویشاوندی و تنگنای ژنتیکی را دلیل بر کاهش میزان هتروزایگوسیتی دانستند. همچنین Liu و همکاران در سال

۲۰۰۹ میانگین تعداد الل های بدست آمده در ۱۰ جایگاه ریزماهواره ای را در ماهی کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idella*) 12.1 الل در هر جایگاه شناسایی کردند .

Li و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ حداکثر تعداد الل بدست آمده از ماهی کپور معمولی (*Cyprinuc carpio*) ۱۳ الل و حداقل آن را ۳ الل با میانگین ۷ الل در هر جایگاه ریزماهواره را بدست آوردند.

در ماهی سیاه کولی میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰.۸۰۵) بیشتر از هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰.۷۷۵) بوده که این نتیجه مشابه نتیجه Lind و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در گونه (*Pinctada maxima*) می باشد، ایشان مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده را ۰.۷۹ و میزان هتروزایگوسیتی قابل انتظار را ۰.۷۵ بدست آوردند، همچنین خوش خلق و همکارانش در سال ۱۳۸۵ در بررسی تاس ماهی ایرانی نیز میزان بالاتری از هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰.۸۴) را نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار بدست آورد که حصول چنین نتیجه ای را می توان به دلیل وجود تنوع ژنتیکی بالا در گونه مورد مطالعه دانست.

Beacham و همکارانش در سال ۲۰۰۴، Innocentiis و همکارانش در سال ۲۰۰۵، Pourkazemi در سال ۲۰۰۶، قریب خوانی و همکارانش در سال ۱۳۸۸ و پورغلام و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به ترتیب در گونه های *Oncorhynchus nerka*، *Sparrus auratus*، *Hoso hoso*، *Sandeer luciopeca* و *Neugobius gorlap* میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده را کمتر از میزان هتروزایگوسیتی مورد انتظار بدست آوردند که علت این کاهش تنگناهای ژنتیکی می باشد که احتمالا بر اثر شرایط زیست محیطی، تخریب زیستگاههای طبیعی، آمیزش های خویشاوندی بوجود می آید و در نتیجه با گذشت زماه موجب کاهش الل و کاهش هتروزایگوسیتی در ذخایر می شود (Norris *et al., 1999*).

با توجه به این که میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho=0.805) در ماهی سیاه کولی به میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho=0.68) در بیشتر ماهیان آنادروموس که توسط DeWoody و Avis در سال ۲۰۰۰ گزارش شده بسیار نزدیک است می توان اظهار داشت با توجه به اینکه تا به حال تکثیر مصنوعی و رهاسازی جهت بازسازی ذخایر روی این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر از سوی سازمان شیلات ایران صورت نگرفته است و در نتیجه آمیزش خویشاوندی در بین این گونه از درصد پایینی برخوردار است از این رو با توجه به اطلاعات به

دست آمده می توان ادعا کرد که در گذشته این گونه دارای تنوع ژنتیکی بالایی بوده که علی رغم کاهش شدید ذخایر آن توانسته است این تنوع را در حد اقل تمایز بین جمعیتها حفظ نماید .

نتیجه مشابه را می توان در گزارشات Yue و همکاران در سال 2009 و همچنین Liu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشاهده کردند، که بترتیب با محاسبه Ho=0.78 در گونه (*Lates calcarifer*) بسیار نزدیک است به مقادیر اعلام شده برای ماهیان آب شور (Ho=0.79) و Ho=0.72 در گونه (*Ctenopharyngodonidella*) بیشتر از مقادیر اعلام شده برای ماهیان آنادروموس (Ho=0.68) مشاهده کردند. (DeWoody & Avis, 20002). Kavan و همکاران در سال ۲۰۰۹ میزان پایین تری از Ho و فراوانی الل در ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* نسبت به گزارش DeWoody و Avis در سال ۲۰۰۰ بیان کرد و دلیل چنین رخدادی را از بین رفتن مکان های طبیعی تخمریزی و تکثیر مصنوعی و رهاسازی این گونه توسط سازمان شیلات دانست.

در بررسی حاضر خروج از تعادل هاردی- واینبرگ در بیشتر جایگاه ها مشاهده شد (جدول۴-۱)، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را می توان به دلیل حظور الل های صفر که پهلوگیری در آنها صورت نمی پذیرد (Callen., 1993; McQuown *et al.*, 2003; Skalla *et al.*,; Li *et al.*, 2004; Dahle *et al.*, 2006; Welsh *et l.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2007; Nyingi *et al.*, 2009)، وجود آمیزش های خویشاوندی در بین گونه (Zhao *et al.*, 2005)، پهلوگیری تعداد محدودی از الل ها، ناکافی بودن تعداد نمونه ها و خطای نمونه برداری نسبت داد (Dahle *et al.*, 2006)، در این مطالعه خروج از تعادل را می توان به دلیل استفاده از آغازگرهای غیر اختصاصی ، تعداد کم نمونه ها و خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت ها را ذکر نمود.

Shaklee و همکاران در سال ۱۹۹۴ همچنین Thorpe و همکاران در سال ۱۹۹۴ فاصله ژنتیکی برای جمعیتهای هم گونه به طور میانگین (0.002-0.07) برای گونه های هم جنس به طور میانگین (0.03-0.61) اعلام داشتند. فاصله ژنتیکی به دست آمده در رنج گونه های هم جنس می باشد.

وجود یک تمایز ژنتیکی معنی دار ما را در اندازه گیری اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت کمک می کند و فاکتور Fst نشان دهنده وجود تمایز در بین جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می باشد، با توجه به گزارش Wright در سال ۱۹۷۸ هرگاه میزان Fst بدست آمده کمتر از 0.05 باشد نشان دهنده وجود تمایز کمی در بین جمعیت ها می باشد اگرچه حتی مقدار کم Fst نیز می تواند بازگو کننده اختلاف ژنتیکی مهمی در

بین جمعیت ها باشد (Balloux & Lugon-Moulin, 2002)، البته اثر پلی مورفیسم نیز میزان Fst را کاهش می دهد (Balloux *et al.*, 2002)، هرگاه مقدار آن بین ۰.۰۵ تا ۰.۱۵ باشد نشان دهنده تمایز متوسط و مقدار بالای ۰.۱۵نشان دهند ه تمایز بالاست. وجود رنج های متفاوت Fst در بین جمعیت ها را می توان بیشتر به دلیل وجود جریان ژنی (Nm)، تاثیر رانش ژنی و جدایی جغرافیایی دانست (Li, 2007). در مطالعه حاضر Fst از رنج متوسط (۰.۰۵۴) و معنی دار($p<0.05$) برخوردار بوده و نشان دهنده ی آن است که چهار جمعیت مجزا از ذخایر گونه سیاه کولی در چهار منطقه مورد مطالعه وجود دارد. بیشترین مقدار Fst بدست آمده بر اساس فراوانی و تست AMOVA بین نمونه های رودخانه حویق و رودخانه بابلرود و کمترین مقدار آن بین دو منطقه تالاب انزلی و رودخانه گرگانرود ($Fst=0.18$) دیده شده است، این درحالیستکه از لحاظ جغرافیایی فاصله بین منطقه تالاب انزلی و گرگانرود بیشتر از فاصله بین رودخانه بابلرود و رودخانه حویق می باشد، تمایز ژنتیکی کم در ماهی سفید بین رودخانه های سفیدرود و تجن با وجود فاصله جغرافیایی زیاد مشاهده شد (رضوانی گیل کلائی و همکاران، ۱۳۸۹) که حصول چنین نتایجی را میتوان به جریانات آبی موجود و یا نحوه ی مهاجرت ماهی ها نسبت داد، و همچنین می توان بیان کرد که احتمالا رودخانه گرگانرود از نظر زاد و والد سیاه کولی نقش خودش را از دست داده است و آنچه مشاهده می کنیم ماهیان مهاجری هستند که جهت تغذیه از سایر مناطق خصوصا تالاب انزلی به این منطقه وارد می شوند.

میانگین جریان ژنی بین جمعیت های سیاه کولی 6.45 بوده، بر اساس گزارش Li در سال ۲۰۰۷ هرگاه $Nm>1$ باشد جریان ژنی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است و هرگاه $Nm<1$ باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می شود از این رو نتایج حاضر نشان دهنده این است که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت ها جریان ژنی بوده است.

۵- نتیجه گیری نهایی

به عنوان نتیجه گیری نهایی می توان عنوان کرد که ماهی سیاه کولی بخش جنوبی دریای خزر از لحاظ ژنتیکی یک جمعیت واحد را تشکیل نمی دهند، با وجود اینکه این ماهی جز گونه در خطر انقراض است اما از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بوده است، نتایج نشان دهنده ی آن است که در حوزه ی جنوبی دریای خزر چهار جمعیت متفاوت از این گونه زندگی می کنند همچنین ریزماهواره ها ثابت کرده اند که نشانگرهای مناسبی برای بررسی ساختارژنتیکی هستند.

پیشنهادها

- آغازگرهای اختصاصی گونه سیاه کولی طراحی شود
- در مطالعاتی که در آینده روی ژنتیک جمعیت انجام میشود از تعداد نمونه و پرایمر بیشتری استفاده گردد.
- گونه شاه کولی به عنوان گونه نزدیک به گونه مورد مطالعه حاضر نیز مشابه گونه سیاه کولی با روش های مولکولی مورد بررسی قرار گیرد.
- بچه ماهی هر رودخانه از مولدین مهاجر به همان رودخانه تولید گردند و رهاسازی شوند.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات ازمایشگاهی و اتحادیه سراسری تکثیر و پرورش آبزیان به خاطر تامین منابع مالی اجرای این پروژه تقدیر و تشکر می شود.

منابع

۱. هالرمن، الف. ۱۳۸۴. اصول و روش های مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول و دوم)، ترجمه ایرج هاشم زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر. تهران.

۲. امینی، ف. ۱۳۷۴. مبانی ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان. انتشارات وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی. ۳۴۴ص.

۳. بزرگی پور، ر.، ۱۳۷۳. مارکرهای مولکولی DNA در اصلاح نباتات. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۲۲. ص ۴۰

۴. بهمنی، م.، ۱۳۷۴. بررسی آلودگی در اکوسیستم های آبی و اثرات آن با نگرشی بر تالاب انزلی. مووسه تحقیقات شیلات ایران. گزارش ۱۳۷۴.

۵. پورغلام، ح. ۱۳۸۸. بررسی جمعیت گاو ماهی سر گنده(*Neogobios gorlap*)درحوضه جنوبی دریای خزر با استفادهازروش ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد لاهیجان. دانشکده منابع طبیعی. رشته شیلات. ۱۲۳.

۶. رضوانی گیل کلائی، س.، سالاری، م. ع.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح. و سید محمدباقر نبوی. ۱۳۸۸. بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* با استفاده از نشانگر ریزماهواره. مجله علمی شیلات ایران، سال۱۸. ۳: ۶۱-۶۹.

۷. رضوانی گیل کلائی، س.، عبدالحی، ح.، شجائی، ل.، صفری، ر.، لالوئی، ف.، تقوی، م. ج .، ۱۳۸۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از روش ریزماهواره. اولین همایش ملی-منطقه ای اکولوژی دریای خزر. ص۱۷

۸. سالنامه آماری ایران (۱۳۷۹-۱۳۸۷). ۱۳۸۸. معاونت دفتر برنامه و بودجه- گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی. سازمان شیلات ایران

۹. شاه حسینی، محمدحسن و سید رضای تهرانی، سیدمحسن. ۱۳۸۰. واکنش زنجیره ای پلیمراز، انتشارات پارسیران. ۱۸۴ صفحه.

۱۰. صفری، م. ۱۳۸۷. بررسی ساختارجمعیت ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش مایکروساتلایت. مجله علوم کشاورزی ومنابع طبیعی ش۱. ۱۱ص.

۱۱. عصفوری، ر.، ۱۳۷۶. مارکرهای ژنتیکی در 10 نژاد از گوسفندان بومی ایران .مجله پژوهش و سازندگی . ش 34 . 156ص

۱۲. عسگری، ر.، ۱۳۸۴. مروری بر ماهی شناسی سیستماتیک. انتشارات نقش مهر. ۲۶۶ ص.

۱۳. قره ریاضی، ب.، ۱۳۷۶. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات- چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲-۲۶ص

۱۴. کازنچف، آ. ن.، ۱۹۸۱. ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن. ترجمه مهندس ابوالقاسم شریعتی، انتشارات شرکت سهامی شیلات ایران. (۱۳۷۱). ۱۷۱ص.

۱۵. مرادخانی، ع. ۱۳۷۳. تعیین بیوتکنیک تکثیر ماهی سیاه کولی(*Vimba vimba persa*) و پرورش آن تا حد رها سازی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. گروه آموزشی علوم زیستی. رشته شیلات. ۹۷ص.

۱۶. نقوی، م.، قره یاضی، ب.، حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

۱۷. یزدی صمدی، ب و ولیزاده، م. ۱۳۸۰. ژنتیک از دیدگاه مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۴۲ ص.

۱۸. عباسی، ک.، ۱۳۸۴. شناسایی و بررسی پراکنش ماهیان رودخانه حویق استان گیلان. مجله زیست شناسی ایران. جلد۱۸. شماره۴. ۳۷۰-۳۸۲ص.

۱۹. مساعدی و محمدی،1381 . بررسی نحوه تغییرات زمانی و مکانی بارندگی دربخشی از حوزه آبخیز گرگانرود. .مجموعه مقالات نخستین کنفرانس دانشجویی منابع آب و خاک

۲۰. نجاتی جوادی، م. ۱۳۸۸. بررسی مقایسه ای برخی خصوصیات ریخت شناسی، زیستی و شمارشی ماهی سیاه کولی در سواحل جنوبی دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی شیلات. دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران

۲۱. وثوقی، غ.، مستجیر، ب. ۱۳۸۳. ماهیان آب شیرین.انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ص.

22. Abhijit Mitra .B.R. yadare. nazir .A. Ganai &.C.R. Balakrishnan 2002. Molecular Markers & their application in livestook improvement.
23. Aladin, N., & Plotikov, I., 2004. The Caspian Sea. Lake Basin management initiative. Thematic paper. 29p.
24. Alarcon, A. magoulas, t. Georgakopoulos,Zouras, M.C. Alavarez, S., 2004. Genetic comparison of wild & cultivate population of the githead sea bream (soarus auratus) Aquacalture 230:65-80.
25. Aliah, RS., Takagi, M., Dong, S., Teoh, CT., Taniguchi, N., 1999. Isolation & inheritance of microsatellite markers in the common carp (Cyprinus carpio). Fisheries Sci, 65: 235−239.
26. Aubrey, D.G., Glushko, T.A., Ivanov, V.A. et al., 1994. North Caspian Basin: Environmental status & oil & gas operational issues, Report for Mobil-oil, 650 pages.
27. Aung, O., Nguyen, T. T. T., Poompunang, S., Kamonrat, W., 2010. Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks & wild populations of mrigal, Cirrhinus cirrhosus in Myanmar. Aquaculture 299 (2010) 37–43.
28. Balloux, F. and Lugon-Moulin, N., 2002. The estimate of genetic differentiation with microsatellite markers. Mol. Ecol. 11, 155-165.
29. Abbasi, K., Keyvan, A., and Ahmadi, M.R. 2004. Morphometric and Meristic characteristics of
30. *Vimba vimba persa* in Sefidrud River. Iranian Fisheries Scientific Journal 13(1): 61-76.
31. Barinova A, Yadrenkina E, Nakajima M, Taniguchi N (2004). Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in ide *Leuciscus idus and* Siberian roach *Rutilus rutilus*.
32. Molecular Ecology Notes, 4, 86–88.
33. Beacham, T.D., Pollard, S., Le, K.D., 200۹. Microsatellite DNA population structure & stock identification of steelhead trout (Oncorhynchus mykiss) in the Nass & Skeena rivers in Northern British Columbia. Mar. Biotechnol. 2, 587–602.
34. Beacham, T.d., Mcintosh, m. & Macconnachie., 2004. Population tructer of lake-type & river-type sockeye Salmon in transboundary rivers of Northern british Colombia. Journal of fish biology. 65, 389-402.
35. Beardmore, J.A.; Mair, G. C. & Lewis, R.I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture. Res. 28, 829-839.
36. Berg, L.S. 1949. Freshwater fishes of the U.S.S.R. & adjacent countries. Trady institute Acad,U.S.S.R. (Translated to English in 1962). 2: 469p.
37. Callen, DF., Thompson, AD., Shen, Y., Philips, HA., Richards, RI., Mulley, JC., Sutherl&, GR., 1993. Incisence & origin of 'null' alleles in the (AC)n microsatellite markers. Am J Hum Genet, 1993, 52:922-927.
38. CEP, 1998. National reports of the Caspian Sea countries (Azerbaijan, Iran, Kazakhstan,
39. Russian Federation, Turkmenistan), Caspian Environment Programme.
40. Chauhan, T., Lia, KK., Mohindra, V., Singh, RK., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Sharma, PC., Lakra, WS., 2007. Evaluating genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp, Cirrhinus mrigala (Hamilton–Buchanan, 1882):Evidence from allozyme & microsatellite markers. Aquaculture, 269: 135–149.
41. Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, CS., Law, A.S., Tsigenopoulos, CS., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A & Volkaert, F.A., 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. Genetic. 170, 1821-1826
42. Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M., 2006. Microsatellites & their genomic distribution, evolution, function & applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture 255, 1–29
43. Ciftci, y & Okumus., 2002. Fish Population Genetics & Applications of Molecular Markers to Fisheries & Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. Turkish Journal of Fisheries & Aquatic Science, 2: 145-155
44. Coad , B .W. 1995 . The fresh water fishes of Iran . Academy of science of the Czech Republic Brno. Pp 64.
45. Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van der Poel JJ, Groenen MAM (1997). Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal Genetics, 28, 129–134.
46. Berg, L.S. 1949. Fresh water fishes of the U.S.S.R & adjacent countries. Trady institute Acad, U.S.S.R.(Translated to English in 1962) . vol 2,469p.
47. Dahle, G.; Jorstad, K. E.; Rusaas, H. E. & Ottera, H., 2006. Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morha*) populations. ICES Journal of Marine Science. 63, 209-215.
48. Dewoody J.A.D &Avis J.C. 2000. Microsatellite & anadromus fishes compared with other animals, fish biology.55:461-473.

49. Dimsoski P, Toth GP, Bagley MJ (2000). Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). Molecular Ecology, 9, 2187–2189.
50. Divu, D., Khushiramani, R., Malathi, S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2009. Isolation, characterization & evaluation of microsatellite DNA markers in giant
51. freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii, from South India. Journal of Aquaculture 284, 281–284.
52. Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. & Hynes, R.A., 1995. The application of molecular markers to the study & conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Journal of Fish Biology, 47: 103-126.
53. Galaev A. V., L. T. babayants & Yu. M. Sivolap. (2006). DNA-markers for Resistance to Common Bunt Transferred from Aegilops cylindrica Host. to Hexaploid Wheat. *Czech J. Genet. Plant Breed., 42*, , 62-65.
54. Ghaninezhad, D., Abdolmaleki, S., and Fazli, H. 2000. Stock assessments of Teleost fishes in Caspian Sea (1999-2000). Iranian Fisheries Research and Training Organization, 90 p.
55. Gharibkhani, M., Pourkazemi, M., Soltani, M., Rezvani Gilkolaei, S., Azizzadeh, L., 2009. Population genetic structure of Pikeperch (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) in the southwest Caspian Sea using Microsatellite Markers. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 4(3)161-168.
56. Gibson.j.p.1979.international livestooks research in statute p.o.box 30709.Nairobi Kenya. Strategies for utilising Molecular Marker data for livestook genetic improvement developing world. Marker Assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant & animal breeding? Session II: MAS animals
57. Goldstein, D.B., Schlotterer, C., 1999. Microsatellites: Evolution & Applications.
58. Oxford University Press, Oxford
59. Goldstein, D. a. (1998). Microsatellite : Evolution & Application . Oxfod university press. Gupta, P. K. (2002). Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theor. Appl. Genet. , 105:413-422.
60. Golestani, N. Rezvani Gilkolaei, S. Safari, R. Reyhani, S. 2010. Population genetic structure of the Silver Pomfret, Pampus argenteus, in the Persian Gulf and The sea of Oman a revealed by microsatellite variation. Zoology in the middle east, 49: 63-72.
61. Innocentiis, S., Miggiano, E., Ungaro, A., Livis, S., Sola, L. and Crosetti, D., 2005. Geographical region of individual breeders from gilthead sea breem (*Sparus auratus*) hatchery broodstock inferred by microsatellite profiles. Aquaculture. 247, 227-232.
62. Kavan, L.S., Gilkolaei, S.R., Vosoughi, G., Fatemi, S.M.R., Safari, R., Jamili, S. 2009. Population genetic study of Rutilus frisii kutum frome the Caspian sea.Iran and Azerbayjan region using microsatellite marker.jornal fisheries and aquatic science 4:316-322.
63. Kohlman, K., Gross, R., Murakaeva, A., Skersten, P.,2003.Genetic variability & structure of common carp population chroghout the distribution rauge infeverd from allozyme,microsttelite & mtDNA markers,Aquaculture living Resources 16:421-431
64. Koshkholgh, M.R., Pourkazemi, M., Kamali, A. Rezvani Gilkolaei, S.2008. Investigation on genetic structure of Russian sturgeon (*Acipenser guldenstaedtii*) populations of the North (Volga river) and South Caspian Sea(Coast of Iran and Turkemenistan) using microsatellite technique. Iranian Scientific Fisheries Journal .16(4):69-80. (In Persian)
65. Hallerman, E. M., 2003. Population genetics principles & application for fishreis scientists
66. Hansen, M., 2004. Application of molecular markers in population & conservation Genetic eith special emphesise of fishes. DSc thesesis, 100pp. Submitted to the factualty of Natural Science, University of Arhus.
67. Hartle, D. L. 1988. A primer of population genrtics, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderl&, Massachusetts.
68. Hillis, D. M., moritz, C.,1990. Molecular taxonomy, SINAUER Sunderl&,Masschusetts.U.S.A.120p
69. Hildbrandt, F. & Igarashi, P. 1999. Techniques in molecular medicine. Springer Lab Manual.
70. Jewell E., A. R. (2006). SSRPrimer & SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery. Nucleic Acids Research. Vol. 34. Web Server issue , 656-659.
71. Jolodar, M.N., Abdoli, A. 2004. Fish species atlas of South Caspian Basin (Iranian waters). Iranian Fisheries Research Organization.
72. Jug, T.; Berrebi, P. & Snoj, A., 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia & their introgression with native trout population as observed through microsatellite DNA analysis. Biological Conservation. 123, 381-388.
73. Kavan, L.S., Gilkolaei, S.R., Vosoughi, G., Fatemi, S.M.R., Safari, R., Jamili, S. 2009. Population genetic study of Rutilus frisii kutum frome the Caspian sea.Iran & Azerbayjan region using microsatellite marker.jornal fisheries & aquatic science 4:316-322.
74. Kiabi, B.H., Abdoli, A., & Naderi, M. 1999. Status of the fish fauna in the south Caspian basin of Iran. Journal of Zoology in the Middle East 18: 57-65.

75. King, T. L; Kalinowski, S. T; Schill, W. B; Spidle, A. P & Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies & their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1–37.
76. Kimberly A. Selkoe & Robert J. Toonen. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using & evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters. 9* , 615–629.
77. Kuliev, Z.M. 1988. Morphometric & ecological characteristics of Caspian vimba, *Vimba, vimba persa*. J. Ichthyol. 28(2):56-54.
78. Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies & their applications in aquaculture genetics. Jornal of Aquaculture 238, 1–37.
79. Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, Z., Liang, L., 2007. Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (Cyprinus carpio L.) Populations. Genetics & Genomics, 34: 984-993.
80. Li, L., Ximing, G., Guofan, Z. 2009. Inheritance of 15 microsatellites in the Pacific oyster *Crassotrea gigas*: segregation and null allele identification for linkage analysis. Chinese Journal of Oceanograghy and Limnology. 27(1): 74-79.
81. Liu, F., Xia,JH., Bia, ZY., Fu, JJ., Li, JA., Yue, JH., 2009. High genetic diversity & substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. Aquaculture 297, 51–56.
82. Lind, C.E., Evas, B.S., Knaver, J., Taylor, J.J.V., Jerry, D.R., 2009. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture Journal 286 , 12–19
83. Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Natali, L., Panara, F., 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L.). Fisheries Research 80 (2006) 251–262
84. McQuown, E.; Krueger, C. C.; Kincaid, H. L.; Gall, G. A. E. & May, B., 2003. Genetic compairson of Lake Sturgeon population: differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite Loci. Journal of great Lakes Research. 29, 3-13.
85. Mia, M.Y., Taggart, J.B., Gilmour, A.E, Das. T.K., 2005.detection of hybridization between Chinese carp species Hypopthalmichthys molitrix & Aristichthys nobilis in hatchery brood stock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. Aquaculture 247:267-273.
86. Meng, X. H., Wang, Q. Y., Jang, I. K., Liu, P., Kong, J., 2009. Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis based on microsatellite DNA. Aquaculture 287 (2009) 46–51
87. Morgan, T., 1961. R&om segregation versus coupling in Mendelian inhhertance. Scince 34,384.
88. Nei, M., 1972. Genetic distance between population. American Naturalist. 106, 283-292.
89. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity & genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
90. Neigel, J.E. 1997. A compairson of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. Annual Review of Ecology & Systematics, 28: 105-128.
91. Nikoliskii,G.V., 1954. Special Ichthyology. Moskova. Gorudarstvennoe izdatlstov, sovetskaya naaka.Translated to English. 538 P.
92. Norris, A. T.; Bradley. D. G. & Cunning ham, E. D.; 1999. Microsatellite genetic variation between & with in farmed & wild Atlantic salmon populations. Department of Genetics, Trinity College Dublin, Irel&. 247-264.
93. Noroozi, M. 2008. Aplication of microsatellite markers to study the genetic structure of stellate sturgeon population in the south Caspian sea. Iranian jornal of fisheries Science.8:73-84.
94. Nyingi, D., Vos, L. D., Amna, R., Agnese, J. F., 2009. Genetic characterization of an unknown & endangered native population of the Nile tilapia Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Loboi Swamp (Kenya). Aquaculture 297, 57–63.
95. O'Reilly, P., Wright, J. M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. Jornal of Fish biology. 47 (suplementA)29-55.
96. Park, L.K. & Moran, P. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. G.R. Carvalho & T.J. Pitcher (Eds.), Molecular Genetics in Fisheries. London: Chapman & Hall.
97. Peakall, M., Smouse, A., 2005. Gene Alex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching & research. The Australian national university, Canberra, Australia. & Fishery Management. Washington: University of Washington: 193-224.
98. Pourkazemi, M., Skibinski, D. O., Beardmore. J. A. 2001. A Preliminary Study On Phylogenetic Relationship between Five Sturgeon Species in The Iranian Coastline of Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2(1)1-12

99. R´abov´a, M., R´ab, P., Ozouf-Costaz, C., Ene, C., & Wanzeb?ck, J., 2003. Comparative cytogenetics & chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the fish genus Vimba (Cyprinidae). Gournal of Genetica 118: 83–91.
100. Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Cook, D., 1999. A review of the evidence for genetic structure of cod (Gadus morhua) populations in the NW Atlantic & population afinities of larval cod off Newfoundl& & the Gulf of St. Lawrence. Journal of Fisheries Research 43, 79±97.
101. Shaklee J.B.,Tamaru C.S. & Waples R.S. 1982 Speciation & evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science 36, 141-157
102. Salini, J.P., Milton, D.A., Rahaman, M.J., Hussein, M.G., 2004. Allozyme & morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, hilsa Tenualosa ilisha. Fish. Res. 66,53–69.
103. Semagn, k. Bj?rnstad, A. & Ndjiondjop M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology Vol. 5 (25) pp.* , 2540-2568.
104. Skalla, A. Hbyheim, B., Glover, K., Dahle, D., 2004,microsatteletie analysis in domesticated & wild Atlantic Salmon .Aquaculture 240:131-1430.
105. Shao, ZJ., Zhao, N., Zhu, B., Zhou, FL., Chang, JG., 2002. Application of microsatellite primers developed from shovelnose sturgeon in Chinese sturgeon . Acta Hydrobiologyca Siniea, 26:577-584.
106. Silva, E.P., Russo, C.A.M., 2000. Techniques & statistical data analysis
107. in molecular population genetics. Hydrobiologia 420, 119–135.
108. Shimoda, N., Knapik, E.W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., Sauvage, F.D., Jacob, H and Fishman, M.c., 1999. Zebrafish Genetic map with 2000 Microsatellite Markers. GENOMIC Journal: 58, 218-232
109. Thorpe J.P. & Sol-Cave A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics.Zoologica Scripta 23, 3-18.
110. Turner, F., Dowling, T.E., Broughton, R.E & gold, J.R., 2004.Variable microsattelite marker amplify across divergent lineages of Cyprinidae fishes.Conservation Genetic ,5:279-281.
111. Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics & fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology, 39: 1-20.
112. Varshney, R.K. & R. Tuberosa. (2007). Genomics-Assisted Crop Improvement:Vol. 1: Genomics Approaches & Platforms. Springer.
113. Vladimir Mamaev, Woods Hole Group.,2002, The Caspian Sea, Europe's biodiversity- biogeographical regions & seas.
114. Vyskoilov , M.; Ondrackova,M. & sinkova, A.; 2007. Isolation & characterization of microsatellites in Neogobius kessleri(Perciformes, Gobiidae) & cross-species amplification within the family Gobiidae. Molecular Ecology Notes. Vol.7, pp.701-704.
115. Waldman, J. R., 1999. The importance of the comparative studies in stock analysis. Fisheries Reasherch. 43, 237-246
116. Wang X.L, Ou J.T, Huang L.G, Guo CH, Zhong J.C, Li X.C, Wang F, Zhe X.L , 2006. Genetic diversitu in the Wazhishan pig from Hainan based on microsatellite loci biodiversity science, 20-26.
117. Ward, R.D., Appleyard, S.A., Daley, R.K., Reilly, A., 2001. Population structure of pink ling (Genypterus blacodes) from south-eastern Australian waters, inferred from allozyme & microsatellite analyses. Mar. Freshw. Res. 52, 965–973.
118. Weber, J. L.,1990. Informativeness of human (dC-Ad)n (dG-dT)n polymorphysms, Genomics. 7,524-530.
119. Wei, DW., Lou, YD., Sun, XW., Shen, JB., 2001. Isolation of microsatellite
120. markers in the common carp (Cyprinus carpio). Zool Res Journal 22: 238−241
121. Weir, B. S; Hillis, D. M; Moritz, C & Mable, B. K. (1996). Intraspecific differentiation. Olecular Systematics, 2nd edition. Massachusetts: Sinauer
122. Associates: 385-406.
123. Welsh, J., McClell&, M. 1990. Finger printing genomic using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 12:7212-7213
124. Winfield, I. J., Nelson, J. S. 1991. Cyprinid fishes systematics. Biology & Exploition. Chapman & Hall. 667p.
125. White, T.J., Arnheim, N., Erlich, H.A., 1989. The polymerase chain reaction. Trends Genet. 5:185–189
126. Wright, S. 1978. Evolution & the Genetics of Populations Variability Within & Among Natural Populations. University of Chicago Press, , vol 4.
127. Ying-Chun, Q., Xiao-Wen, S., Li-Qun, L., 2006. Genetic Polymorphism of Microsatellite DNA in Two Populations of Northern Sheatfish (Silurus soldatovi). Acta Genetica Sinica, 33:908–916.

128. Yue, GH., Zhu, ZY., Lo, LC., Wang, CM., Lin, G., Feng, F., Pang, HY., Li, J., Gong, P., Liu, HM., Tan, J., Chou, R., Lim, H., Orban, L., 2009. Genetic variation & population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region. Aquaculture 293, 22–28.
129. Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhu, B., Brosse, S., Chang, J. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon(Acipenser sinensis Gray)genetic variability. J. Appl. Ichthyo. 21. 7-13
130. Zane, L., Borgelloni,L & Patariollo,T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology.11 , 1-16.
131. Zhangh De-Xing & Godfry M.H. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations:practice, problems & prospects. *Molecular Ecology.12* , 563-584.
132. www.Wikipedia.com

Abstract:
Population genetic structure of Vimba vimba persa was investigated using microsatellite markers from 4 regions along the Iranian coastline of Southern the Caspian Sea (Anzali lagoon & havigh River in Gilan province, BabolRoud River in Maz&eran province & GorganRoud River in Golestan province). Genomic DNA from 121 specimens was extracted from fin tissue by phenol-Chlorophorm method & PCR reaction was accomplished with 17 microsatellite primers, out of 17 microsatellite primers 14 loci were amplified, in which 10 of them were amplified with reasonable polymorphism & 4 were monomorphism. Totally 302 alleles were identified on average 7.5 Observed & expected heterozygosity averages were 0.80 & 0.77 respectively. Most cases significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p \leq 0.01$). The estimation of Fst ($p \leq 0.01$) revealed significant population structuring & estimate four population of Vimba vimba persa is identified in the Caspian Sea. These studies were to apply & develop population genetic approaches to assist conservation, sustainable harvest & restocking of these populations.
Keywords: *Vimba vimba persa*, Population genetic, Microsatellite, Caspian Sea, Iran.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Title : Genetic characterization of *Vimba vimba persa* in southern part of the Caspian Sea using microsatellite marker
Apprpved Number: 4-12-12-89029
Author: Sohrab Rezvani Gilkolaei
Executor *:* Sohrab Rezvani Gilkolaei
Collaborator *:* S.Mohamadian, M.J.Taghavi, F. Laloei, M. Nayerani, D. Kor, H. Taleshian
Advisor(s):-
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 2010
Period of execution :1 Year
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : 20
Date of publishing : ***2011***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Ecology Research Institute of the Caspian Sea

Title:

Genetic characterization of *Vimba vimba persa* in southern part of the Caspian Sea using microsatellite marker

Executor :

Sohrab Rezvani Gilkolaei

Registration Number

2010.1131