وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

بررسی تنوع ژنتیکی و تشکیل کتابخانه ژنی ذخایر ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) از آبهای مدیترانه ،اقیانوس آرام و دریای عمان به روشهای مولکولی

مجری :
سهراب رضوانی گیل کلایی

شماره ثبت
٤٢٣٥٣

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان پروژه : بررسی تنوع ژنتیکی و تشکیل کتابخانه ژنی ذخایر ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) از آبهای مدیترانه ،اقیانوس آرام و دریای عمان به روشهای مولکولی

شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۹۷-۱۲-۷۷-۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سهراب رضوانی گیل کلایی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سهراب رضوانی گیل کلایی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : احمد غرقی ،رقیه صفری ، حسن قدیرنژاد، احمد حامی طبری،عبداقیوم شافعی، تیمور امینی راد، وحید عرفانی مقدم، رحیم دربانی ، سید امین میرهاشمی رستمی، فرامرز لالویی ،آذین فهیم

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : محمد پورکاظمی

محل اجرا : استان گلستان

تاریخ شروع : ۸۹/۷/۱

مدت اجرا : ۱ سال و ۶ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۲

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی تنوع ژنتیکی و تشکیل کتابخانه ژنی ذخایر ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) از آبهای مدیترانه ،اقیانوس آرام و دریای عمان به روشهای مولکولی

کد مصوب : ۸۹۱۹۷-۱۲-۷۷-۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۲۳۵۳ تاریخ : ۹۱/۱۱/۱۸

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

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۱/۹/۲۶ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹/۲ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مشاور رئیس موسسه در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۲
۱- مقدمه ۳
۱-۱-کلیات ۶
۱-۲- کفال ماهیان ۶
۱-۲-۱- مشخصات کلی کفال ماهیان ۶
۱-۲-۲- ارزش اقتصادی کفال ماهیان ۷
۱-۲-۳-کفال ماهیان خلیج فارس ۸
۱-۳-کفال ماهیان دریای خزر ۱۳
۱-۳-۱- میزان صید کفال ماهیان در دریای خزر ۱۵
۱-۴- ویژگی های گونه ***Liza saliens*** ۱۹
۱-۴- ۱- رده بندی ۱۹
۱-۴-۲- ریخت شناسی گونه ۱۹
۱-۴-۳- بیولوژی ۲۱
۱-۴-۴- توزیع جهانی ۲۵
۱-۴-۵- توزیع جنس در دریای خزر ۲۵
۱-۵- تنوع ژنتیکی ۲۶
۱-۵-۱- مفهوم تنوع ژنتیکی ۲۶
۱-۶- نشانگرهای ژنتیکی ۲۶
۱-۶-۱- انواع نشانگرها ۲۶
۱-۶-۲- گرایشات در استفاده از مارکرها ۳۳
۱-۶-۳- کاربرد مارکرهای **DNA** در ژنتیک آبزیان ۳۵
۱-۷- **DNA** میتوکندریایی(**mtDNA**) ۳۶
۱-۷-۱- **DNA** میتو کندریائی ومطالعات سیستماتیک مولکولی ۳۶
۱-۷-۲- مزایای استفاده از **mtDNA** ۳۷
۱-۸- واکنش زنجیره ای پلیمراز (**Polymerase Chain Reaction**) ۳۸

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۱-۸-۱- مکانیسم PCR ۳۸
۱-۹- مروری بر مطالعات انجام شده ۴۱
۱-۹-۱- مطالعات انجام شده در مورد کفال ماهیان ۴۱
۱-۹-۲- مطالعات انجام شده در ایران و خارج از کشور برروی سایر ماهیان ۴۲
۲- مواد و روش کار ۴۵
۲-۱- نمونه برداری برای مطالعه جمعیت کفال پوزه باریک ۴۵
۲-۲- نمونه برداری برای بررسی رابطه فایلوژمی ۶ گونه کفال آبهای ایران ۴۶
۲-۲-۱- استخراج DNA ۴۸
۲-۳- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۵۱
۲-۳-۱- محلول های لازم جهت الکترفورز روی ژل آگارز ۵۲
۲-۴- آماده سازی آغازگر ۵۳
۲-۴-۱- رقیق کردن پرایمر ۵۴
۲-۵- واکنش PCR ۵۴
۲-۵-۱- مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR ۵۴
۲-۵-۲- بهینه کردن PCR وپروفیل های حرارتی آن ۵۶
۲-۶- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۵۷
۲-۶-۱- مواد مورد نیاز ۵۷
۲-۷- تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR ۵۸
۲-۸- نرم افزارهای مورد استفاده برای آنالیز توالی های بدست آمده از نمونه های جمعیت شناسی ۵۸
۲-۸-۱- BioEdit ۵۸ .....
۲-۸-۲- DnaSP (DNA Sequnce Polymorphism) ۵۸
۲-۸-۳- MEGA 4(Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 5.0) ۵۹
۳- نتایج ۶۰
۳-۱- بررسی جمعیت کفال پوزه باریک ۶۰
۳-۲- نتایج بررسی رابطه فایلوژنی ۶۵
۴- بحث ۸۱

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۵- نتیجه گیری نهایی ۸۷
پیشنهادها ۹۲
منابع ۹۳
پیوست ۱۰۲
چکیده ا انگلیسی ۱۱۰

پیشگفتار

این پروژه مصوب موسسه تحقیقات شیلات ایران و موسسه تحقیقات زیست فناوری کشاورزی کشور است که در مورخه ۹۰/۳/۲۳ ابلاغ گردید وکمیته علمی و فنی موسسه محل تامین اعتبار آن رانیز ستاد توسعه زیست فناوری تعیین نمودند. نتیجه پژوهشی که در اینجا گزارش می شود در نتیجه مشارکت و همکاری دانشگاه کشاورزی مازندران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات و همکاری صمیمانه دانشجویان عزیز و همکارانم در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی - گرگان حاصل شده است واز سوی ستاد زیست فناوری هیچگونه حمایت مالی صورت نگرفته است و موسسه تحقیقات شیلات ایران نیز در حدود ۱.۵ در صد اعتبار مصوب، حمایت مالی نموده است.مطابق سند پروژه گونه کفال خاکستری *Mugil cephalus* که از خارج از کشور وارد شده بودند در جریان تکثیر و پرورش با مشکلاتی مواجه شدند که امکان تکثیر و نسل گیری آن و اجرای کلونیگ ژنهای پلی مورفیسم وتشکیل کتابخانه ژنی در بین مولدین و نسل F1 آن امکان پذیر نبوده است . چون مولدین انتخاب شده برای تکثیر بر اثر سرمای شدید تلف شدند در نتیجه عملا تکثیری صورت نگرفت.این گزارش مشتمل بر دو قسمت است قسمت اول جمعیت شناسی کفال گونه پوزه باریک (*Liza saliens*) دریای خزر با استفاده از ژن ۱۶srRNAو قسمت دوم بررسی که بررسی رابطه فیلوژنی ۶ گونه کفال ایران که دو گونه آن از دریای خزر و چهار گونه دیگر آن از خلیج فارس و دریای عمان بودند نیز با استفاده از توالی ژن یاد شده انجام پذیرفت.برخی گونه های کفال ماهیان هم که توالی ژن مشابهآنها در بانک ژن ثبت شده بودند نیز با دادهای این تحقیق برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفتند.

چکیده

در این بررسی دو هدف از سه هدف پروژه تحقق پیدا کرده است که در هدف اول آنبه منظورتعیین ساختار ژنتیک جمعیت ماهی کفال پوزه باریک در مناطق مختلف حوضه جنوبی دریای خزر روش توالی یابی ژن 16S rRNA میتوکندریایی به کار گرفته شد. تعداد ۴۵ نمونه باله ماهی کفال پوزه باریک از نواحی غربی (انزلی) ، میانی (ساری) و شرقی (تالاب گمیشان) حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری گردید. توالی بدست آمده تنها از ژن مورد نظر ۵۵۲bp قابل خواندن بود، در مجموع بین ۶ هاپلوتایپ متفاوت و۲۹ جایگاه متغیر بدست آمد. تنوع هاپلوتایپی ونوکلئوتیدی در نمونه های کل مناطق به ترتیب برابر ۰/۲۹و ۰/۰۰۴ .بود.نتایج آنالیز Fst بر اساس روش دوپامتری نشان داد که تنوع در بین نمونه ها معنی دار نبوده($P<0.05$) و تنوع در درون نمونه ها می باشد. برآورد جریان ژنی میزان بالائی از جریان ژنی را بین نمونه های مناطق مختلف نشان داد وبین مناطق مختلف جدائی تولید مثلی وجود نداشت. نتایج این بررسی پیشنهاد می دهد که تفاوت ژنتیکبین مناطق مختلف معنی دار نبوده ومی توان عنوان نمود که جمعیت یکسانی از ماهی کفال پوزه باریک در مناطق مورد بررسی وجود دارد.
.برای دسیابی به هدف دوم پروژه جهت تعیین تفاوتهای ژنتیکی و روابط خویشاوندی میان6گونه از خانواده کفالماهیان (*Mugil cephalus, Liza subviridis, Valamugil buchanani, Lizasaliens,Liza aurata, Mugil capito,*)از روش مولکولیPCR-sequencingاستفاده شد. DNA این نمونه ها (که از آبهای دریای خزر و خلیج فارس جمع آوری شدند) به روش فنل- کلروفرم استخراج گردید. قطعات ژنوم (16s rRNAمیتوکندریایی) طی فرآیندPCR تکثیر و سپس به روش اتوماتیک توالی یابی شدند. آنالیز توالی ها نشان داد که بیشترین تفاوت ژنتیکی بین *M. Cephalus* و ۵ گونه دیگر مورد مطالعه مشاهده شد.درخت بدست آمده بروش Neighbor-joining نشان داد که دو گونه *L. saliens* و*L. aurata* در یک شاخه و گونه*L. subviridis* در شاخه ای جدا قرار گرفتند درصورتیکه درخت رسم شده بروش Maximumparsimony نشان داد که گونه های*L. Subviridis* و*L.aurata*در یک شاخه قرار می گیرند و گونه*L. saliens* در شاخه ای جدا قرار گرفت.باتوجه به این نتایج، این سوال مطرح می شود که چرا گونه های مختلف این جنس در یک شاخه قرار نمی گیرند؟

کلید واژه : موژیلیده،فیلوژنی،جمعیت، mtDNA، PCR ،خلیج فارس و دریای عمان،دریای خزر ،ایران

۱- مقدمه

در حال حاضر، حیطه کاری ژنتیک آبزیان از شکل قدیمی دورگه گیری که در اوایل قرن گذشته شروع شده بود به مباحث دیگری گسترش یافته است که از جمله مطالعات سیتوژنتیکی ودستکاری های کروموزمی، تغییر و کنترل جنسیت آبزیان و تولید آبزیان تک جنسی، شناخت نژادها، گونه ها و تخمین میزان خویشاوندی بین گونه ای، بیولوژی و ژنتیک مولکولی با استفاده از نشانگرهای مختلف را می توان نام برد. امروزه تکنیک های مولکولی در مطالعات زیستی از قبیل اصلاح نژاد آبزیان، تشخیص بیماری ها حتی قبل از بروز علایم ظاهری آن، شناخت جمعیت ها و نژادهای مختلف ، تهیه بانک ژنی، انتقال صفات و..کاربرد بسیار زیادی پیدا کرده است.

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه، تفاوت هایی به چشم می خورد که هرچند این تفاوت ها بسیار اندک می باشند ولی می توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دوگونه از یکسو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکامل و رابطه اجدادی- فرزندی ودرنهایت ترسیم درخت فایلوژنی احتمالی آنان مورد استفاده قرار گیرد. این تفاوت ها برمبنای مطالعات مولکولی بطور مستقیم یا غیرمستقیم قابل تشخیص می باشد. بطور معمول جریان ژنی زیاد میان جمعیت ها موجب محدود کردن مهلت برای ایجاد تفاوت های ژنتیکی شده واز ظهور گونه های جدید ممانعت می کند. از آنجایی که پدید آمدن گونه های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیت های جدا یا نسبتا جدا از یکدیگرمی باشد، بنابراین بطور قطع می توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی وگونه زایی ارتباط برقرار نمود(Wright, 1978).

بیشنیه برداشت پایدار ذخایر ماهیان از اهداف مدیریت شیلاتی است، که دستیابی به آن نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می باشد.یکی از روش های مورد استفاده جهت ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه ها، جمعیت ها و نژادها بکارگیری صفات مرفومتریک و مریستیک نظیر طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی و تعداد شعاع های باله ای بوده است.اما با توجه به حساسیت زیاد صفات مرفومتریک و مریستیک به تغییرات محیطی ونیز اثر منفی دستکاری هنگام نشانه گذاری برسلامت و بقای ماهیان، و همچنین محدود بودن تفسیر داده هاینشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها، همگام با پیشرفتعلم استفاده از نشانگرهای مولکولی مثل ریزماهواره، آلوزایم،RFLP,AFLP,RAPDو mtDNAکه متاثر از فاکتورهای محیطی نمی باشد جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش رایج است(Avise, 1994).

جمعیت به مجموعه ای از افراد نزدیک به هم در یک گونه که در یک مکان خاص زیست کرده واز لحاظ ژنتیکی از سایر جمعیت های متعلق به همان گونه قابل تشخیص هستند اطلاق می شود.هر فرد به عنوان یک خزانه ژنی محسوب می شود پس جمعیت ها در حقیقت مجموعه متنوعی از ژن ها هستند که عواملی همچون فاصله نسل ها در این ماهیان، صید بی رویه، شرایط نامناسب آب وهوایی واز بین رفتن زیستگاه منجر به کاهش اندازه جمعیت های موثر(افراد دارای قابلیت زادآوری) و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می گرددکه این امر خطر انقراض را افزایش می دهد. حفاظت ونگهداری از ذخایر ژنتیکی ماهیان از طریق مدیریت ذخایر بسیار مهم است زیرا که گونه های ارزشمند و منحصر به فرد هرکشور به عنوان سرمایه ملی آن کشور محسوب می شوند.

به طور کلی توصیف ژنتیکی ذخایر ماهیان، اطلاعاتی به ما می دهد که بازتاب ساختار ژنتیکی، بدون تاثیر از فاکتورهای محیطی می باشد. برایمدیریت بهینه جمعیت ماهیان، اطلاعاتی راجع به ساختار ذخایر نیاز است تا بتوان تنوع ژنتیکی جمعیت را از طریق افزایش تنوع ژنتیکی حفظ کرد. امروزه به کمک روش های متفاوتی به بررسی تنوع ژنتیکی می پردازند که براساس پیشرفت هایی در بیولوژی مولکولی و با استفاده از نشانگر های DNAمی باشند. وجود تنوع ژنتیکی در ذخیره ژنی هر جمعیت ضامن آن جمعیت در روند انتخاب طبیعی است(یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۸۰).درجمعیت های کوچک به دلیل محدود بودن ذخیره ژنی، امکان رانش ژنتیکی[1]وجود دارد که شانس بقای آن جمعیت را تحت تاثیر قرار می دهد. دانستن میزان چند شکلی ژنتیکی در جمعیت ماهی ها، مثل جمعیت ماهی کفال حائز اهمیت است.

خانواده کفال ماهیان در تمامی آبهای ساحلی و آبهای لب شور نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنده هستند(et al, 2007Papasotiropoulos).بر اساس تحقیقات Nelson (1994) این خانواده در راسته سوف ماهی شکلان طبقه بندی شده بود اما امروزه در راسته جدیدی به نام کفال ماهی شکلان قرار می گیرند.در جدیدترین طبقه بندی که توسط Nelson(2006) انجام گرفت خانواده کفال ماهیان دارای ۱۷ جنس و ۷۲ گونه مختلف می باشند که بیشتر آنها در دو جنس Liza وMugil طبقه بندی شده اند. به رغم این طبقه بندی های مهم (Nelson 1994 ; Thompson 1997) وضعیت سیستماتیک بعضی از گونه ها و جنس های این خانواده هنوز مبهم است (et al,1998Rossi;Semina et al,2007).

کفال ماهیان در هر سه حوزه شمالی، جنوبی و آبهای داخلی ایران وجود دارند. در خلیج فارس، گونه هایی مانند گاریز یا مید*Liza dussumeri* (که امروزه نام علمی آن*L. subviridis* می باشد)،کفال خاکستری (*M. cephalus*) و بیاح خال آبی (*V.buchnani*) وجود دارند که وارد رودخانه های جنوبی ایران نیز شده اند (قلیچی و همکاران ۱۳۸۲ به نقل از عبدلی ۱۳۷۸). دانشمندان شوروی سابق در سالهای ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ دریای خزر گونه های مختلف کفال ماهیان را شامل کفال خاکستری (*M. cephalus*)،کفال پوزه دار (*L.saliens*)و کفال طلایی (*L. auratus*)از دریای سیاه پیوند زدند که پیوند دو گونه اخیر موفقیت آمیز بوده است و در حال حاضر از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردارند(فضلی و غنی نژاد ۱۳۸۳).همچنین امروزه گونه *M.cephalus*رااز سواحل اسکندریه مصر از اقیانوس اطلس صید و به ایران منتقل نمودند و هم اکنون در ایستگاه تحقیقاتی گمیشان وابسته به مؤسسه تحقیقات شیلات ایران پرورش داده می شود.

روشن سازی وضعیت طبقه بندی خانواده کفال ماهیان توسط چندین محقق انجام شده است (Schultz 1946; Trewaves and Ingham 1972; Thomson, 1981; Harrison and Howes, 1991)

این مطالعات به طور سنتی بر اساس ویژگی های مورفولوژیک انجام شدندو نتایج بدست آمده در چند مورد بحث برانگیز بودند. در حقیقت بیشتر اعضای این خانواده بسیار به یکدیگر شبیه هستند که این یک عامل محدود کننده برای پاسخگویی به سئوالات در مورد روابط خویشاوندی کفال ماهیان (به خصوص در سطح درون گونه ای) می باشد(Stiassny, 1993; Papasotiropoulos et al. 2007).

امروزه تکنیک های پیشرفته ای بر اساس ژنتیک مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی گونه های ماهی بر اساس استفاده از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA)و ژنوم هسته ای (nDNA) توسعه یافتهاند. در دسترس بودن روش های ژنتیک مولکولی زمینه علمی جدیدی را در مورد بررسی DNAجمعیت های مختلف ایجاد کرده است (Avis, 1991; Semina et al. 2007).محدوده وسیعی از روشهای بررسی قابل دسترس که بر اساس روش PCR عمل می کنند عبارتند از:

PCR-sequencing(توالی یابی)،multiplex-PCR(واکنش های زنجیره ای پلیمراز چندگانه)،PCR-RFLP (چند شکلی های حاصل از برش آنزیمی)، RAPD (قطعاتی از DNA که بصورت راندم (احتمالی) تکثیر میشوند) و... که بسیار حساس و دقیق می باشند.بهترین وسیله برای بدست آوردن اطلاعات از محصولات PCRروش توالی یابی می باشد(Asensio, 2007).اگرچه توالی یابی، تکنیکی بسیار زمانبر است ولی اطلاعات بسیار دقیق و زیادی را تولید خواهد کرد(Asensio, 2007).

در این تحقیق روابط خویشاوندی ۶ گونه از کفال ماهیان را که دارای اهمیت اقتصادی بالایی هستند با استفاده از روش تعیین توالی بخشی از ژنوم میتوکندری(16S rRNA)تعیین شد و بهترینرخت فیلوژنی ممکن مربوط به کفال ماهیان آبهای ایران ترسیم گردید تا گامی در جهت روشن ساختن وضعیت رده بندی آنها برداشته شود.

بنابراین تحقیق حاضر با اهداف: بررسی تنوع ژنتیکی کفال خاکستری وارداتی و بومی ، بررسی جمعیت گونه کفال پوزه باریک دریای خزر و همچنین بررسی روابط فایلوژنی ۶ گونه کفال وارداتی و بومی صورت گرفته است.

۱-۱-کلیات

۱-۲- کفال ماهیان

۱-۲-۱- مشخصات کلی کفال ماهیان

بدن این ماهیان نسبتا طویل بوده واز دو پهلو فشرده است سر این ماهیان از جلو گرد واز بالا اندکی فشرده می باشد. فاقد خط جانبی کامل بوده ولی انحناء جانبی یا خط جانبی ناقص دارند تمام بدن تا ناحیه سراز فلس هایی پوشیده شده است که دایره ای بوده و در برخی گونه های مناطق گرمسیری از نوع شانه ای است(شریعتی،۱۳۷۱).

این ماهیان سری بزرگ، ملث مانند و مسطح با پوزه ای گردو کوتاه دارند دهان دراین ماهیان کوچک بوده وفاقد دندان یا واجد دندان های کوچک و ریزی می باشند چشم های این ماهی پلک چربی دارد ودارای شکاف آبششی بزرگ وکاملا باز بوده و غشاء های آبششی فاقد قطعه رابط هستند واز یکدیگر جدا می باشند .(عبدلی، ۱۳۸۷;Soyinka, 2008).

دارای خارهای آبششی طویل و باریک بوده وتعداد شعاع های آبششی ۵ تا۶ عدداست. ۲ باله پشتی دارند، اولین باله پشتی حاوی ۴ عددخار و دومین باله پشتی دارای ترکیبی از خار و شعاع های نرم می باشد (۲ تا۳ خار و۷ تا ۱۲ عددشعاع نرم) (Kaya *et al.*, 2000).

استخوان های باله شکمی بوسیله یک رباط به ترقوه متصل می شوند و باله های سینه ای در بالا قرارداند .دارای یک کیسه شنای بزرگ بوده و روده طویلی دارند بطوریکه طول روده ۴ تا۶ برابر طول بدن می باشد، همچنین معده عضلانی دارند. بر روی بدن در پهلو ها۶تا۹ عددنوار طولی وجوددارد.تعداد مهره های ماهیان این خانواده ۲۴ تا۲۶ عددیا ۲۴ تا ۳۰ عدداست (تقوی، ۱۳۷۷؛Kaya *et al.*,2000؛ Soyinka, 2008).

۲-۲-۱- ارزش اقتصادی کفال ماهیان

کفالها درسرتاسر مرزهای آبی در جنوب ایالات متحده یکی از بیشترین اقلام ماهیان ماکول صید شده می باشند(FAO, 2006). در تایوان کفال یک ماهی مهم اقتصادی است هر ساله تا۱۰۰۰۰۰تا۲۰۰۰۰۰ عددکفال در آبهای ساحلی آن صید می شود(Liao,2005).

کفال ماهیان در سرتاسر مرزهای آبی در جنوب ایالات متحده تایوان، هند،جنوب اروپا به میزان زیاد صید می شوند در سواحل استرالیا کفالهای در حال مهاجرت، غذای مهمی برای ماهیان درنده از جمله کوسه می باشد ودر هاوائی بسیاری از ماهی گیران از طعمه زنده بچه ماهی کفال برای صید ماهی تون استفاده می کنند (FAO, 2006).نمونه های وارد شده به بازار به صورت تازه، خشک شده، شورشده ومنجمد شده عرضه میشود. همچنین کفال ماهیان به صورت تازه ودودی شده وپس از فشار وفرایند خشک شدن بعنوان یک منبع اقتصادی مهم برای کشورهای اطراف مدیترانه معرفی می شود (Katselis*et al*, 2006). کفال هاهمچنین در داروهای چینی کاربرد دارد وبصورت کشت متراکم وگسترده در استخرهای جنوب شرقی آسیا پرورش داده میشود(Heras, ;FAO, 2006 2009).گوشت این ماهی سفت ،چرب وخوش طعم است وکیفیت بالایی دارد.در ایران،کفال به صورت تازه منجمد عرضه می شود.

در فلوریدای آمریکا، کفال ها به صورت صنعتی صید شده و کنسرومی گردند، علاوه بر این آنها را پس از عمل آوری به صورت فیله ماهی در می آورند، در کفال های دریایی صید شده در استرالیا مشاهده شده که میزان پروتئین ماهیان ماده در حالت بلوغ کمتر از نرهاست ،اما میزان ویتامینDموجوددر کبد آنها بیشتر از نرهاست(FAO, 2006).

گوشت کفال سفت و خوشمزه و چرب بوده و کیفیت بالایی داشته و بعلاوه کم تیغ می باشد، در بیشتر نقاط دنیا علاوه بر مصرف گوشت تازه کفال این ماهی را به صورتهای مختلف به مصرف می رسانندکفال در مقایسه با آزاد ماهیان،اردک ماهی وماهی تون که ماهیانی چرب بوده به عنوان یک ماهی نیمه چرب ودر مقایسه با خانواده گادیده ماهیانی چرب می باشد.(Desilva, 1980)

گوشت کفال دارای اسیدهای آمینه ضروری آرژنین (٪۵/۸)هیستیدین(٪۱/۶)،لیزین(٪۶/۷)وتریتپوفان(٪۱/۴) می باشد .مقدار سدیم در کفال های آب شور در هر ۱۰۰گرم ۸۴ میلی گرم و در کفال های آب شیرین در هر ۱۰۰گرم ۵۲ میلی گرم می باشد (Amini,1989).

۳-۲-۱- کفال ماهیان خلیج فارس

- *Liza subviridis* (Valenciennes ,1836)

نامهای علمی دیگر این ماهی *L. dussumierri*(Valenciennes ,1836) و *Chelon subviridis*(Valenciennes ,1836) میباشد. در ایران این ماهی در مناطق مختلف نامهای گوناگونی دارد. در بوشهر به آن بیاح عربی، در بندرعباس به آن گاریز و نمونه کوچک آن را مید یا کفال پشت سبز می نامند، همان طور که در زبان انگلیسی نیز به آن کفال پشت سبز[1]می گویند.

پلک چربی در این ماهی توسعه یافته و حدود نیمی از عنبیه را می پوشاند (این بافت در افراد جوان این گونه موجود نمی باشد). هر دو لب در این ماهی باریک ولی لب پائینی باریک تر است و دارای یک برآمدگی پیوسته بالایی می باشد که انتهای پشتی آرواره بالایی به خط عمودی قسمت قدامی حاشیه چشم می رسد. فک بالایی دارای چند ردیف دندان میخی و مژه ای شکل و لب پایینی یک ردیف دندان مژه ای دارد. (وفایی،۱۳۸۰).

دو باله پشتی مجزا دارد که پایه اولیه باله پشتی به باله دمی (نسبت به نوک پوزه) نزدیک تر است و دارای ۴ خار می باشد. پایه دومین باله پشتی دارای یک خار و ۹-۸ شعاع نرم است و قاعده دومین باله پشتی (D2) از فلس پوشیده می باشد. باله مخرجی ۳ خار و ۹-۸ شعاع نرم دارد. زائده باله سینه ای در این ماهی وجود ندارد و طول

[1] greenbackmullet

باله سینه ای ۷۶-۷۴ در صد طول سر می باشد. دارای ۵-۴ عدد زائده باب المعده می باشد. ناحیه پشتی در ماهی *L. subviridis* سبز تیره یا روشن یا خاکستری مایل به سبز می باشد. طول این ماهی به ۳۹/۵ سانتیمتر و وزن آن به ۲۷۰ گرم می رسد(صادقی، ۱۳۸۰).

در آبهای ساحلی و مناطق مصبی یافت می شود تخم ریزی در دریا صورت می گیرد و تغذیه آنها از دتریتها و موجودات کوچک بستر همراه با شن و گل می باشد. این ماهی در خلیج فارس در نواحی غربی هندوستان چین و شمال استرالیا یافت می شود. در ایران این ماهی در رودخانه بهمن شیر یافت می شود. این گونه توسط ماهیگیری سنتی در جنوب عراق و ایران صید می شود و غذای تعداد کثیری از مردمان جنوبی ایران و عراق را تشکیل می دهد. این ماهی توسط ادوات صید ساحلی، پره ها، قفس ها و تور های گوشگیر صید می شود(صادقی، ۱۳۸۰).

شکل ۱-۱: تصویری از گاریز (*Liza subviridis*)www.fishbase.org

- ***Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758)**

این ماهی در ایران نام های مختلفی دارد مانند: کفال خاکستری، کفال راه راه یا کفال مخطط.در زبان انگلیسی نیز نامهای مختلفی مانند کفال خاکستری معمولی و کفال راه راه[2] دارد.

[2]common grey mullet and stripped mullet

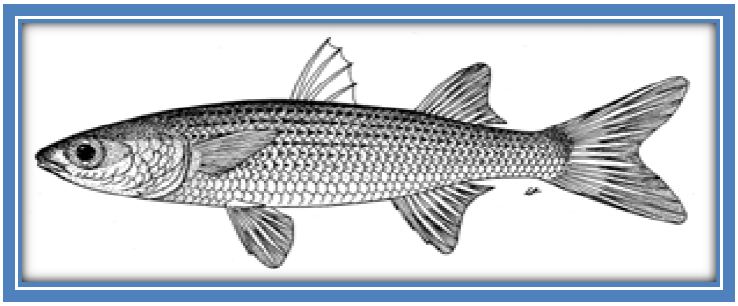
*M. cephalus*متعلق به شاخه مهره داران و همراه با سایر ماهیان استخوانی در رده۳ماهیان استخوانی گروه بندی می گردد. همچنین در فوق راسته۴یا شعاع بالگان (ray finned) تقسیم بندی می شود. ماهی کفال راه راه در فوق راستهMugiloidei(که تنها خانواده mugilidaeرا در بر می گیرد) قرار دارد. کفال ماهیان زیر خانوادهMugilidaeمانند *M. cephalus*نماینده اکثر گونه های کفال می باشد که از نظر آبزی پروری مهم هستند (صادقی، ۱۳۸۰ و ستاری، ۱۳۸۹).

کفال راه راه یک دهان انتهایی به همراه دندانهایی روی لب و یک بدن کشیده دارد که بتدریج فشرده می شود. یک سر پهن که درست در قسمت بالایی پهن و حدود ۴/۵ برابر آن معادل طول چنگالی می باشد. بافت چربی قسمت عمده چشم را می پوشاند و حدود ۱/۷ برابر طول آن معادل طول سر می باشد. دو باله پشتی که اولی کوتاه است و شامل ۴ خار و دومی دارای ۸ شعاع نرم می باشد و باله مخرجی که دارای ۹-۷ شعاع نرم و ۳ خار می باشد. در کفال زنده بخش پشتی بدن معمولاً قهوه ای متمایل به خاکستری است. پهلوها نقره ای رنگ با خطوط جانبی و شکم سفید می باشد. وجود فقط ۲ زائده پیلوریک مشخصه جنسMugilمی باشد (Zisman, 1981).

در میان ماهیان استخوانی، این گونه دارای وسیع ترین پراکنش جغرافیایی در طول نواحی ساحلی بین عرض های جغرافیایی ۴۲ درجه شمالی و ۴۲ درجه جنوبی است (Thomson, 1963). معمولاً مراحل بچه ماهی نورس۵ و جوانی در آبهای لب شور تالابها و مصب ها سپری می شود. در قسمتهای متعددی از دنیا گله های بزرگی از این ماهیان جوانتر کفال خاکستری اغلب به رودخانه ها و دریاچه های آب شیرین مهاجرت می کنند. اما مثالهای زیادی مبنی بر دیده شدن این گونه در زیستگاه هایی با آب بسیار شور (۷۵ در هزار) نیز گزارش شده است (Thomson, 1981). دامنه وسیع پراکنش جغرافیایی کفال راه راه نشان دهنده وجود مرزهای آشکاری جهت

3 Osteichthyes
4 Actinopterygii
5 fry

فراوانی ژنی برای ایجاد نژادهای مختلف می باشد و این موضوع وجود نژادهایی از کفال راه راه را با ویژگی ها و قابلیت های متنوع (از جمله رشد، هم آوری و مقاومت در برابر بیماری ها) پیشنهاد می نماید.این کفال در دو دهه اخیر حداقل دو بار از مصر به ایران منتقل شد و به صورت کنترل شده در تالاب گمیشان (حوزه جنوبی دریای خزر) نگهداری می شود.



شکل ۲-۱: تصویری از کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)(www.fishbase.org)

- ***Mugil capito* (Cuvier , 1829)**

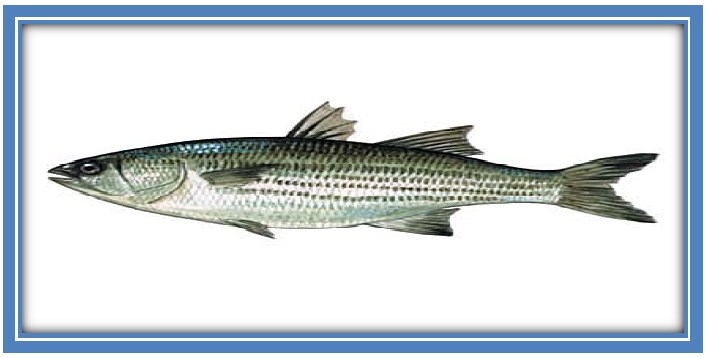
این ماهی به نام دهان باریک[6] معروف است .نام علمی دیگر این ماهی *L.ramada*(Risso,1828)می باشد.

ماکزیمم طول این ماهی ۷۰ سانتیمتر و متوسط طول آن ۳۵ سانتیمتر می باشد.تعداد شعاع سخت باله پشتی آن ۵-۴ و شعاع نرم آن ۱۰-۷ عدد,همچنین تعداد شعاع سخت باله مخرجی ۳ و شعاع نرم باله مخرجی ۹-۸ عدد می باشد. این ماهیان دهان کوچک، سر بزرگ و مسطح, پوزه کوتاه و کلفت دارند.این ماهی دو باله پشتی کاملا مجزا از هم دارد که اولین باله پشتی آن ۴ تا ۵ خار دارد.فلس های بزرگی دارند و ناحیه پهلویی و پشتی آن خاکستری رنگ می باشد.

از ماهیان کاتادروموس است و در قسمتهای پلاژیک-نریتیک زندگی می کند.تخمریزی آنها در دریا نزدیک سواحل اتفاق می افتد. نوجوانان این ماهیان در ناحیه لیتورال و مصبها جمع می شوند.این کفال ماهیان از

[6] *Thinlip greymullet*

جلبکهای سطحی، دتریتوسهاو بنتیک های کوچک یا موجودات پلانکتونی تغذیه می کنند.این ماهیان تخمگذارند و تخمهای آنها پلاژیک و غیرچسبنده میباشد.(www.fishbase.org)



شکل ۳-۱: تصویری از کفال (*Mugil capito*)(www.fishbase.org)

- ***Valamugil buchanani* (Bleeker 1854)**

نامهای علمی دیگر این ماهی*Valamugil seheli* (Forsskal,1775) و*M.laxillary*(Valenciennes,1803) و *M. caeruleomaculatus*(Lacepede , 1803)می باشند. این ماهی را در ایران به نامهای کفال لکه آبی ,کفال خال آبی و یا کفال دم آبی می شناسند و در زبان انگلیسی آن را کفال خال آبی[۷] می نامند.

کفال های خال آبی دارای فلس های مضرس حاشیه ای هستند که درون غلافی قرار گرفته اند. فاقد پلک چربی و دارای دو باله پشتی می باشند که دومین باله پشتی اندکی بلندتر از اولین باله پشتی است. باله پشتی این ماهی دارای ۵-۴ شعاع سخت و ۸ شعاع نرم می باشد. باله مخرجی ۳ شعاع سخت و ۹ شعاع نرم دارد. استخوان ماکزیلار باریک است و زمانیکه دهان ماهی بسته است به وضوح قابل تشخیص نیستند.

[7] *Bluespot mullet*

رنگ ناحیه پشتی ماهی کفال خال آبی متمایل به سبز و ناحیه پهلویی و شکمی آنها نقره ای رنگ است. همچنین لکه های کوچک طلایی رنگ بر روی سرپوش آبششی فوقانی این ماهی مشاهده می شود. باله پشتی آن آبی روشن و باله سینه ای آن زرد رنگ با لکه های آبی تیره می باشد.

کفال خال آبی در آبهای ساحلی کم عمق مانند مصب ها و رودخانه ها زندگی می کند و از دتریتوس ها ,بی مهرگان کفزی ,جلبک ها و... تغذیه می کنند. این ماهیان تخمگذارند و تخم های پلاژیک و غیر چسبنده تولید می کنند.کفال خال آبی با روش هایی مانند استفاده از تور گوشگیر تورهای ماهیگیری ساحلی اکثراً در طول دوره تخم ریزی صید می شوند. طول کفال خال آبی به طور میانگین ۳۰-۲۰ سانتیمتر و حداکثر طول آنها ۵۰ سانتیمتر می باشد.(صادقی،۱۳۸۰)

شکل ٤-۱: تصویری از کفال خال آبی*(Valamugil buchanani) (www.fishbase.org)*

۳-۱- کفال ماهیان دریای خزر

کفال ماهیان در آبهای ساحلی گرمسیری یا نیمه گرمسیری و حتی در مناطق معتدله نیز زندگی می نمایند. ووارد مصب رودخانه ها و آب های شیرین می شوند. حدود۸۰ گونه کفال ماهی تا کنون شناشایی شده که از این مقدار فقط ۲ گونه بومی آبهای شیرین یا لب شور ایران می باشند که بطور موفقیت آمیزی به آبهای شمال ایران پیوند زده شده اند.

بومی کردن ماهی کفال با توجه به تغییرات هیدرولوژی دریای نامبرده که متضمن کاهش ارتفاع سطح دریای خزر و سد بندی رودخانه های ولگا- کورای بوده ودر سنوات ۱۹۳۵-۱۹۳۰ میلادی انجام یافته است.بومی کردن ماهی کفال در دریای خزر به منظور ایجاد گروه ماهیانی بوده که از لحاظ بیولوژیک نیازی به آبهای شیرین نداشته باشند.

کفال ماهیان بومی دریای خزر نبوده و از دریای سیاه به این دریا منتقل ومعرفی شده اند. طی سالهای ۱۹۳۰ تا۱۹۳۴ میلادی(۱۳۰۹تا۱۳۱۳ هجری شمسی) حدود سه میلیون عدد بچه ماهی کفال یکساله و کوچکتر، از سه گونه کفال طلایی *Liza aurata* کفال پوزه باریک *Lizasaliens* وکفال مخطط *Mugil cephalus* از دریای سیاه به دریای خزر پیوند زده شدند که پیوند دو گونه کفال طلایی وکفال پوزه باریک موفقیت آمیز بوده ودرمدت کوتاهی بخوبی با شرایط اکولوژیکی دریای خزر سازگار شدند واز پراکنش بسیار خوبی برخوردار گردیدند(شریعتی ۱۳۷۱؛Kosarev and Yablonskaya, 1994؛Konovalov, 1959Zablotski, 1966؛Avanesove, 1972؛Oren, 1981). علت اصلی بومی نشدن *M.cephalus* را باید در آن دانست که اگر *M.cephalus* به دریای خزر آورده شده مسلما به میزان خیلی کمی بوده ونمی توانسته در دریای خزر بومی شده وتولید نسل نمایددرنیمه دوم سالهای ۱۹۶۰ جمعیت کفال ماهیان به یکنعادل دینامیکی رسید با یک زمینه تغذیه ای قوی واین دو جنس کم کم در دریای خزر طبیعی شد(Ghaninejad, 2009)

دو گونه مذکور در کمتر از ده سال در تمام سواحل دریای خزر گسترش یافتند و جمعیتهای بسیار چشمگیری را در سواحل خزر جنوبی تشکیل دادند. از این دو گونه، کفال پوزه باریک مناطق جنوبی و کفال طلایی مناطق شمالی را برگزیدند(رضوی صیاد، ۱۳۶۹) صید کفال ماهیان در شوروی سابق از سال ۱۹۷۳ میلیادی(۱۳۱۶ هجری شمسی) آغاز گردید و مقدار صید سالانه آنها بجز سال ۱۹۵۶ که حدود۱۵۰۰تن گزارش گردید، همواره کمتر از ۱۰۰۰ تن بود(غنی نژاد ومقیم، ۱۳۷۲).

کفال ماهیان درایران برای اولین بار در سال ۱۳۱۲ گزارش شدند(شوکولیوکف،۱۰۷۳) ولی صید تجاری آنها از سال ۱۳۲۱ هجری شمسی (۱۹۴۲میلادی) آغاز گردید. صید سالانه این ماهیان دارای نوساناتی بود ولی میانگین صید آنها طی سالهای ۱۳۴۷ تا ۱۳۵۸ بیش از ۲۰۰۰تن گزارش گردید و میانگین وزن این ماهیان ۵۰۰تا۶۰۰ گرم محاسبه شد(رضوی صیاد، ۱۳۶۹).

در بومی شدن ماهی کفال در دریای خزر دوعامل زیر موثر بوده است:

۱)آب دریای خزر گرمتر از آب دریای سیاه است

۲) مناطق کم عمقی که ماهی کفال در آن زندگی می کند به مراتب وسیع تر از دریای سیاه است ضمنا فراوانی منابع غذایی برای ماهیان کفال در دریای خزر یکی دیگر از علل بومی شدن این ماهی میباشد(Amini, 1989).

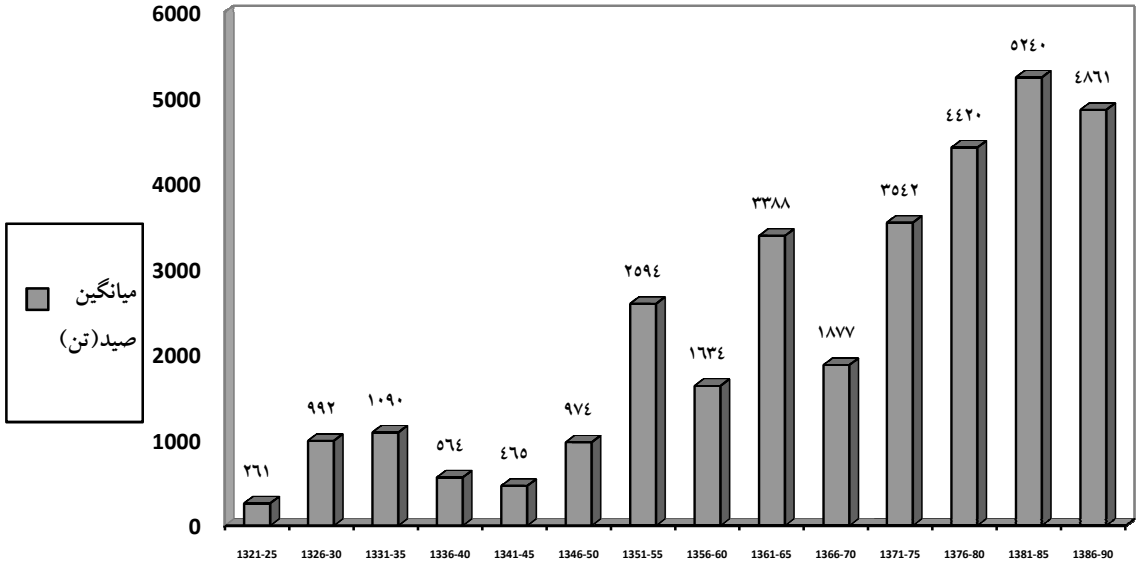
۱-۳-۱- میزان صید کفال ماهیان در دریای خزر

میانگین صید سالانه کفال ماهیان در شوروی سابق طی سالهای ۱۹۷۹تا۱۹۹۰ حدود۲۵۰ تن بود ولی در ایران مقدار صید بسیار قابل ملاحظه بوده و بیش از ۹۰ درصد ذخایر کفال ماهیان دریای خزر توسط صیادان ایرانی صید گردیدیکی از دلایل بالا بودن میزان صید کفال ماهیان در ایران در مقایسه با سایر کشورهای حاشیه دریای خزر، زمستان گذرانی این ماهیان در خزر جنوبی و مناطق ساحلی ایران است که از دمای مناسبی برخوردار میباشند.کفال ماهیان، ماهیانی مهاجر بوده وبرای زمستان گذرانی از قسمتهای میانی وشمالی دریای خزر به قسمتهای جنوبی مهاجرت می کنند.

گله های کفال در ایران، در سراسر ساحل دریای خزر و نواحی پایین دست رودخانه ها،مرداب انزلی و خروجی های آن، بدلیل افزایش میزان شوری تجمع می یابند.این گونه در خلیج گرگان و نواحی شرقی ،مرکزی و غربی دریای خزر یافت می شود(اصلان پرویز، ۱۳۷۰).

باز سازی ذخایر کفال ماهیان کاملا وابسته به تکثیر طبیعی بوده وهیچگونه اقدامی برای تکثیر مصنوعی این ماهیان انجام نمی شود. طی سالهای بعداز انقلاب در ایران، بدلیل صید بیرویه و بخصوص صید انبوه کفال ماهیان در سال بهره برداری ۶۲-۱۳۶۱ (۶۹۷۵ تن)که متوسط وزن ماهیان صید شده فقط ۲۱۰ گرم بود،آسیب شدیدی برذخایر این ماهیان واردآمد(رضوی صیاد،۱۳۶۹).

براساس آمار صید موجود از ماهیان استخوانی،میانگین صید کفال ماهیان در توالی پنج ساله از سال ۱۳۲۱تا۱۳۵۸ روند افزایشی داشته وطی سالهای ۱۳۸۱تا۱۳۸۵ با میانگین ۵۲۴۰ تن به حداکثر مقدار خود رسید.طی این مدت سهم صید کفال ماهیان از صید کل ماهیان استخوانی در سواحل ایرانی دریای خزر تا سالهای ۶۰-۱۳۵۶ بتدریج افزایش یافته وبه ۷۸/۷ درصد رسید وسپس از مقدار آن کاسته شد (شکل ۵-۱).در پنج سال گذشته کفال ماهیان بطور میانگین ۲۷/۸ درصد از ترکیب صید ماهیان استخوانی را داشتند.



شکل ٥-١- میانگین صید کفال ماهیان در توالی ٥ساله در آبهای ایرانی دریای خزر (برحسب تن)

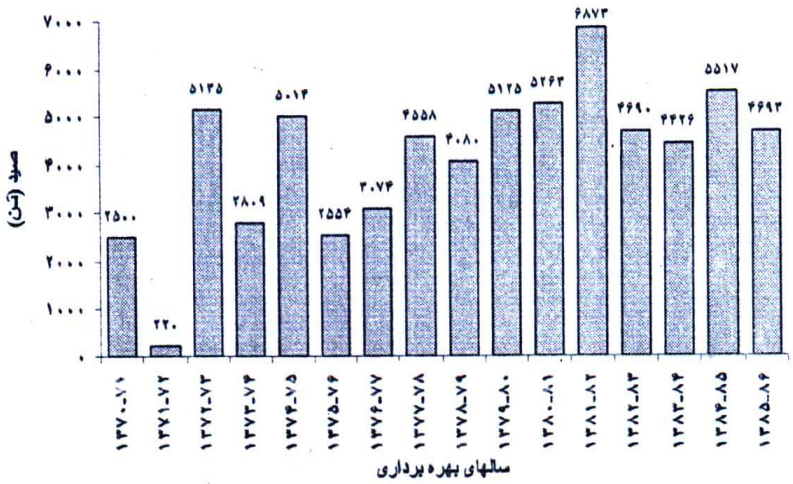
در بررسی جزئی تر وضعیت صید کفال ماهیان در سواحل ایرانی دریای خزر طی ۱۶ سال اخیر، روند افزایشی میزان صید این ماهیان مشاهده می شود(Fazli *et al.,* 2008).در سال بهره برداری ۸۲-۱۳۸۱ بیشترین مقدار صید این ماهیان با ۶۸۷۳ تن گزارش گردید(شکل ۶-۱).همچنین در سال بهره برداری مذکور کفال ماهیان با ۴۲/۴ درصد بیشترین سهم صید خود را در ۱۶ سال اخیر داشتند.(شکل۶-۱)(Fazli *et al.,* 2008).

وضعیت ذخایر کفال ماهیان و بخصوص کفال طلایی در مقایسه با سایر گونه های ماهیان استخوانی در دریای خزر، از ثبات بیشتری برخوردار می باشد. کفال ماهیان بصورت برابر از مواد پوسیده ،پری فیتون و آبزیان کوچک کفزی تغذیه می کنند. توان سازش آنها با مصرف مواد غذایی نسبتا متنوع، پا برجایی و ثبات جمعیت آنها را تضمین کرده است(Probatove and Tereshchenko, 1951).این ماهیان در دریای خزر در تمامی طول سال و بدون وابستگی به فصل وتنوع غذایی،تغذیه می کنندولی کفال ماهیان دریای سیاه در دوران زمستان گذرانی و مهاجرت، تغذیه نمی کنند(Probatove and Tereshchenko, 1951).

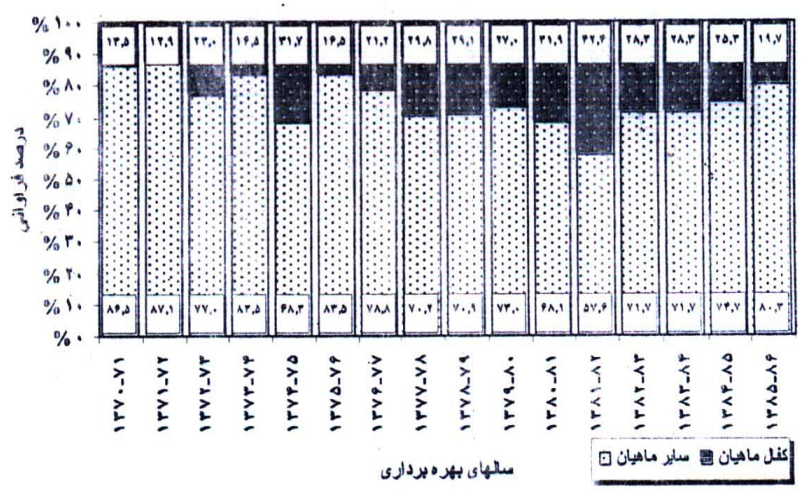
از زمان معرفی کفال ماهیان به دریای خزر و سازگاری بسیار جالب آنها با شرایط محیطی این دریا تاکنون تغییراتی در برخی از ویژگیهای زیستی اینماهیان بوجود آمده است. تنوع گروه های سنی کفال ماهیان دریای خزر نسبت به دریای سیاه بیشتر می باشد، میانگین طولی آنها نیزافزایش یافته است، برتوان باروری و تولید مثلی آنها افزوده شده ودرتمام طول سال بشدت تغذیه می کنند که این امر موجب کمتر شدن نوسانات ذخایر چربی

کفال ماهیان در دریای خزر شده است، آهنگ مهاجرت در دریای خزر کندتر ولی مسیر مهاجرت دو برابر گردیده ومحدودیت شفافیت آب منجر به افزایش اندازه چشم شده است(اصلان پرویز، ۱۳۷۰).

از دو گونه کفال طلائی و کفال پوزه باریک که در ترکیب صید ماهیان استخوانی در ایران وجوددارند، در دهه اخیر از صید کفال پوزه باریک بشدت کاسته شده است(شکل ۷-۱)(Fazli, 1998)،بطوریکه در سال بهره برداری۸۶-۱۳۸۵ این گونه فقط۰/۸ درصد از ترکیب صید کفال ماهیان و با ۳۷/۵ تن فقط ۰/۱۶ درصد از صید کل ماهیان استخوانی را دارا بود.



شکل ٦-۱: مقدار صید کفال ماهیان طی ١٦ سال اخیر در آبهای ایرانی دریای خزر



شکل ۷-۱: سهم صید کفال ماهیان در ترکیب صید ماهیان استخوانی طی ١٦ سال اخیر در آبهای ایرانی دریای خزر

در حالیکه در سالهای آغازین صید کفال ماهیان در ایران، کفال پوزه باریک نزدیک به ۳۰ درصد از ترکیب صید را داشت(اصلان پرویز،۱۳۷۰) و همانطور که در شکل ۶-۱ مشاهده می شود، در سال بهره برداری۷۴-۱۳۷۳ مقدار صید این دو گونه تقریبا برابر بود. در پنج سال اخیر کفال طلایی با بیش از ۹۵ درصد از صید کفال ماهیان، غالبیت قابل ملاحظه ای یافته است. بررسی روند تغییرات مقدار زیتوده کفال از سال ۱۳۷۰ به بعد حاکی از افزایش تدریجی ذخایر این گونه در دریای خزر می باشد (شکل۷-۱). مقدار زیتوده این گونه در سال بهره برداری ۸۶-۱۳۸۵ با حدود ۱۹۸۳۳ تن در بیشترین مقدار خود در ۱۶ سال اخیر قرارگرفت(Fazli *et al.*, 2008).یکی از دلایل کاهش شدید صید وذخایر کفال پوزه باریک را می توان ورود شانه دار مهاجم (*Menemiopsis leidyi*) به دریای خزر دانست که بدلیل مناسب بودن شرایط محیطی، بخوبی در دریای خزر گسترش یافته است(روحی وفضلی ، ۱۳۸۱) شانه دار مهاجم بشدت از زئوپلانکتونها،تخم ولارو ماهیان تغذیه می کند. در ماههای گرم سال برگسترش آن افزوده شده واز تراکم بسیار بالایی برخوردار می شود ودرماههای سرد سال از شدت تراکم آن کاسته می گردد(روحی و فضلی،۱۳۸۱).با توجه به زمان تکثیر و تخم ریزی کفال پوزه باریک که ماههای گرم سال بوده ودرماههای تیر ومرداد به اوج خود می رسد،تراکم زیاد شانه دار مهاجم و تغذیه از تخم و لارو این ماهی می تواند بر بازسازی طبیعی ذخایر این گونه اثر نامطلوبی داشته باشد(فضلی و غنی نژاد،۱۳۸۳)

٤-۱- ویژگی های گونه *Liza saliens*

۱-٤- ۱-رده بندی

شکل ۸-۱- کفال پوزه باریک (*Liza saliens*)

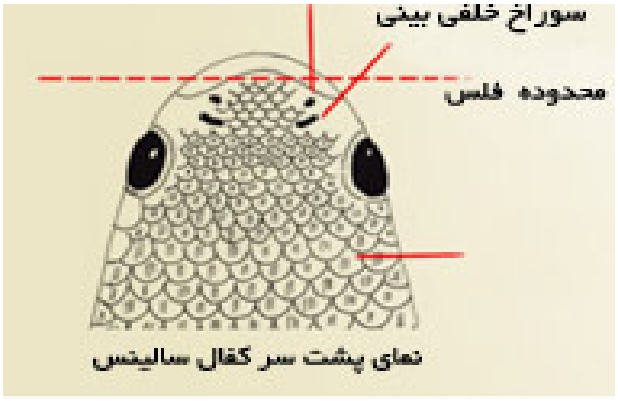
Kingdom	Animalia
شاخه (Phylum)	طنابداران(Chordata)
زیر شاخه (Subphylum)	مهره داران(Vertebrata)
فوق رده (Superclass)	آرواره داران(Gnathostomata)
رده(Class)	ماهیان استخوانی(Osteichthyes)
راسته(Order)	سوف ماهی شکلان (Perciformes)
خانواده(Family)	کفال ماهیان (Mugilidae)
جنس(Genus)	*Liza*
گونه(Species)	*Saliens*

اقتباس از Thomson, 1981

۲-٤-۱- ریخت شناسی گونه

درایران به این ماهی کفال پوزه باریک، در آذربایجانSivriburun kefalودر ترکمنستانVitibutumیاGaty kelle،در روسیه به آنostronosو در زبان انگلیسی به آن leaping grey mulletمیگویند.

پوزه این ماهی باریک و کشیده می باشد و تعدادی فلس بر روی آن دارد که این فلس ها از جلوی منفذبویایی شروع شده و تا قسمت انتهایی پوزه ادامه دارند ولی پوزه در بالا تا حدسوراخ های بینی فاقد فلس بوده و سخت می باشد.



شکل ۹-۱- نمای پشت سر کفال پوزه باریک

لب ها در این ماهی باریک بوده و چشمها فاقد پلک چربی می باشند استخوان پیش حدقه ای در جلو دارای یک شکاف می باشد واستخوان فکی را کاملا می پوشاند(عبدلی ، ۱۳۸۷).

این ماهیان دارای ۲ دسته زوائد باب المعدی می باشند که ۵-۳ عددآنها کوتاه و۴-۳ عدد بلند است(جمعا ۹-۷ زائده باب المعدی دارند)(Amini, 1989) ۲ باله پشتی کاملا مجزا دارند که اولین باله پشتی دارای ۴ خارو دومین باله پشتی ۳-۱ خار و ۹-۶ شعاع نرم دارند، باله مخرجی فلس های ناحیه پشتی وکناری با یکدیگر موازی بوده وباله های آن بریدگی های زیادی دارد و شکاف دمی آن هلالی شکل می باشد(Avanesov, ؛ Cardona, 1999 1972؛Tereshenko, 1950؛Amini,1989؛ عبدلی ، ۱۳۸۷)در این ماهی کمانهای آبششی باریک و زیادی وجوددارد که اولین کمان آبشش ۶۵تا۸۵ خار دارد.تعداد مهره های این ماهی ۲۵-۲۳ عدداست. طول روده آن ۲-۱/۴ برابر طول بدن بوده ودارای ۲ لوب حلقی بعد از معده عضلانی می باشد وصفاقی به رنگ قهوه ای تاسیاه دارند. حداکثر طول این ماهی ۵۰سانتی متر ووزن آن ۱۱۵۰ گرم می باشد (Harrison, 2002). رنگ بدن این ماهی درناحیه پیشی خاکستری تیره با خاکستری مایل به قهوه ای می باشد .هفت نواری طولی در پهلوهای بدن این ماهی وجوددارد و لکه ای طلائی بر روی سرپوش آبششی این ماهی است.(Akyol, 2001&1999)

۳-٤-۱- بیولوژی

- **دستگاه گوارش و تغذیه**

دستگاه گوارش در کفال ماهیان شامل دهان – حلق- مری- معده و روده است. در زمان تغذیه سرماهی کفال به طرف پایین قرار گرفته و ماهی تحت زاویه ۴۵° حرکت می نماید و سرش را شدیدا به طرفین تکان می دهد، این عمل باعث می شود که لایه قوقانی دترتیها که حاوی ارگانیسمهای کوچک کفزی نیز می باشند بلند شده و سپس با دهان بادکش مانند، مواد را مکیده و وارد محوطه دهانی می کند وسپس این مواد توسط خارهای آبشش فیلتر می گردد(Soyinka, 2008). مواد غذایی توسط دستگاه حلقی، از محوطه دهانی به طرف مری رانده می شوند. در همین زمان مابقی مواد زاید به بیرون رانده می شود. سپس غذا توسط مری به قسمت قدامی و قابل اتساع معده منتقل گشته واز آنجا به قسمت عضلانی معده که حالت سنگندانی داردمی رود در بخش سنگدانی معده، عمل خرد کردن دانه های غذایی صورت گرفته وطی آن مواد نرم می شوند. پس از این مرحله غذا به سمت روده که خیلی طویل است می رود.بین معده و روده، زوائد باب المعدی وجود دارد،که در ترشح آنزیم های موثر در جذب غذا در روده کمک شایانی می کنند.(Katselis, 1996).

کفالهای جوان از زئوپلاکتون ها تغذیه می کنند و غذای خودرا با مشاهده بدست می آورند. کفال های جوان در روز و کفال های بالغ در طول شب تغذیه می نمایند. کفال ها در طول تابستان در خورها بطور متراکم تری وجود دارند. کفال ها برای یافتن غذا انرژی زیادی صرف می کنند و این عادت باعث می شود که تا متابولسیم پایه آنها نسبت به سایر ماهیان استخوانی بالاتر باشد(Payne, 1976). این ماهیان در زمان بلوغ و مهاجرت به وفور تغذیه کرده و در هنگام تولید مثل گرسنه باقی می مانند. بطورکلی در تغذیه کفال ماهیان سه مرحله مشاهده می گردد:

۱- مرحله تغذیه کوتاه مدت ، که بچه ماهی از پلانکتون همزمان با گسترش ماهیان در آب و قبل از رسیدن به منطقه ساحلی به این طریق تغذیه می نمایند.

۲- تغذیه از پلانکتون که توأم با مصرف جانوران کفزی می باشد که مختص ماهیان یک ساله و نزدیک به یک سال می باشد.

۳- تغذیه از مواد بستر دریا که در زمانی است که بچه ماهیان رشد کرده اند،ماهیان بالغ بطور کلی ازمواد دتریت یعنی بقایای حیوانی و نباتی تغذیه می کنند وهیچ گونه رقابت غذایی با سایر ماهیان تجاری ندارندکفال پوزه باریک از دتریت ها،پری فیتون..وموجودات کفری تغذیه می نمایند.(Khoroshko, 1981)

- **تولید مثل**

زیستگاه کفال ماهیان آبهای شیرین وشورو مصب ها است و تخم ریزی درآبهای شور دریا انجام میگیرد. برخی ادعا کردند که تخم ریزی ماهیان کفال در نزدیکی سواحل نیز صورت می گیرد به هرحال تخم ریزی در مرداب ها انجام نمی گیرد. باور بر اینست که ماهیان کفال برای لقاح یافتن تخم هایشان نیازمند آبهایی با درجه شوری بالا می باشند(Avanesov, 1972).

تخم ماهیان کفال کوچک بوده و قطر آنها حدود۰/۷ میلی متر است وهمراه با این تخم ها یک گویچه چربی وجوددارد که تامین کننده انرژی آنها می باشد (یوسفیان وهمکاران، ۱۳۸۲)تخم ها در گونه هایی که در آبهای دریا تخم ریزی می نمایند شناور در گونه هایی که در آبهای شیرین تخم ریزی می کنند رسوبی می باشند. ماهیان کفال بویژه در مناطق حاره، معمولا در فصول سرد سال تخم ریزی می نمایند و نحوه تخم ریزی آنها بدین صورت است که کفال های بالغ در نزدیک ساحل دسته هایی را تشکیل می دهند وبرای تخم ریزی به دور از ساحل شنا می کنند. تخم ریزی در آبهایی کاملا در وسط دریا ومعمولا در کنار فلات قاره در بالای آبهای عمیق، صورت می گیرد(Fazli *et al.*, 2008).

تخم ریزی کفال ماهیان بر طبق یافته های Tomazo, 1940 در مدیترانه در ماههای Juneتا may اتفاق می افتد.تخم ریزی در این گونه در دریای خزر از اواسط تیر- درجنوب دریای خزر آغاز گشته وتا اواسط مهر ادامه می یابد. در زمان تخم ریزی دما بین ۲۹-۱۷ درجه سانتیگراد می باشد .قطر تخم ها حدود$_{mm}$۰/۸ بوده وبصورت شناور بر روی آب می مانند این ماهی دارای ارزش اقتصادی زیادی می باشد.زمان صید این ماهی در دریای خزر از آذر تا بهمن می باشد(Probatove and Tereshchenko, 1951;Zablotski, 1996)

- **وابستگی به فاکتورهای غیر زنده محیطی**

- تحمل حرارتی

ماهیان از نظر تحمل درجه حرارت محیط به دودسته تقسیم می شوند:

۱- ماهیانی که نوسانات درجه حرارات محیطی آنها به هم نزدیک است و استنوترم نامیده می شوند.

۲- ماهیانی که نوسانات درجه حرارت آب را بیشتر تحمل می نمایند که یوری ترم نامیده می شوند.

کفالها ماهیان گرما دوستی هستند اما به طور کلی آنها یوری ترم بوده ودماهای از ۴-۳ درجه سانتی گراد تا ۳۵ درجه سانتی گراد را تحمل می نمایند (Dmitriev, 1964Papasotiropolous *et al.*, ;Nikolskii, 1963;Elzaeem,2011

2007) در طبیعت کفالهای جوان قادرند که دمای $38^{\circ}c$را نیز تحمل نمایند (Berg, 1965).کفال اقیانوس آرام(Mugil so –iuy) قادر به تحمل کاهش دمای آب تا حدود صفر درجه می باشد این دما برای کفالهای دریای سیاه کشنده می باشد وبطور کلی کفالها نسبت به کاهش درجه حرارت آب حساسیت فوق العاده ای داشته و به محض کاهش درجه حرارت آب بسوی آبهای گرمتر دریا حرکت می کنند. البته حد نهایی سازگاری حرارتی متاثر از گونه، اندازه ، شرایط وعوامل مختلف فیزیولوژیک و شرایط قبلی محیطی می باشد. طی تحقیقاتی نشان داده شد که افزایش دمای سازگاری(Accimation temperature) باعث افزایش تحمل حرارتی(thermal tolerance) می گردد.(Harrison and Howes , 1991;Kaya *et al.,* 1998;)

بطور کلی ماهیان کفال پوزه باریک قادرند دمایی بین ۵تا۲۷ درجه سانتی گراد را تحمل کنند.

- تحمل شوری

ماهیان از نظر قدرت تحمل شوری به دو دسته تقسیم می گردند:

۱- ماهیانی که دارای قدرت تحمل شوری های مختلف می باشند ویوری هالاین نامیده می شوند.

۲- ماهیانی که تغییرات شوری باعث مرگ آنها می گردد و استنوهالاین نامیده می شوند .

کفالها به شدت از ماهیان یوری هالاین بوده ودر آبهای شیرین تا آبهای با درجه ی شوری۳۸ppt زندگی می نمایند.(King, 2007;Nelson, 2006)

گرچه کفالها اغلب در شوری های ۳۰ppt وکمتر یافت می شوند اما امکان دارد در آبهای باشوری بالا بخوبیرشد نمایند. ماهیان کفال پوزه باریک قادرند شوری۲۸ ppt-۱۱را تحمل کنند.

- تحمل مقادیر اکسیژن

بیشتر کفالها نسبت به حضور مقادیر مختلف اکسیژن در آب بی تفاوت هستنداما مقادیر اکسیژن کمتر از ۲mg/lit را تحمل نمی نمایند(Kaya *et al.,* 2000).

- **تنظیم اسمزی**

بیشتر کفالها کاتادروموس(Catadromous) بوده و در مراحل اولیه زندگی خود به آبهای با درجات شوری پایین می روند اما در مورد مکانیسم تنظیم اسمزی آنهااطلاعات کمی وجود دارد بنظر می رسد که مکانیسم های فیزیولوژیک مسئول تنظیم اسمزی در کفال های جوان و کفالهای بالغ یکسان باشند. (El-Zaeem, 2011)

- **الگوهای مهاجرتی**

محیط آبی که ماهیان در آن زندگی می کنند دارای وضع ثابتی نمی باشند، بلکه همواره دچار تغییرات هیدولوژی وبیولوژی به طور متناوب و مداوم می شوند وماهی تحت نظام این تغییرات قرار می گیرد، از طرف دیگر در خود ماهیان بر اثر رشد و نمو تغییراتی پدیدار می گردد که در نتیجه ارتباط ماهی را با محیط خارج تغییر می دهد وماهی برای برقرار کردن موقعیت مناسب خود ناچار است به هر سو حرکت کند. بنابراین نه تنها تغییرات محیط خارجی، بلکه علل و تغییرات محیطی داخل بدن ماهی نیز کفال ماهیان را به مهاجرت مجبور می کند. بدین صورت که کفال ماهیان نسبت به تغییر درجه حرارت آب حساسیت فوق العاده ای از خود نشان می دهند به محض کاهش دما حرارت آب به سوی آبهای گرم تری در دریا حرکتمی کند (Bentuvia, 1986). همانند دیگرکفال ماهیان این گونه هم در دریا تولید مثل میکند، پس از اینکه بچه ماهی درآمد یک مهاجرت غذایی برای توسعه وتکامل به تالاب های غنی از غذا ،رودخانه ها ویاحتی دریاچه ها دارند (Dmitriev, 1964).

بطور کلی اکثرکفال ماهیان پس از تفریخ تخمها، دگردیسی لاروها ویک دوره رشد کوتاه مدت،ماهیان جوان تمایل به مهاجرت به آبهای نزدیک به ساحل دارند ودر درجه اول به مرداب ها و خورها می روند، مهاجرت بچه ماهیان کفال به آبهای ساحلی یک مهاجرت فعال می باشد وجالب توجه اینکه هیچ شواهد دال بروجود لاروهای کفال ماهیان در خورها وجود ندارد.طیف مهاجرت بچه ماهیان کفال به طرف آبهای ساحلی وخورها از نظر مکان و زمان بسیار متفاوتمیباشد(Abdulsamadov*et al*., 2004;Tereshnko, 1950).

این ماهیان در آبهای سطحی در عمق ۵تا۷۰۰متری زندگی کرده و در پاییز،زمانی که دما افت میکند به جنوب دریای خزر مهاجرت می کنند.ودر دریای خزر تا ۱۰ سالگی عمر می کنند.

٤-٤-١- توزیع جهانی

کفال ماهیان یک توزیع جهانی درآبهای جهان دارند ودر دریاهای گرمسیروحاره ای سازگار یافته اند(Rossi *et al.*, 1998).آنها بامحیط های دریا،مصب وآب شیرین در تمامی عرض های جغرافیایی سکنی گزیده اند. همچنین در اقیانوس اطلس از مصبGirondeومدیترانه ودریای سیاه گسترش دارند.

این ماهیان دردریای سیاه ومدیترانه در طول سواحل اقیانوس اطلس تا آفریقای جنوبی انتشار و پراکندگی دارند، یک گونه پلاژیک بوده که در جایگاه های مختلف از آبهای کم عمق ولب شور وآبهای دریایی تا تالاب ها، مصب ها، رودخانه ها و دریاچه های شیرین زیست میکند(Berg, 1948).

کفال پوزه باریک یک توزیع گسترده ای در اطراف مدیترانه ، دریای سیاه، سواحل اقیانوس اطلس از مراکش تا خلیج Biscay دارد(Tomazo, 1940).

٥-٤-١- توزیع جنس در دریای خزر

کفال ماهیان در سراسر قسمت جنوبی ومیانی دریای خزر توزیع شده اند و برخی از گونه ها نیز در شمال دریای خزر یافت می شوند. بیشترین تمرکز جمعیت هادر فصل زمستان در قسمت جنوبی دریای خزر است.(Bentuvia, 1986).

۵-۱- تنوع ژنتیکی

۱-۵-۱- مفهوم تنوع ژنتیکی

تنوع ژنتیکی،هم تنوع درون نژادی وهم تنوع بین نژادی را شامل می شود. اصلاح نژادگران از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی منطبق براحتیاجات خود، بهره گیری می نمایند، فقدان تنوع قدرت انتخاب موجود برای رفع نیازهای غیر قابل پیش بینی آتی را محدود می سازد. تنوع درون نژادی پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است ولی تنوع ژنتیکیبین نژادی را نمی توان براحتی بازسازی نمود. هر نژاد یا سویه حاصل فرآیندهای جهش،رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است. فشار انتخابی در طی این زمان تحت تاثیر آب و هوا،انگل ها وبیماری های بومی، تغذیه ومعیارهای وضع شده از سوی انسان تغییر کرده است. بنابراین می توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژن ها است که مخزن ژنی آن نژاد رامی سازند(Blel*et al.*, 2008;Ferguson *et al.*, 1995).

در کشورهای پیشرفته،تاکنون از نظر از دست رفتن تنوع ژنتیکی بیشترین توجه به نژادهای نادر معطوف بوده است. ولی در مدیریت جهانی منابع ژنتیکی حیوانی، نژادهای در معرض خطر وسایر نژادها تفاوتی اساسی ندارند وتفاوت میان نژادهای کم کاربردیا بدون کاربرد ونژادهای دارای کاربرد رایج یا دارای کاربرد احتمالی در آینده ای نزدیک، اندک می باشد. با حفظ نمونه هایی از تمامی نژادهای یک گونه که دارای بیشترین تفاوت ژنتیکی می باشند، می توان حداکثر تنوع ژنتیکی را حفظ نمود(Feral, 2002).

۶-۱- نشانگرهای ژنتیکی

۱-۶-۱- انواع نشانگرها

- **نشانگرهای مورفولوژیک[۸]**

نشانگر های مورفولوژیکی به علائمی از قبیل فلس ها،اتولیت ها،پارازیت ها وترکیب عنصری قسمت های مختلف بدن گفته می شود که به طور مستقیم در فنوتیپ جانور وگیاه قابل تشخیص و توارث پذیر هستند.طول کل ، طول چنگالی، طول پوزه، ارتفاع سر، قطر چشم ،و...چند نمونه از صفات مرفولوژیک قابل اندازهگیری در ماهیان می باشند (Anene, 1999).

[۸] - Morphological Markers

اگرچه نشانگر های مورفولوژیکی به طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته اندولی دارای محدودیت های اساسی همچون تعداد کم این نشانگرها، دقت کم، تاثیر پذیری شدید از محیط ، مرحله رشد و سن ووجود غالبیت در بروز می باشند.اساس و تفسیر ژنتیکی بسیاری از این نشانگرها نامشخص بوده و شناسایی افراد ناخالص از خالص ممکن نیست، امابه دلیل ساده وکم هزینه بودن وعدم نیاز به امکانات پیچیده و گران قیمت برای اندازه گیری ها محققین بسیاری از این نشانگرها استفاده می نمایند (Avise, 1994).

- **نشانگرهای سیتوژنتیک**

وجود اختلاف در شکل،اندازه وتعداد کرموزوم ها می تواند بیانگر وجود اختلاف ژنتیکی باشد. بنابراین، این نشانگرها نمایانگر تنوع در ساختمان کروموزم ها می باشند.تلوسانتریک ها، ایزوکروموزم ها،جابجایی والگوهای بایندینگ از این گروه هستند.مطالعات سیتوژنتیکی به منظور مقایسه اختلافات موجود بینافراد یک گروه وآشکار شدن مسیر تکاملی تغییرات در کروموزم ها ی تشکیل دهنده ژنوم، تفکیک گونه ها و بعضا جمعیت های مختلف از نظر تعداد کروموزم ها انجاممی گیرد(Avise,1998).

- **نشانگرهای مولکولی**[۹]

هرگونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNAکه از والدین به نتاج قابل انتقال باشد به عنوان نشانگر مولکولی به کارگرفته می شود به دودسته نشانگرهای مبتنی بر پروتئین و نشانگرهای مبتنی بر DNA تقسیم می شوند.

-نشانگر های پروتئینی

برخی از تفاوت ها در ترتیب نوکلئوتیدی DNA بین دو موجود ممکن است که به صورت پروتئین هایی با اندازه های مختلف بروز کند کهاز طریق بیوشیمیایی قابل آنالیز و مطالعه است.این نشانگر ها را نشانگر پروتئینی می گویند که به دو نوع آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می شوند. مطالعات ابتدائی برای شناسایی جمعیت های ماهی با استفاده از نشانگرهای غیر آنزیمی مثل هموگلوبین و ترافسفرین بود که به سرعت به سمت پروتئین های آنزیمی تمایل پیدا کرد(Beaumont, 1994).

[۹] -Molecular Markers

آنزیم های موجود در هر فرد ممکن است دارای بیش از یک فرم مولکولی باشند.فرم های مولکولی متفاوت یک آنزیم در یک فرد را ایزوزایم می نامند. ساختمان اولیه ایزوزایم ها از این جهت متفاوتند که به وسیله ژن های متفاوت کدگذاری می شوند ودر نتیجه چنین ساختمان مولکولی متفاوت یک آنزیم که دارای فعالیت آنزیمی (کاتالیزوری) مشابه ومشخص هستند را اصطلاحا ایزوزایم گویند. محصولات ایزوزایم دوآلل متفاوت در یک جایگاه ژنی به عنوان آلوزایم شناخته می شوند. به عبارت بهتر آلوزایم ها به زیرگروهی از ایزوزایم ها اطلاق می شوند که از آلل های مختلف یک جایگاه ژنی معین ایجادمی شوند هنگامی که دو آلل از یک جایگاه ژنی بوجود می آیند، شکل های مختلف الکتروفورتیکی هنوز نقش های معینی را ایفا می کنند و پروتیئن های حاصل از این آلل ها تحت عنوان آلوزایم شناخته می شوند(Carvalho ,1998).

از عیوب نشانگرهای پروتئینی می توان به نیاز به مقدار زیادی نمونه تازه یا تازه فریز شده (کشتن موجود زنده)، پلی مورفیسم پایین، محدودیت روش های رنگ آمیزی و مشکل بودن آنالیز داده ها بخصوص در پلی پلوئیدها اشاره کرد.(Beaumont, 1994).

- **نشانگرهای DNA**

تفاوت های موجود در سطح DNA که هیچ گونه تظاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می کنند ونه در ردیف اسیدهای آمینه رشته های پلی پلوئیدی تاثیر برجا می گذارند درواقع نشانگرهای DNAچند شکلی موجودات را در سطح DNA تعیین می کنند. این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می کنند ودر نتیجه توالی های کد کننده وغیر کد کننده را دربر می گیرد. بررسی اینگونه تفاوت ها که فقط از طریق تجزیه وتحلیل مستقیم توالیDNA امکان پذیر است را نشانگرهای مولکولی در سطح DNA می گویند(Liu, & Cordes., 2004).

فراوانی بالا، هم بارز بودن اکثر این نشانگرها،امکان به کارگیری آنها در تمام مراحل زندگی حتی دوران جنینی، عدم تاثیر از شرایط محیطی، امکان استفاده از نرم افزارهای رایانه ای مختلف در آنالیز داده ها، قدرت تمایز بالا این نشانگر ها ونمایان ساختن تفاوت بین ترتیب های غیر کد کننده علاوه بر اختلاف موجود در ترتیب های کدکننده از مزایای این نشانگرها می باشد. این نشانگرها به دو دسته مبتنی بر PCRوغیر مبتنی برPCRتقسیم می شوند. انواع مختلفی از این نشانگرها، با تفاوت های بسیاری از لحاظ تکنیکی، روش تولید، نحوه کاربرد، امتیاز بندی ،تجزیه و تحلیل وتفسیر نتایج به سرعت ابداع گردیدند وتحولی عظیم در اطلاعات تنوع ژنتیکی ایجاد

کرده اند وبه عنوان ابزارهای ضروری در ایجاد اهدافی چون نگهداری بیولوژیک مطالعات تکاملی ونیز پروژه های نقشه برداری ژنی در آمده اند (Brown & Epifanio., 2003).

RAPD[۱۰]-

درزمانی کمترازیکسال دو گروه مستقل(Williams *et al.,* 1990;Welsh and Meclelland,1990)روش جدیدی را برای ارزیابی پلی مورفیسم براساس واکنش زنجیره ای پلیمراز درانستیتوی تحقیقاتی بیولوژیک کالیفرنیا ارائه کردند. این تکنیک انگشت نگاری قابل تشخیص ژنوم بدون استفاده از سیستم های رادیواکتیو وتوالی یاب DNAژنوم را برای ارزیابی پلی مورفیسم براساس واکنش زنجیره ای پلیمراز فراهم کرد.

هر چند اساس این دو تکنیک یکسال بوده است ولی Welsh وMeclelland در سال ۱۹۹۰ آن را[۱۱]AP-PCRو Williams وهمکاران در سال ۱۹۹۰ آنرا RAPDنامیدند.روش RAPDمشابه باAP-PCRبوده ودر هر دو از یک آغازگر استفاده می شود ولی غلظت آغازگر مورد استفاده در آن حدود ۱۰ برابر بیشتر است. پلی مورفیسم مشاهده شده به دلیل تفاوت توالی در یک یا هردو جایگاه ژنی اتصال آغازگر است که در صورت حضور یا فقدان یک باند متجلی می شود.آغازگرهای RAPDمختص به ژنوتیپ،گونه وجنس خاص نیست و قابل استفاده در تمام موجودات می باشد. این روش گرچه آسان وکم هزینه است ولی معایب فراوانی دارد که از جمله آن می توان به عدم تکرار پذیری نشانگرهای RAPD، حساسیت فوق العاده به آلودگی،عدم تشخیص سیستم آللی(به دلیل غالب و مغلوبی بودنRAPDتشخیص هموزیگویتی و هتروزایگوتی غیر ممکن است)، امتیازدهی باندها و نامعلوم بودن قرابت و شباهت باندهائی که بر روی ژل الکتروفورزی دارای مهاجرت یکسان هستند، اشاره نمود(Partis & Wells, 1996).

AFLP[۱۲] -

Zabeau وVosدر سال ۱۹۹۳ روش جدیدی را تحت عنوان چندشکلی قطعات برش یافته انتخابی ابداع نمودند که حاصل آن نشانگر AFLPاست. این نشانگر ژنتیکی براساس آنالیز قطعات برش یافته DNA بنیان نهاد شده است که در آن از تکنیکDNA برای تکثیر قطعات مورد نظر وشناسایی آن استفاده می شود به علت استفاده از واکنش PCR، این تکنیک متفاوت از روشAFLPمی باشد(Agresti *et al.,* 2000). درحقیقت این روش ترکیبی از

[۱۰] -Random Amplification Polymorphic DNA
[۱۱] -Arbitrary Primed DNA
[۱۲] -Amplified Fragment length Polymorphism

AFLPو واکنش زنجیره ای پلیمراز است.در مرحله اولDNA مورد نظر توسط دو آنزیم برش دهنده هضم می شود به طوری که دو انتهای برش یافته دارای فرم برشی متفاوت می باشند. سپس دو آداپتور(DNA دو رشته ای به طول حدود۱۸ جفت باز که یکی از آنها از انتهای آن مکمل دو انتهای برش یافته باشد) به دو انتهای برش یافته اتصال می یابد. در مرحله بعد با استفاده از روشPCRوبه کمک آغازگرهای طراحی شده براساس توالی آداپتورها(حدود ۱۸ جفت باز) قطعات مورد نظر تکثیر می شوند که دارای تکرار پذیری بالایی هستند ودر یکواکنش مناسب بین ۵۰ تا۱۰۰ باز قابل تشخیص است. براین اساس مقدار زیادی باند پلی مورفیک جهت بررسی تنوع ژنتیکی یا تهیه نقشه ژنتیکی امکان پذیر است (Liu *et al.*, 2003). نشانگرAFLPغالب است وشناسایی وضعیت هتروزیگوتی از هموزیگوتی میسر نیست.(نقوی وهمکاران، ۱۳۸۸).

-ریز ماهوارها[۱۳]

DNA ماهوارهای زمانی مطرح گردید که معلوم شد در سانتریفیوژ کلرید سزیم، بخش کوچکی از DNA کل باند ماهواره ای تشکیل می دهد که از باند ژنومی اصلی جدا قرار می گیرد که اینبخش کوچک دارای توالی های ساده ای هستند که کمتر از ۵۰۰ جفت بازدارند که هزاران یا میلیون ها بارتکرار می شوند بعدها انواع دیگری از DNA ماهواره ای باواحدهای تکراری بسیار کوتاهتر در طول توالی یابی ژن انسولین انسانی کشف گردیدکه تحت عنوان مینیستلایت ها[۱۴]شناخته می شوند وشامل واحدهای تکرای ۶۴-۱۵ جفت باز می باشند. سومین گروه ریز ماهواره ها می باشند که تحت عناوین[۱۵]STRیا[۱۶]SSRشناخته می شوند توالی های تکراری DNA هستند که دارای نگاره مرکزی یا موتیف تکرار شونده ای به طول یک تاشش جفت باز می باشند دوگروه اخیر بنام[۱۷]VNTRنیز شناخته می شوند(O'Reilly and Wright,1995).

- پلی مورفیسم تک نوکلوئیدی(SNP)

پلی مرفسیم تک نوکلوئیدی (SNP) پلی مرفیسم هایی را که با جهش های نقطه ای بوجود آمده را شرح می دهند که ناشی از بازهای متناوبی که شامل الل های مختلفی در یک جایگاه نوکلوئیدی داخلی یک لوکوس

[۱۳] -Satellites
[۱۴] -miniSatellites
[۱۵] -Short Tandem Repeat
[۱۶] -Simple Sequence Repeat
[۱۷] -Variable Number Tandem Repeat

میباشد(Ahmadian *et al.*, 2000). بیشتر اختلاف توالی ها بعلت جانشینی و تعویض بازها در اولین شروع توالی یابیDNAدر ۱۹۷۷ بخوبی توصیف شد، اما توانایی سریع ژنوتایپیSNP در تعداد زیادی از نمونه ها تازمانی که کاربرد وتکنولوژیgene chipدر واخر ۱۹۹۰ به کار برده شد ممکن نبود از طرف دیگر مارکرهای SNP یک نقطه مرکزی مناسب در توسعه مارکرهای مولکولی هستند از زمانی که آنها بیشترین فراوانی پلی مرفسیم در هر موجود زنده ای را دارند،تطابق پذیری به صورت خودکار دارند وپلی مرفیسم های مخفی را کهقابل شناسایی با دیگر مارکرها وروش ها نیستند آشکار می کند(. از نظر تئوری هرSNP در لوکوس می تواند به اندازه ۴ الل تولید کند که هرکدام محتوی یکی از چهار باز در مکان های SNP است:AوTوCوG . به طوری عملی اگر چه بیشتر مارکرهای SNP معمولا به یک یا دوالل محدود می شوند(بیشترشامل پیریمیدنC/Tویا پورین A/Gمی باشد) وبه صورت دو اللی مورد توجه قرار می گیرد. به طور آشکار،PICآنها بیشتر از مارکر میکروستلایت چند اللی نمی باشد،اما این نقصان توسط فراوانی زیاد آنها بالانس وجبران می شود. مارکرهای SNP وراثتی می باشند از اینرو بعنوان مارکرهای Co-dominantشناخته می شوند. روش های زیادی نزدیک به روشSNP به کار برده شده است شامل آنالیز(Hecker *etal., 1999*)SSCP،آنالیز دوتایی مختلف (Sorrentino, 1992)وتوالی یابی مستقیم DNA.توالی یابی DNAدقیقترین وبیشترین کاربرد استفاده برای کشفSNP را داشته است. توالی یابی تصادفی Shotgun،توالی یابی ampliconبا استفاده ازPCRوآنالیز مقایسه ای EST،معروف ترین روش های توالی یابی برای SNP هستند.

– Expressed sequence tags (EST)

EST توالی های یک طرفه بوجود آمده از توالی های تصادفی از کلون هایDNAهستند(Adams *et al.*, 1991). روش EST یک روش کارآمد برای مشخص کردن وشناسایی ژن ها وتجزیه وتحلیل بیان آنها بوسیله پروفایل های بیان شدن آنها می باشد(Francoet *al*.,1995;.,1996Azam *et al*). روش EST یک روش کارآمد برای مشخص کردن ژن ها و بررسی بیان آنها بوسیله پروفایل های بیان ژن است.برای نقشه های ژنومی، مارکرهای EST بیشترین استفاده در نقشه های ژنومی در ژنوم حیوانات نظیر گله های حیوانات وخوک دارد،که تصاویرهیبریدی پرتوی برای نقشه های مارکرهای غیرپلی مرفیک موجود است(Coxet *al.*, 1990).مارکرهای ESTs برای نقشه های ژنومی در گونه های آبزی مفید است اگر پلی مرفیک های ESTs شناسایی شده باشند(Liu *et al.*, 1999).همچنین،

ESTs اگر با کمک مارکرهای میکروستلایت بکار برده شوند، می تواندبصورت خطوط ژنتیکی نقشه کشی شود(Serapion *et al.,* 2004).

– مارکرهای DNAمیتوکندری

بطور کلی مطالعات بر روی گونه های مهره دار نشان داد که تنوع توالی یابی جمع شده در میتوکندری بیشتر از DNA هسته ای می باشد (Brown, 1985).این حالت می تواند به دلیل میزان جهش سریع در mtDNA باشدکه شاید نتیجه نبود مکانیسم باز سازی طی همانند سازی باشد(Wilson*et al.,* 1985) وتاثیر کوچکتر اندازه جمعیت بعلت وراثتی بودن مادری در ژنوم هاپلوئیدی میتوکندری (Birky *et al.,* 1989) میباشد.تقریبا تمام مولکول mtDNAبه غیر از تقریبا1kbکه ناحیه کنترلی (D-loop) می باشد رونویسی شده است، ناحیه کنترلی جایی است که از آنجا همانند سازی ورونویسی مولکول شروع می شود.به طور کلی ،نواحی غیر کد کننده (non-coding)نظیر D-loopسطوح بالایی از تنوع نسبی در توالی های کد شده نظیر ژن*b*Cyctochromeنشان می دهد (Brown, 1985) ،که احتمالا بعلت کاهش وظایف تحمیل شده وانتخاب فشار آزاد می باشد. آنالیز های مارکرهایmtDNAبه طور گسترده برای بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر به طور گوناگون در ماهیان شاملeels(Avise *et al.,* 1986) ، bluefish((Graves *et al.*,1992)،red drum(Gold et*al.,* 1993)،snappers(chow *etal.,* 1993)استفاده شده است. مارکرهای میتوکندری در میان نسل شناسی و تبار شناسی آبزیان مشهور است ودر بخشی بعلت استفاده آنها در شناسایی ذخایرمی باشد(Beniz *et al.,* 2002) .در روزهای اولیه آنالیز های مولکولی وجود به علت سطوح بالای پلی مرفیسم درmtDNAنسبت به آلوزایم ها در ژنتیک آبزیان برای شناسایی جمعیت بکار برده شد (Cronin *et al.,* 1993). بعلت اینکه وراثت پذیری این مولکول از نوع مندلی نمی باشد. مولکولmtDNAباید به صورت لوکوس تکی در بررسی های ژنتیکی مورد توجه قرار گیرد(Avise, 1994).بعلاوه چونکه مولکول mtDNAوراثت مادری دارد،فایلوژنی و ساختارهای جمعیت استنتاج شده از داده های mtDNAنمی تواند بیان کننده آن ژنوم هسته ای که بعلت نوع مهاجرت به خارج(Birky *et al.,* 1983)یا وارد شدن به داخل جمعیت (Chow & Kishino, 1995)باشد. بعلاوه مارکرهای mtDNAتحت مشکلات مشابه موجود برای دیگر مارکرهایDNAقرار داد. نظیر جهش برگشت (مکان هایی که آماده رفتن برای جانشینی هستند به مکان اصلی بر می گردند)،جانشینی موازی (جهش ها در مکان های مشابه در ردیف های مستقل اتفاق می افتد) و میزان هتروزیگوتی یا نقاط تند

جهشی(اختلافات شدید در میزانی که مکان هایی که تحت جهش بودند در مقایسه با دیگر مکان ها در نواحی مشابه)(Billington and Hebert, 1991).

۲-٦-۱- گرایش ها در استفاده از مارکرها

گرایش استفاده در مطالعه مارکرهای مولکولی در تعداد مقالات منتشره آنها بر می گردد. بطورکلی استفاده از مارکرهای آلوزایمی کاهش یافته است،مارکرهای AFLP،میکروستلایت وSNP هنوز در فاز رشد وپیک خود قرار دارند.این مارکرها همچنین به طور مشابه تکامل ژنومی را منجرمی شوند.سرعت کاربرد مارکرهابه طور شدیدی متنوع است.بطور کلی بیش از ۱۳سال برای مارکرهایRFLPبرای اینکه به تعداد ۳۰۰ مقاله در هر سال به انتشاربرسد(از سال۱۹۸۰)،۹سال برای مارکرهای میکروستلایت(ازسال۱۹۸۹)،۱۳سال برای مارکرSNP (ازسال۱۹۹۶)،اماتنها۴سال مارکرRAPDبه این تعداد دست یافت و مارکرAFLP پس از۷سال (ازسال۱۹۹۵)به این تعداد دست یافتند (Liu & Cordes, 2004). به طورحتم این بازگوکننده (ازسال۱۹۹۰)سادگی تکنیک وقابلیت اجرای سیستم های مارکرمربوطه می باشد.ماکرهایSNP،ماکروستلایتزمانبر هستند، در حالیکه مارکرهای RAPDوAFLP نیاز به زمان و تلاش کمتری دارند.بویژه مارکرهای RAPDقابلیت اجرای سریع دارند زیرا آنها نیازمند منابع زیاد،تجهیزات و تکنیک دقیق وفنینمی باشند.در حالی که تعدادآزمایشگاه هایی که برای مارکرهایAFLP،میکروستلایت وSNPاستفاده می شود کم میباشد زیرا آنها نیازمند بررسی ها وسرمایه گذاری بیشتر درتجهیزات یا تکنیک های فنی بیشتر می باشند (Liu & Cordes, 2004).

این مارکرها شاید بیشترین اثر را در نقشه های ژنومی دارند حتی اگرتعدادکمی ازآزمایشگاه ها بتواند تعداد زیادی ازاین مارکرها را توسعه دهد.بعنوان نتیجه، این مارکرها اثر زیادی بر روی ژنتیک آبزیان دارد، از زمانیکه پروژه های ژنتیک آبزیان نیازمندنقشه های ژنومی می باشند این مارکرها در این شاخه توسعه یافته است.اگرچه کاربردهای ژنتیک تا به امروز در آبزیان نظیر اختصاصی کردن نسب وتعیین تغییرپذیری استفاده زیادی داشتند .به طور احتمالی تقاضا برای مارکرهای ژنتیکی نوع TypeI به طور سریع افزایش یابد (Congiu *et al.*,2001 ; Young *et al.*, 2001).

جدول ۲-۱- انواع مارکرهای DNA ،ویژگی آنها وکاربرد آنها (Liu & Cordes., 2004)

نوع مارکر	نام مستعار	اطلاعات قبلی مولکولی	نوع وراثت	لوکوس های تحت بررسی	تعدادالل احتمالی	کاربردهای اصلی
Allozyme	_	بله	مندلی، codominant	تک	۲-۶	نقشه های پیوستگی،مطالعات جمعیتی
Mitochondrial DNA	mtDNA	خیر	وراثت مادری	_	هاپلوتایپ متعدد	شناسایی سویه مادری مطالعات جمعیتی
Restriction fragment length polymorphism	RFLP	بله	مندلی، codominant	تک	۲	نقشه های پیوستگی
Random amplified polymorphic DNA	RAPD	خیر	مندلی، dominant	متعدد	۲	مطالعات جمعیت، شناسایی هیبرید
Amplified fragment length polymorphism	AFLP	خیر	مندلی، dominant	متعدد	۲	نقشه پیوستگی، مطالعات جمعیت
Microsatellites	SSR	بله	مندلی، codominant	تک	متعدد	نقشه پیوستگی، مطالعات جمعیت، آنالیزصفات اصالتی
Expressed sequence tags	EST	بله	مندلی، codominant	تک	۲	نقشه پیوستگی، نقشه های پیوستگی
Single nucleotide Polymorphism	SNP	بله	مندلی، codominant	تک	۲-۴	نقشه های پیوستگی،مطالعات جمعیتی

۳-۶-۱-کاربرد مارکرهای DNAدرژنتیک آبزیان

- **نشانگرهای ژنتیکی و کاربرد آن ها جهت بررسی جمعیتی و روابط خویشاوندی**

هر فنوتیپ یا صفت(قابل توراث) موجود زنده که با صفت معادل خود در موجود زنده دیگر تفاوت داشته باشد یک نشانگر محسوب می شود.نشانگر های ژنتیکی جایگاههای خاص روی یک کروموزم دارند که به عنوان نشانه های اختصاصی برای تجزیه و تحلیل های ژنومی به خدمت گرفته می شوند.درواقع تفاوت موجود بین ردیف DNAکروموزم در افراد یک جامعه ویا نژاد که از افراد به فرزندان آنها منتقل می گردد می تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شود یا به عبارتی هر آنچه که در میان افراد،جمعیت ها، گونه ها، نژادها و یا سویه های مختلف به لحاظ ژنتیکی تفاوت داشته وسبب تمایز آنها از یکدیگر گرددبه عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می شود. نشانگرهای ژنتیکی به عنوان ابزاری برای تهیه نقشه های پیوستگی مولکولی وارزیابی جایگاه های ژنتیکی چند شکلی در صفات اقتصادی کمی کاربردهای بالقوه ای را در برنامه های اصلاحی حیوان وگیاه پیدا کرده اند، چند شکلی بودن وتوارث پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی می باشند (Yue *et al.*,2002). از مهمترین ویژگی های یک نشانگر برتر می توان به این موارد اشاره نمود:

۱-تشخیص آسان همه فنوتیپ های ممکن (افراد هتروزیگوت وافراد هموزیگوت)

۲- نداشتن تاثیر بر روی آلل های موجود در سایر جایگاه های ژنی نشانگر(نداشتن اپیستازی)

۳-تظاهر در مراحل اولیه نمو

۴-حداقل بودن یا عدم اثر متقابل با نشانگر های دیگر

۵- پیوستگی بسیار نزدیک باژن های مورد نظر

۶- توارث پذیری کامل

۷- آسان بودن اندازه گیری

۸- چند شکلی بالائی

۹- پراکندگی یکنواخت در سراسرژنوم

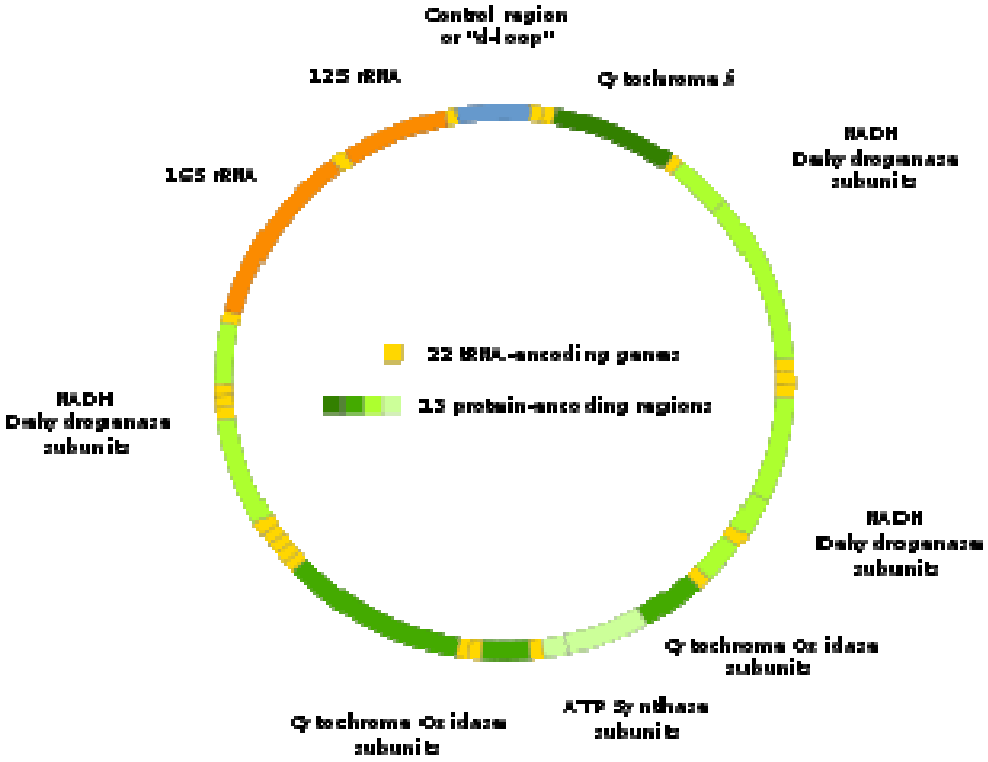
۱۰- دارای جایگاه معین و شناخته شده

(Brown, 1985;Liu& Cordes, 2004;Yue *et al.*, 2002).

۱-۷- DNA میتوکندریایی(mtDNA)

۱-۷-۱- DNA میتو کندریائی ومطالعات سیستماتیک مولکولی

DNA میتوکندریایی به صورت دو زنجیره حلقوی ودر نسخه های متعددو یکسانی درماتریکسمیتو کندری دیده می شوند. اندازه DNAمیتو کندری در اکثر ماهیان حدود500 ± 16500جفت باز می باشد (Rezvani, 1997)ودر گونه های جانوری ژنوم میتو کندری دارای ۳۷ ژن که شامل ۱۳ ژن رمز دهنده پروتئین،۲۲ ژنrRNAویک ناحیه بعنوان آغاز همانند سازی می باشد. (Moritz*et al.*, 1987).بزرگترین اندازهmtDNAشناخته شده متعلق به اسکالوپ بوده که حدود۱۴/۵kb بوده است(Moritz et al, 1987).در اکثر مواقع DNA میتوکندریایی به صورت حلقه های دو ریشه ای تکی می باشد اما گاهی اوقات به جای یک حلقه دویا سه حلقه ای نیز دیده می شوند این حلقه ها بعضی اوقات به صورت طولی به هم متصل می شوند و حلقه بزرگتری، به طول دوبرابر حلقه های اولیه بوجود می آیند.



شکل ۱۰-۱-DNA میتوکندریایی

در برخی از موجودات نظیر مخمرها و کپک ها، ژنوم میتوکندی ، به جای حلقه، خطی وبه صورت میله می باشد(هاشم زاده، ۱۳۸۴). نقشی که DNAدر میتوکندری ایفا می نماید همان نقشی است که DNA هسته ای در سلول های یوکاریوت عمل می کند.یعنی تولید وسنتز rRNAوtRNAوmtRNAکه نوع آخری به پروتئین ترجمه می شود. یک مولکول میتوکندری معمولا بین دوتاشش نسخه از DNA را می تواند دارا باشد وبدین ترتیب DNA های میتو کندریایی در یک سلول تا تعداد $۱۰^{۸}$یا بیشتر می تواند وجود داشته باشد.به طور کلی کبد، تخمدان و سلول های تخمک وماهیچه ،بافتهای غنی از میتوکندری می باشند(Chang *et al.*,1987) .در گونه های جانوری،ژنوم میتوکندر ریایی دارای ۳۷ ژن می باشد که عبارتنداز۱۳ ژن رمز دهنده پروتئین (این ژنها معمولا در تولیدATPبه وسیله اکسیدایتو فسفوریلاسیون نقش دارند. ۲۲ ژن tRNA، ۲ ژنrRNA ویک ناحیه غیر رمزدهنده ویا D-loopکه به عنوان ناحیه شروع همانند سازی می باشد(Rezvani,1997).

همانند سازیmtDNAباهمانند سازی سایر DNA های حلقوی تفاوت دارد.درmtDNAآنزیم DNAپلی مراز گاها کار همانند سازی را به عهده دارد(meyer, 1993). سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است .ژنهای tRNAوrRNAنسبت به سایر قسمتها محفوظ تر هستند. درمطالعات مختلف دومنشا پدری ومادری برایmtDNAثابت شده است.

هرچند که ژنوم میتو کندری جانوری اغلب منشاء مادری دارد ولی منشاءپدری نیز در دروزوفیلا و موش گزارش شده است(Avise,1989;Meyer, 1993).مطالعات انجام شده، نشان داده که mtDNA بسیار متنوع بوده وبرای تفکیک ژنتیکی جمعیتها،تکامل ومطالعات سیستماتیک مورداستفاده قرارمیگیرد(Dodgsonetal.,1997).

۲-۷-۱- مزایای استفاده از mtDNA

ماده ژنتیکی اعم از هسته ای یا غیر هسته ای در معرض تغییرات وآسیب های دائمی قراردارد. عوامل فیزیکی وشیمیایی از دورن یا بیرون از موجود زنده سبب جابجایی در ترکیب نوکلئوتیدیDNA به هنگام همانند سازی می شوند.ژنوم میتو کندری از نظر ساختاری و عملکرد در مقایسه باژنوم هسته،ساده تر می باشد.برخلاف ژنوم هسته، عناصر ژنوم میتو کندری درهنگام میوز از دو سر نوترکیبی نمی یابد وهمه افرادmtDNA مشابه والد ماده خود را حمل می کنند. این ترکیبات به استثنای زمان جهش زائی ،فقط یک نوع منفرد از ملکول به ارث می رسد و می تواند برای ارزیابی وابستگی بین جمعیت ها بکار رود.(Rodrigues *et al.*, 2008).این مزیت به دلیل توارث مادری و نرخ سریع تکامل mtDNA می باشد. تخمین زده می شود که نرخ تکامل mtDNA در پستانداران

۵تا۱۰ بار سریعتر از بخش مشابه در ژنوم هسته ای باشد. از سوی دیگرmtDNAحاوی اطلاعاتی است که در نشانگرهای هسته ای نمی توانند نگهداری شوند(Burton, 1996) گمان می رود که ژنوم میتوکندری ممکن است راهکارهای همانند سازی با دقت کمتری داشته باشند(Was and Wenne, 2002). ژنوم میتوکندری تداخل و برهم کنش شناخته شده ای با محیط ندارد،بطوریکه به نظر می رسد تنوعات ژنتیکی بین افراد حقیقتا بازتابی از وجود جدایی تولید مثلی باشد(Marrtins*etal.,*2003) .ژنوم میتوکندری می تواند برای نشان دادن حرکت یک طرفه جریان ژنی در یک گونه که مدارک غیر ژنتیکی از این نوع حرکت در آن وجود ندارد مفید باشد.البته برای mtDNA محدودیت هایی هم متصور است .mtDNA اساسا یک جایگاه (Locus) ژنتیکی منفرد است که شامل چندین هزار نوکلئوتید می باشد بطوریکه فقط می تواند بخشی از تغییرات ژنتیکی را در یک گروه از جانوران نشان دهد. تحلیل های mtDNA هیچ اطلاعاتی در مورد نوع تغییر ژنتیکی که جمعیتها را کنترل می کند ایجاد نمی کند وهمچنین دلیل قاطعی برای وجود جدایی تولیدمثل درون با بین جمعیتها فراهم نمی کند (Marrtins *et al.,* 2003).

۸-۱- واکنش زنجیره ای پلیمراز(Polymerase Chain Reaction)

تکنیکPCR در اواسط دههِ ۱۹۸۰ در دپارتمان ژنتیک انسانی بوسیلهِKari Mullisابداعو برای تکثیر ژن کم خونی داسی شکل و بتاگلوبین انسانی مورد استفاده قرار گرفت.یکی ازمهمترین پیشرفت ها در دو دههء اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی بویژه در کاربردهایتشخیصی، واکنش زنجیرهء پلیمراز Polymerase Chain Reaction (PCR) می باشد، که علاوهبر افزایش سرعت آزمونهای وابسته به DNA، در اکثر موارد موجب افزایش حساسیت اینگونهآزمایش ها گردیده است. PCR به یک روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA تا حد مشاهدهآنها توسط روشهای ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می گردد.

۱-۸-۱- مکانیسمPCR

همانطوریکهمی دانیمDNA ، یک مولکول مارپیچی دو رشته ای پلی نوکلئوتیدی است که این دو رشته درجهت مقابل هم قرار گرفته اند و بطور ویژه ای بوسیلهء پیوندهای هیدروژنی میان بازهایآلی مکمل بیکدیگر متصل هستند (سیتوزین بوسیله سه پیوند هیدروژنی به گوانین و آدنین بوسیله دو پیوند هیدروژنی به تیمین اتصال پیدا می کند). DNAدورشته ای می تواندبوسیله حرارت از هم جدا شده و دو مولکول DNA تک رشته ای ایجاد کند

که این مرحله به نام مرحله تغییر ماهیت (تقلیب) شناخته می شود. مولکولهای DNA تک رشته ای از طریق واکنشهای متقابل ویژه بین بازهای مکمل به همدیگر متصل شده که حاصل آن ایجاد و آغازمرحله ای بنام مرحله پیوندزنی (annealing و یا hybridization) می باشد. دو مرحله فوق الذکر برای Probe technology و همچنین PCR بکار می رود. مرحله بعدی یا سوم که برای PCR بوده و این روش را از سایر تکنیک های مولکولی متمایز میسازد مرحله توسعه (extension) می باشد که طی آن یک قطعه DNA تک رشته ای بوسیله DNA پلیمراز توسعهپیدا می کند. در این مرحله یک قطعه DNA تک رشته ای کوتاه (primer) به یک مولکول DNA تک رشته ای طویل تر پیوند زده شده و DNA پلیمراز (Taq پلیمراز) قادر می شود بهانتهای ۳ مولکول کوتاهتر یا پرایمر متصل گردیده و با استفاده از دأکسی نوکلئوتیدتری فسفات ها آنرا امتداد داده و قطعه ای سنتز نماید که آن قطعه مکمل DNA تک رشتهای طویل تر باشد و بدین ترتیب DNA دو رشته ای جدید ساخته می شود .

مولکولهای DNA تک رشته ای کوتاه (اولیگونوکلئوتیدها) بوسیله تکنیک های شیمیایی به صورت سریع وارزان ساخته می شوند. اولیگونوکلئوتیدها وقتی که به DNA تغییر ماهیت داده (تقلیبشده) افزوده می شوند، به عنوان پرایمر برای DNA پلیمراز عمل نموده و اجازه می دهندتا DNA جدید در داخل آزمایشگاه سنتز شود. بنا به دلیل فوق الذکر اولیگونوکلئوتیدهارا پرایمر (primer)می نامند. در PCR دو نوع پرایمر مورد استفاده قرار می گیرد که هر کدام از آنها به محل های ویژه در دو رشته مکمل مولکول DNA هدف پیوند می شوند(شکل ۲) . پرایمرهای مذکور به صورتی ساخته شده اند که زمانیکه DNA پلیمراز یک پرایمررا توسعه می دهد، یک مولکول DNA بوجود می آورد که آن DNA دارای یک محل اتصال جدیدبرای پرایمر دیگر می شود. این رشته DNA جدید تولید شده نیز همینطور قادر خواهد بودبه عنوان الگو (template) برای سنتز DNA از پرایمر دیگر در جریان چرخه های بعدیPCR ، عمل نماید.

بنابراین هر چرخهPCR شامل سه مرحله می باشد:

۱- مرحله تقلیب یا تغییرماهیت:(Denaturation Step)

در این مرحله مولکولهای دو رشته ای DNA بوسیلهء حرارت بالا (حدود ۹۴ درجه سانتیگراد) ازهمدیگر جدا گردیده و به مولکولهای تک رشته ای تبدیل می شوند.

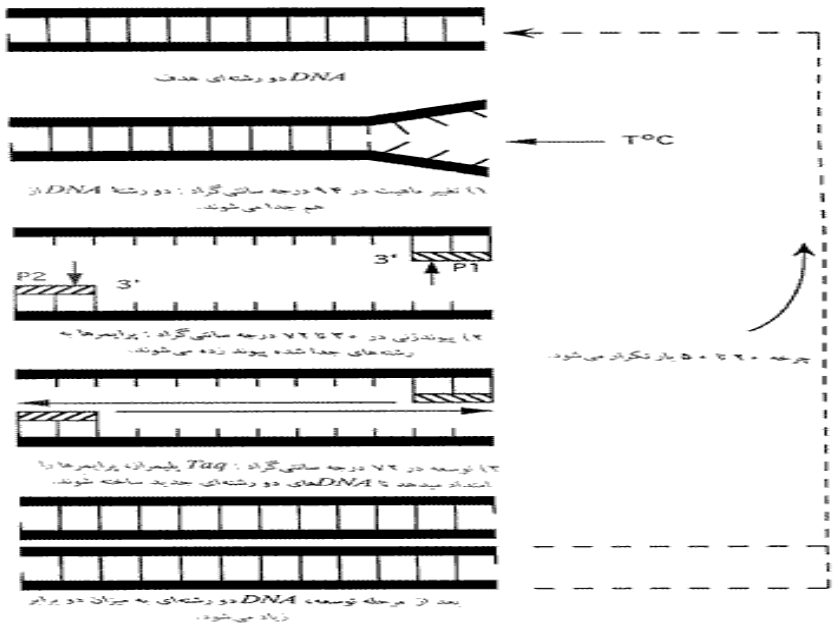
۲- مرحله پیوند زنی :(Annealing or Hybridization Step)

در این مرحله کاهش دمای واکنش صورت می گیرد تا اینکه پرایمرها بتوانند به مولکولهای DNA تک رشته ای پیوند زده شوند. درجه حرارت مورد استفاده برای این مرحله می تواند از ۳۰درجه سانتیگراد تا ۷۲ درجه سانتیگراد متغیر باشد.

۳- مرحله توسعه:(Extension Step)

دراین مرحله که آخرین مرحله یک چرخه PCR می باشد، آنزیم Taqپلیمراز (که DNA پلیمرازی است مقاوم به حرارت و از یک باکتری ترموفیل بنام ترموس آکواتیکوس Thermus aquaticus استخراج می شود) با استفاده از دأکسی نوکلئوتید تری فسفاتها، پرایمر رادر روی DNA تک رشته ای امتداد می دهد تا DNA دو رشته ای جدید بسازد. درجه حرارت لازم برای این مرحله۷۲ درجه سانتیگراد می‌باشد که این درجه حرارت برای آنزیمهای مقاوم به حرارتی که به طور عادی مورد استفاده قرار می گیرند مناسب میباشد.

هر چرخه PCR نهایتاً با دو برابر شدن تعداد ترادف های DNA هدف همراه است که تکرار چرخهدفعات زیاد (۲۰ تا ۵۰ بار) منجر به افزایش توانی در تعداد ترادف های DNA هدف و درنتیجه ازدیاد DNA هدف به میزان یک میلیون برابر یا بیشتر خواهد شد.(Bartlett & Stirling., 2003).



شکل۱۱-۱- چرخه ازدیاد DNA بوسیله PCR مراحل سه گانهٔ آن

۹-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۹-۱- مطالعات انجام شده در مورد کفال ماهیان

– Papasotirpoulos وهمکاران در سال۲۰۰۷ با استفاده از آنالیز توالی یابی از ناحیه mtDNA در کفال ماهیان، به روابط خویشاوندی این خانواده پرداختند. در این تحقیق پنج جنس از خانواده Mugilidae شامل; *Liza sallies* *ramanda, Liza aurata, Chelon labrosus , Mugil cephalusLiza* و از هرجنس به تعداد ۵ نمونه از دریاچه Messolongi دریونان جمع آوری شدند. سه ناحیه از mtDNA (16s rRNA,12s rRNA و CO I) تکثیروتوالی یابی شدند.آنالیز توالی یابی نشان داد که بیشترین تفاوت ژنتیکی در بین M.cephalus با دیگرجنس های مورد مطالعه بود در حالیکه *C.labrosus* و *L.aurata*نزدیکترین بهم بودند.

– Erguden و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از آنالیز توالی یابی ژن 16S rDNA از ناحیه ژنوم میتوکندری(mtDNA) به روابط تاکسونومی شناسایی ژنتیکی ۸ جنس از کفال ماهیان شامل: *Mugil cephaus,* *Chelon labrosus, Oedalachelis labeo, Liza abu, Liza aurata, Liza saliens, Liza ramada*ازدریای مدیترانه و *Mugil soiuy*از دریای سیاه پرداخت.اطلاعات موجود در ژن 16S rDNA حاوی ۱۲۱ مکان متغیر واطلاعات مفید بود. آنالیز توالی یابی نشان داد که *M.cephalus*به طور حتم از دیگرجنس ها جدا می باشد. در مقایسه درون گونه ای اختلافی در جنس *Liza* مشاهده نشد. علاوه بر این *M.soiuy* و *L.abu*باید تحت جنس *Liza* مورد توجه قرار گیرند یا اینکه جنس با اسم جدیدبرای این دو گونه در نظر گرفت.

– Imsiridou وهمکاران در سال ۲۰۰۷، به تمایز۶ گونه از بچه ماهی های (fry) کفال ماهیان شامل *Liza aurata, Liza saliens, Liza ramada, Chelon labrosus,Mugil cephalus* با استفادهساز آنالیز توالی یابی ژن 5S rDNAاز ژن هسته پرداخت. محصول PCR از دو گونه الگوهای مختلفی بر روی ژل آگارزEt Br-stained نشان دادند. گونه *M.cephalus*یک الگوی سه باندی داد در حالیکه *L.saliens*یک الگوی تک باندی داد.گونه های *L.aurata, L.ramada, C.labrosus* یک الگوی دو باندی دادند. آنالیز توالی یابی هاپلوتایپ های منحصربفردی را برای سه گونه باقیمانده نشان داد. بواسطه این تکنیک ژنتیکی توالی یابی ژن 5S rDNA می توان به شناسایی بچه ماهی های کفال(fry) در هچری ها پرداخت.

– Semina و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی سیستماتیکی وتکامل روابطی ۶ گونه از کفال ماهیان گونه های *Liza saliens,Chelon LabrosusLiza ramada, Mugil cephalus,Liza aurata,* از آبهای مدیترانه وگونه *Liza haematocheilus* از آبهای ژاپنبا استفاده از آنالیز PCR-RFLP پرداختند.سه قطعه از ناحیه mtDNA شامل: ND3,16S

rRNA, 12S rRNA تکثیر یافت. آنالیز این سه قطعه از ناحیه mtDNA در مجموع۷۲۲۰bp را شامل شد که نشان داد که گونه های *Liza aurata, Liza saliens, Liza ramada* و *Chelon labrosus*ازآبهای مدیترانه در یک گروه مشترک می باشند ، گونه های *L.aurata,C.labrosus*نسبت نزدیکتری با هم دارند درحالیکه گونه *L.haematocheilus*از آبهای ژاپن یک گروه خواهری با گروه کفال های مدیترانه را تشکیل می دهند. مشخص شد که جنس *Liza,Chelon*پارافیلیتیک هستند از اینرو جای گرفتن آنها در دوگروه غیرطبیعی می باشدو باید در یک گروه قرار گیرند.بر طبق اولویت جنس *Liza*بایدبه *Chelon* نسبت داده شود.گونه *Mugil cephalus*بیشترین فاصله ژنتیکی را با دیگر گونه های مورد مطالعه داشت. سطح تنوع ژنتیکی بین نمونه های غیرهم بومی *Mugil cephalus*از دریای ژاپن ومدیترانه جانشینی نوکلئوتیدی شدیدی را نشان داد.

۲-۹-۱- مطالعات انجام شده در ایران و خارج از کشور بر سایر ماهیان

رزمجو وهمکاران در سال ۱۳۸۷بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری(*Neogbius caspius*)درحوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP پرداختند.طی این بررسی تعداد 135 نمونه گاو ماهی خزری از 3 منطقه در طول ساحل حوضه جنوبی دریای خزر که شامل سواحل انزلی،چالوس و بندر ترکمن جمع آوری شد،بااستفاده ازیک جفت پرایمرکه مربوط به توالی نوکلئوتیدهای مجموعه ژنسیتوکروم*b*ژن های۲tRNA و ناحیهD-LOOPژنوم میتوکندری که از چندگونه ماهی بدست آمده بود،انتخاب و جهت PCR مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که محصول PCRحدود bp ۷۰۰ از نمونه ها بدست آمدکه جهت انجام آنالیز RFLP مورد بررسی قرار گرفت و مورد هضم توسط آنزیم قرار گرفت الگوهای هضم آنزیمی باژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید .این الگوها برای تمام نمونه ها مشابه بود، بر این اساس پدیده پلی مورفیسم با استفاده از آنزیمهای فوق در گاو ماهی خزری قابل مشاهده نبوده و جمعیتی قابل جداسازی تشخیص داده نشد.

لالوئی وهمکاران در سال ۱۳۸۷ به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی*Cyprinus carpio* در حوضه جنوبی دریای خزر بااستفاده از mtDNA پرداختند.تجزیه تحلیل داده های حاصل از ارزیابی دو ژن ND-3/4 و -ND 5/6نشان داد که نمونه های سواحل استان گیلان با تالاب انزلی، سواحل استان گیلان با سواحل استان گلستان ورودخانه تجن با گرگانرود از لحاظ فراوانی هاپلوتیپ دارای اختلاف معنی داری بوده است($P\leq$ ۰/۰۵). باتوجه

به نتایج بدست آمده و وجود تفاوت ژنتیکی معنی دار بین نمونه ها، میتوان عنوان نمود که جمعیت یکسانی از کپورمعمولی در مناطق مورد بررسی وجود نداشته وبطورکلی سه گروه ژنتیکی از این گونه شناسائی شدند.

خوش خلق وهمکاران در سال ۲۰۱۱بررسیت نوع ژنتیکی جمعیت تاسماهی ایرانی(*Acipencer persicus*) در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش توالی یابی منطقه کنترل(D-loop) DNA میتوکندریایی پرداختند. در طی ابن بررسی تعداد ۴۶ نمونه باله تاس ماهی ایرانی از ۴ منطقه (آستارا، رودخانه سفید رود، نوشهر وبندرترکمن) جمع آوری گردید. توالی یابی با استفاده از روش استاندارد انجام پذیرفت و در مجموع بین 6 هاپلوتیپ متفاوتو 44 جایگاه متغیر بدست آمد . نتایج آنالیزFst براساس روش دوپارامتری و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)نشا دادبیشترین تنوع در درون نمونه ها میباشدو اختلاف بین نمونه های مناطق آستارا، نوشهرو بندرترکمن معنی دار نبود .برآوردجریان ژنی نشان داد که بین نمونه های رودخانه سفیدرود و دیگر مناطق جدایی تولید مثلی وجود دارد که ممکن است در نتیجه جدایی جغرافیایی باشد.

رضوانی وهمکاران در سال ۱۳۸۸ به بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum*در خلیج فارس ودریای عمان با استفاده از روش ریزماهواره پرداخت. در طی این بررسی ۱۸۴ نمونه از ماهی سوکلا از ۵ منطقه جمع آوری گردید. حداکثر مقدار F_{st}(۰/۰۶۳) بر اساس آزمون AMOVA بین نمونه های بندردیر با نمونه های پزم که دارای کمترین میزان جریان ژنی(۳/۷) بود،مشاهده گردید.میزان R_{st} بر اساس آزمون AMOVA بین مناطق واقع در یک ناحیه نمونه برداری غیرمعنی دار ولی بین مناطق واقع در نواحی مختلف معنی دار بود($P<0.01$). درنتیجه ماهی سوکلا در خلیج فارس ودریای عمان احتمالا دارای ۳جمعیت مجزا است که شامل جمعیت های بوشهر،هرمزگان وچابهار می باشد.

رضوانی در سال ۱۹۹۷ با استفاده از روش RAPD به مطالعه گونه های خاویاری دریای خزر پرداخت وتفاوت معنی داری در جایگاه ژنی RAPD گونه های فیل ماهی متعلق به مناطق غربی وشرقی جنوب دریای خزر مشاهده نمود. نتایج نشان داد که تاس ماهی ایرانی وفیل ماهی در یک کلاستر وماهی شیپ وازون برون در کلاستر جداگانه دیگر قرار گرفتند وتاس ماهی روسی خویشاوندی نزدیکی با فیل ماهی وتاس ماهی ایرانی داشت. همچنین بر اساس تست R_{st} نمونه های مناطق اورال جمعیت مستقل نمونه های سفیدرود هم یک جمعیت مستقل می باشد ولی نتایج فابلوژنی به طور واضح تائید کننده R_{st}نمی باشند.

Lehoczky و همکاران در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی کپور معمولی را با استفاده از ژن‌های ND-3/4 و ND-5/6 میتوکندری و آنالیز PCR-RFLP و همچنین ۴ لوکوس ریز ماهواره‌ای مطالعه نمودند. در این بررسی برای ژن

ND-5/6، ۴ آنزیم محدودکننده و برای ژن ND-5/6، ۲ آنزیم محدودکننده به کار بردند که پلی‌مرفیسم را نشان ندادند.

Liu در سال ۲۰۰۲ به تنوع DNAمیتوکندری از ناحیه D-LOOP وتمامی ناحیه cytochrome b وسیستماتیک جنس *Distochodon* (Cyprinidae) پرداخت. ۹۲۹–۹۲۵ باز از ناحیه کنترلی و ۱۱۴۰ باز از ناحیه cytochrome b بدست آمد و برای نتایج سیستماتیکی بررسی شد. تنوع توالی یابی در دیگرنمونه ها نشان داد که *Distochodon compressus*یک گونه گونه وحشی بوده ودر تایوان گسترش دارد ودرحالیکه *D. tumirostris multispinnis*بنظر نمی رسد که یک گونه وحشی باشد.

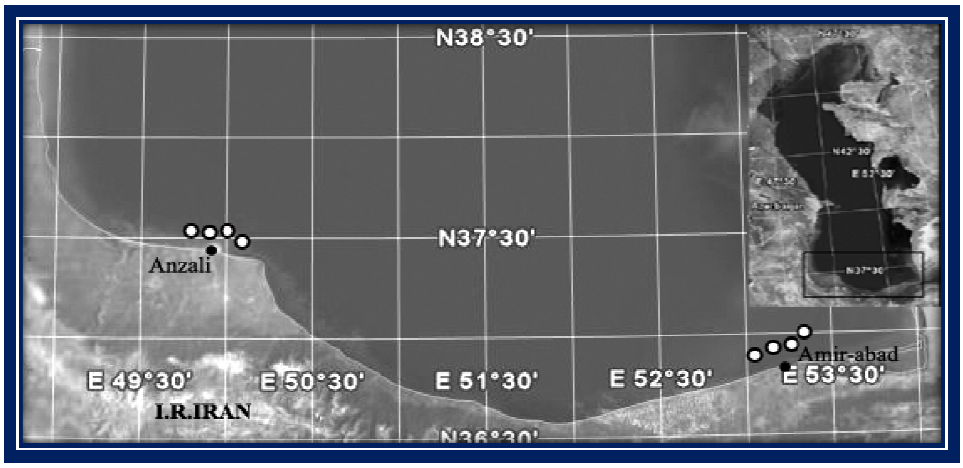
۲- مواد و روش کار

۲-۱- نمونه برداری برای مطالعه جمعیت کفال پوزه باریک

در این بررسی پس از مطالعه اولیه وتعیین ایستگاه ها ۵-۳ گرم از بافت باله دمی از ۴۵ عدد ماهی کفال پوزه باریک، از هر منطقه ۱۵ عدد از صیدگاه های شیلات مناطق انزلی ، ساری وتالاب گمیشان در زمستان ۸۹ و پائیز ۹۰ جدا ودر اتانول خالص فیکس گردید وبه آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر شهرستان ساری منتقل گردید.کلیه نمونه برداری ها با استفاده از تور پره انجام شد. جدول ۱-۲ تعداد وپراکنش وموقعیت جغرافیایی نمونه های جمع آوری شده از ماهی کفال پوزه باریک را در ایستگاه های مختلف نشان می دهد.

جدول (۱-۲) . موقعیت جغرافیایی ایستگاههای نمونه‌برداری شده

موقعیت	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ایستگاه نمونه برداری	تعداد نمونه
گیلان	49° 21′ 31″	37° 29′ 00″	تعاونی پره شهیدنوبخت انزلی	۱۵
مازندران	45° 34′ 21″	40° 26′ 34″	تعاونی پره آزادی لاریم ساری	۱۵
گلستان	53º 35'	37º 07'	تالاب گمیشان	۱۵



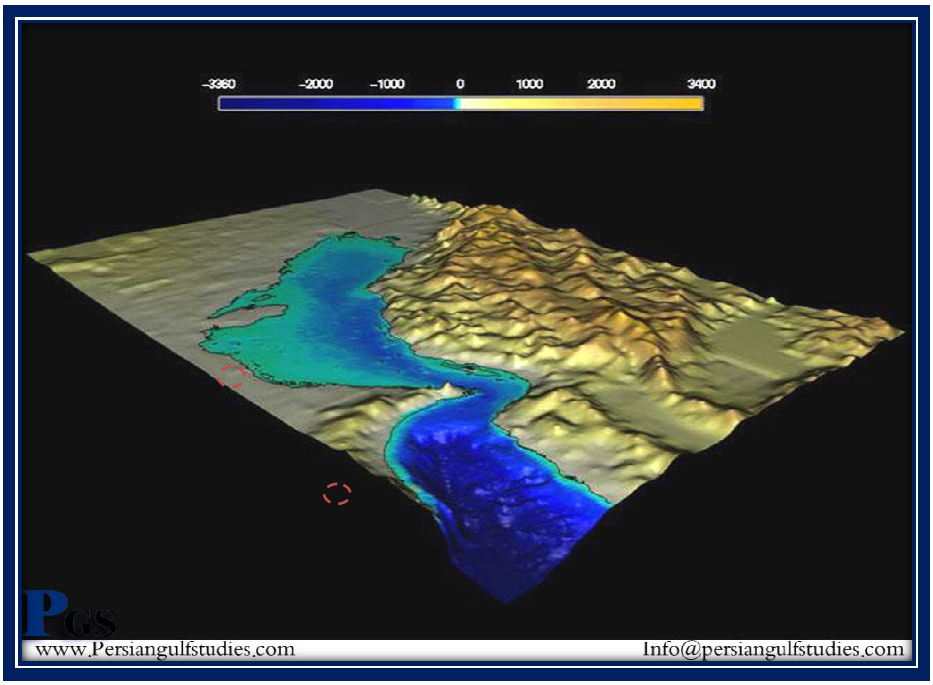
شکل ۱-۲: محل نمونه برداری از دریای خزر

۲-۲- نمونه برداری برای بررسی رابطه فایلوژمی ٦ گونه کفال آبهای ایران

ابتدا ۱۰ نمونه از هر کدام از کفال ماهیان آبهای دریای خزر (*L.aurata* و *Liza saliens*) از سواحل امیرآباد ساریو تالاب گمیشان گرگانبا استفاده از صید پره جدول (۱-۲)، و ۱۰ نمونه از هرکدام از کفال ماهیان آب های جنوب ایران (*Lizasubviridis,Mugil cephalus , Valamugil buchanani*)از سواحل دریای عمان، بندرعباس با استفاده از تور گوشگیر از صیادان محلی جدول (۲-۲)، تهیه گردیدند. همچنین ۱۰ نمونه از کفال خاکستری وارداتی از مصر که در استخرهای ایستگاه تحقیقات شیلات گمیشان تابع مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی گرگان نگهداری می شوند، فراهم شدند. پس از شناسایی بوسیله کلیدهای موجود (Coad, 1995; FAO, 1983)، قطعه ای از بافت باله دمی هر ماهی توسط اسکالپل جدا و در اتانول مطلق تثبیت و جهت استخراجDNAبه آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در ساری منتقل شد.(محل های نمونه برداری در اشکال۱-۲ و۲-۲ آمده است).

جدول ۲-۲: مشخصات جغرافیایی محل های نمونه برداری

محل نمونه برداری	مختصات جغرافیایی
امیرآباد ساری	۴۶° ۵۱' ۱۶" N ۴۰" ۵۱' ۴۰" E
تالاب گمیشان	۳۷° ۲۰' ۷۸" N۵۴° ۰۴' ۹۶" E
ساحل محله سورو (بندرعباس)	۵۶° ۱۵' ۰۰" N ۲۷° ۰۷' ۱۲" E
بین (شمال)هرمز و خور یکشبه	۵۶° ۲۸' ۵۷" N ۲۷° ۰۷' ۵۸" E
بندر کلاهی (خلیج فارس)	۵۶° ۴۶' ۰۳" N ۲۷° ۰۷' ۲۷" E



شکل ۲-۲: محل نمونه برداری از خلیج فارس و دریای عمان

۱-۲-۲- استخراج DNA

- **استخراج DNA ژنومی به روش استات آمونیوم**

استخراج DNAژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای اساسی زیست شناسی مولکولی است . بیشتروش-های تجاری استخراج DNA زمان بر هستند. استخراج DNA اولین ومهم ترین نیاز در اجرای تحلیل های ژنتیکی ، مانند پی بردن به جهش پی بردن به توالی وعملکردبخش ویژه ای از ژنوم است. موفقیت ناشی از استخراج مناسب DNA به خلوص عالی وغلظت بالای DNA استخراج شده وابسته است. از طرفی در سالهای اخیر ژنتیکی مولکولی یک ابزار قدرتمند در برنامه های مختلف اصلاح نژاد، بررسی ژنتیک جمعیت وغیره بوده است. معمولا کیفیت DNA باعواملی مانند عدم آلودگی ناشی از RNA ، پروتئین ،لیپید، وسایر ساختارهایی که برای آنزیم *Taq*پلی مراز در واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) وآنزیم های برشی مزاحم سنجیده می شوند.

بطورکلی استفاده از مارکرهای مولکولی آنالیزهای دقیقتری از توان ژنتیکی ماهی، جامعه یا جمعیت قبل از بیان فنوتیپ های آن را فراهم میکند(Liu and Cordes, 2004).این فرصت های فراهم شده برای تخمین تنوع ژنتیکی نیازمند مطالعه مدیریت ذخایر ماهی وحفاظت عملی آنها نیاز است(Lopera-Barrero *et al*., 2006).

هرچندکه شدنی بودن این مطالعات گاها بوسیله مشکلات بیشمار در ایزوله کردن وبدست آوردن DNA با یک کیفیت خوب در یک مقدار کافی محدود میشود(Aranishi, 2006; Wasko *et al*., 2003)

استفاده از روش های نمونه برداری مناسب، نوع بافت واستفاده از پروتوکل های مناسب برای استخراج DNA جنبه های حیاتی مطالعات مبتنی برPCR می باشد. در ماهی استفاده از باله ها(Lopera-Barrero *et al.,*2006 ؛ Nam *et al.,* 2003 ؛Wasko *et al.,* 2003) ، خونو اسپرم (Cummings and Thorgaard, ۱۹۹۴) ، فلس(; Adcock *et al*., 2000 Sire *et al.,* 2000Wasko *et al.,* 2003;Yue and Orban, 2001) ، سلول های دهانی (Livia *et al.,* 2006)، تخمک ها (Aranishi, 2006) وماهیچه (Chakraborty *et al.,* 2006; Weber et al., 2003) نیازمند چندین پروتوکل بودند که Chelex 100(Sigma, USA)، سیلیکا، مایکروویو، نیتروژن مایع، فنل- کلروفورم،استات آمونیوم و پروتوکل نمک به طور گسترده ای استفاده شد. پروتوکل استفاده از استات آمونیوم جهت استخراج DNA ساده، آسان وبدون آلودگی خارجی برای بدست آوردن DNA با کیفیت خوب درمقادیر کافی از نمونه های بافتی ماهی است.

عموما mtDNA ماهیان هوموپلاسمیک است، به این مفهوم که تمامی مولکول های یک موجود با هم متشابه می باشند. از اینرو می توان هر بافتی را به عنوان منبع DNA به کار برد. mtDNA هر سلول در چند نسخه وجود دارد، بنابراین جداسازی وتخلیص آن نسبتا آسان است(Brown, 1985).

اصول کلی استخراج

- شکستن سلول برای از بین بردن دیواره هسته که معمولا با استفاده از شوک های اسمزی صورت می گیرد.
- هضم پروتئین ها با استفاده از دترجنت های یونی مانند سدیوم دودسیل فسفات(SDS) که سبب تخریب غشاء سلولی وپروتئین متصل به DNA می شود، انجام می شود. تیمار آنزیمی (پروتئیناز K) نقش پروتئین زدایی دارد. فعالیت بهینه این آنزیم در حضور SDS ، در دمای ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد است.
- رسوب پروتئین ها. در DNA حاصل از هضم ناخالصی هایی وجود دارد . جهت رسوب پروتئین ها از استات آمونیوم استفاده می شود.
- رسوب دادن DNA که معمولا با استفاده از الکل یا اتانول صورت می گیرد.

• محلول های لازم جهت استخراج DNA به روش استات آمونیوم

- سدیم دودسیل سولفات(SDS) ۱۰ درصد
- STE.
- پروتئیناز K
- استات آمونیوم
- ایزوپروپونال
- اتانول ۷۰٪
- اتانول ۱۰۰٪

تمامی نمونه ها بوسیله شکستن سلول ها، جدا نمودن پروتئین ها وهیدرات های کربن از اسیدهای نوکلئیک ودر نهایت رسوب دادن DNA از بافت ها استخراج گردید.

به منظور استخراج DNA ازماهیان به روش استات آمونیوم با مراحل زیر یه ترتیب انجام گردید:

۱- حدود ۵۰ میلی گرم از نمونه باله ماهی کاملا خشک گردید وبه تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل وله شد.

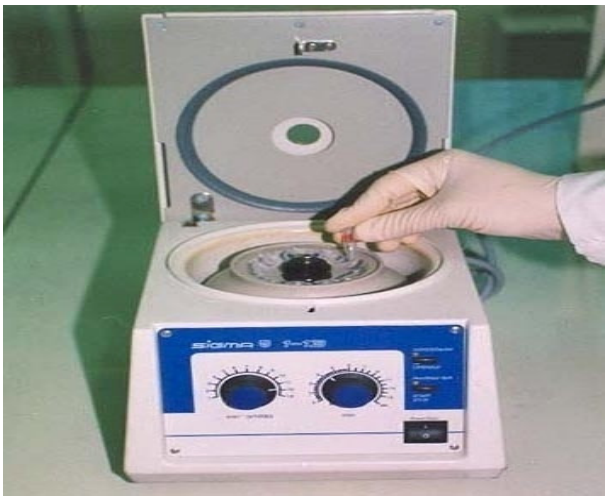
۲- سپس برای هضم بافت مورد نظر بویژه پروتئین ها بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتراز بافر STE، ۵۰ میکرولیتر SDS(سدیم دو دسیل سولفات) ۱۰ درصد و ۳میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید.

۳- جهت فعال نمودن کامل آنزیم تیوب حاوی نمونه به مدت ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت در شیکر قرار داده و پس از آن به مدت یک شب در بن ماری ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد، در طی این مدت نمونه به طور کامل هضم شده وبصورت امولسیونی غلیظ در آمد.

۴- پس از یک شب قرار گرفتن نمونه ها در بن ماری نمونه ها خارج شده وبه هر تیوپ ۱۶۰ میکرولیتر استات آمونیوم اضافه شد وبرای مدت حداقل یک ساعت با استفاده از شیکر بهم زده وبلافاصله در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۵- به آرامی ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی را توسط یک نمونه بردار جدا کرده ودر داخل تیوپ جدیدی ریخته وبرای حذف بقایای استات آمونیوم بر روی آن ۵۰۰ میکرولیترایزوپروپانول اضافه نموده، لوله ها بوسیله دست به آرامی چندین مرتبه سر وته شدند ودر دور۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند وفاز بالایی محلول دور ریخته شد.

شکل۳-۲ . جداسازی محلول بالای استات با استفاده از سمپلر



شکل ٤-۲- مرحله سانتریفوژ، بعد از اضافه کردن استات

۶- جهت خارج نمودن کامل ایزوپروپانول، ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به لوله ها اضافه شد و در دور۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۷- پس از عمل سانتریفیوژ فاز الکل جدا شد وتیوپ ها در دمای اتاق قرار داده شد تا تمام الکل آن خشک و تبخیر شود.

۸- پس از خشک شدن برروی رسوب DNA ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطراستریل اضافه شد ودر بن ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا DNA بطور کامل در آب حل هضم گردد.پس از آن نمون ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

- **روش فنل کلروفرم**

استخراج DNA با بهینه سازی روش فنل- کلروفرم انجام گردید (Fevolden & Pogson, 1997).در این روش مقدار ۱۰۰-۵۰ میلیگرم از بافت باله دمی درون یک میکروتیوپ قرار داده شد و پس از خردکردن، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE(Tris ۰/۰۵ مولار—EDTA ۰/۰۱ مولار —Nacl ۰/۱ مولار — PH= 8)، ۵۰ میکرولیترSDS ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت ۴-۳ ساعت در حمام آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل به آن اضافه شد. پس از این مدت، لوله ها ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شدند و سپس در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی بدقت جدا و به یک میکروتیوپ دیگر منتقل گردید. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مجددا لایه رویی جدا و مقدار ۴۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ مولار و حدود ۲ برابر حجم برداشت شده (حدود ۸۰۰ میکرولیتر) اتانول مطلق به آن اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در ادامه، رسوب شیری رنگ تشکیل شده با اتانول ۷۰ درجه شسته شد و پس از خشک شدن، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه گردید و به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا DNAحل گردد. نمونه ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگه داری شدند.

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

دستگاه الکترفورز حاوی محلول بافر الکترود(TBE 1X) بوده وتنها مسیر عبور جریان الکتریکی ژل الکتروفورز می باشد. اساس کار الکتروفورز برپایه قرارگرفتن ذرات باردار در مسیر جریان الکتریکی می باشد. DNA به دلیل دارا

بودن گروه های فسفات در ساختمان خود دارای بار منفی میباشد، پس انتظار میرود که پس از قرار گرفتن نمونه ها درداخل ژل وبرقراری جریان الکتریکی نمونه های DNA به سمت قطب مثبت حرکت کرده وبسته به بار الکتریکی و وزن مولکولی در قسمتهای متفاوتی از ژل نسبت به مبدا حرکت قرار میگیرند.

که هم زمان با جریان، جابجایی DNA که دارای بار منفی است انجام میگیرد که در پایان با استفاده از دستگاه ژل داکیومنشن واشعه UV وخاصیت فلوئورسانس ایجاد شده،باندهای DNA مورد ارزیابی قرار میگیرد.

۱-۳-۲- محلول های لازم جهت الکترفورز روی ژل آگارز

- بافر TBE
- لودینگ بافر
- محلول اتیدیوم بروماید
- ژل آگارز

برای آماده کردن ژل آگارز ۱٪ جهت ارزیابی کیفی DNA استخراج شده با توجه به حجم پلیتی که ژل در آن ریخته میشود طی مراحل زیر انجام شد:

۱- سینی مخصوص ژل را درمحلی مسطح قرار داده وشانه روی ژل قرار داده شده بطوری که تا یک میلی متر با کف سینی ژل فاصله داشته باشد ودوطرف سینی با استفاده از چسب نواری بسته می شود.

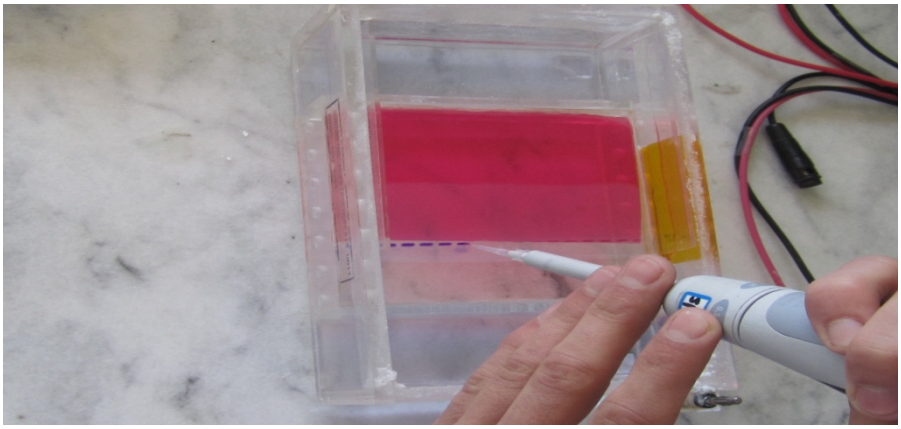
۲- برای تهیه ژل آگارز یک درصد ۲۰ میلی لیتر بافر TBE(10 x) را در ارلن ریخته و ۰/۲ گرم آگارز به آن اضافه گردید.

۳- سوسپانسون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز آن حل وشفاف شود وسپس ارلن در دمای محیط آزمایشگاه قرار میگیرد تا سردشود.

۴- محلول حاصله را پس از سرد شدن درسینی ژل ریخته واجازه داده شد تا منعقد گردد.

۵- پس از بسته شدن حامل های دوطرف سینی را باز وژل به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده شدوپس از مدتی شانه ژل به آرامی از ژل خارج گردید.

۶- ۶میکرولیتر از DNA ژنومی همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملا مخلوط وبا دقت به هریک از چاهک های مستطیلی شکل ژل(well) ریخته شد.



شکل ۵-۲- ریختن مخلوط بافر سنگین کننده به همراه DNA داخل چاهک ها

۷- تانک الکتروفورز به دستگاه مولد برق با ۹۰ ولت و ۱۲۰ میلی آمپر به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه وصل گردید.

شکل ٦-۲- تانک الکتروفورز افقی

۸- پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر، ابتدا ژل به مدت کوتاه داخل رنگ اتیدیوم بروماید گذاشته شد تاحدی که فقط باندهای مورد نظرقابل دیدن با اشعه UV باشند.پس از آن به دستگاه ژل داکیومنشن منتقل گردید وکیفیت DNA از لحاظ خلوص ،آلودگی وشکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

٤-۲- آماده سازی آغازگر

انتخاب آغازگر بر اساس ترادف DNA ژنومی از ناحیه 16S rRNA ماهی *Mugil cephalus* برگرفته شده از مقاله Palumbi *et al.*,1991 صورت گرفت. بعد از مطالعه توالی ژنومی DNA این گونه توسط جستجوی اینترنتی در بانک ژنی (NCBI) یک جفت آغازگر بطول ۲۰ باز انتخاب گردید.

آغازگر دارای غلظت ۱۰۰ میکرومول بود وبرای واکنش غلظت ۳۰ پیکومول نیاز بود از اینرو ۳۰ میکرولیتر از هر آغازگر در تیوپ های ۰/۵ میلی لیتری به صورت جداگانه ریخته وبه هر کدام ۷۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد ودر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

از آنجایی که داشتن توالی DNA مربوط به یک منطقه خاص از ژنوم یک گونه این اجازه را میدهدتا همین منطقه خاص از ژنوم مربوط به گونه های بسیار نزدیک یا جمعیت های مشابه از یک گونه را با همان آغازگر تکثیر کرد لذا میتوان از پرایمر طراحی شده بر اساس ژن 16S rRNA گونه *Mugil cephalus* برای گونه *Liza saliens* استفاده کرد.

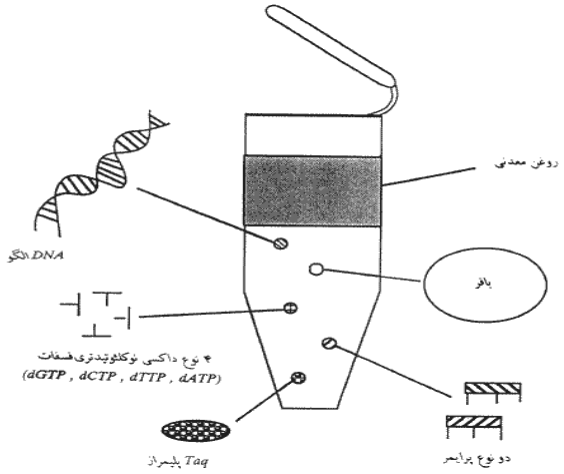
۱-٤-۲- رقیق کردن پرایمر

رقیق کردن پرایمر بر اساس اطلاعات داده شده در کاتالوگ پرایمرها صورت گرفت. غلظت پرایمرها بر اساس پیکومول داده شده بود، ابتدا پودر پرایمر با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر آب رقیق شد، برای کار روزانه محلولی (Working) از پرایمرها با غلظت ۵۰ پیکومول با استفاده از رابطه $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ ساخته شد.

۵-۲- واکنشPCR

۱-۵-۲- مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR

- DNA الگو
- بافر PCR
- کلرید منیزیوم(Mgcl2):
- دی اکسی نوکلئوتیدتری فسفات (dNTP)
- آنزیم Taqپلی مراز
- پرایمر
- آب مقطر



شکل۷-۲- اجزای PCR در لولهٔ پلی پروپیلن آماده برای انجامPCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز بااستفاده از یک جفت پرایمر برگرفته شده از مقالهPalumbi*et al.,*1991که جهت تکثیر توالی نوکلئوتیدهایی16S rRNA، ژنوم میتوکندری*Mugil cephalus*به کار برده بود،از طریق شبکه اینترنتی بدست آمد.

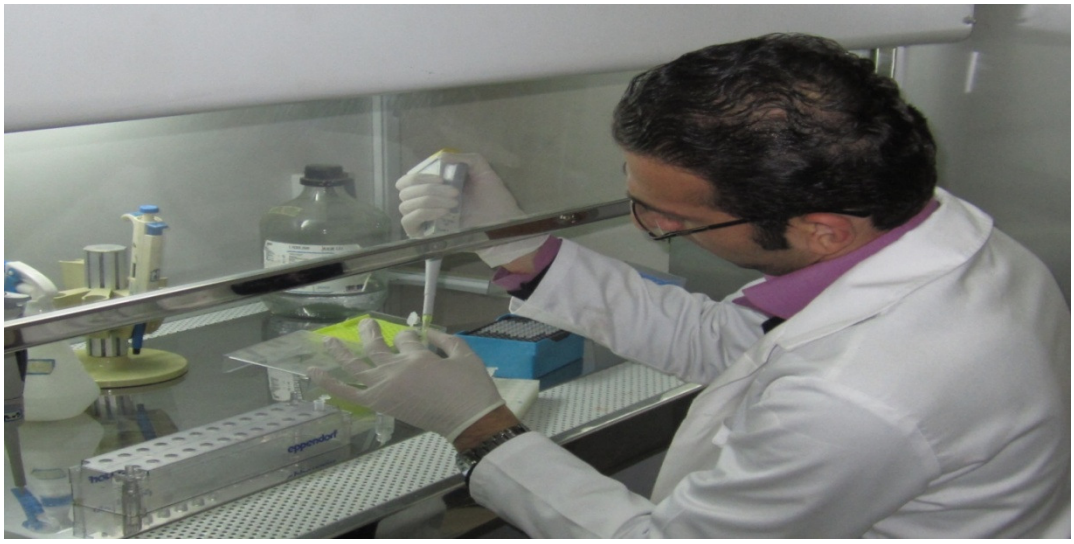
ترادف ژنی پرایمر مورد نظر عبارتست از :

پرایمرجلوبر: 5′- CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3′

پرایمر معکوس: 5′-CCGGTCTGAACTCAGATCACG-3′

انتظار می‌رفت با توجه به نتایج مقاله مورد نظر، اندازه محصول PCR ناحیه 16S rRNAماهی کفال می‌باید حدود ۵۵۲ جفت باز می‌بود.

واکنش PCR با استفاده از ۵µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵mM، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰µl برسد، انجام شد. بهتراست آب مقطر ابتدا در یک تیوپ ریخته شده وسپس بقیه مواد به آب مقطر اضافه شود. باید توجه داشت که Taq حتما داخل خود محلول خالی شود وپس از اضافه شدن آن سریع پس ازتکان داده شدن تیوپ ها به دستگاه منتقل شود.



شکل ۸-۲- آماده نمودن نمونه برای PCR

۲-۵-۲- بهینه کردن PCR وپروفیل های حرارتی آن

درمرحله اول با دادن دامنه حرارتی ، بهترین دمای اتصال آغازگر بر روی نمونه ها بدست آمد از اینرو دستگاه در یک دامنه حرارتی ۶۵-۵۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.دمای مورد استفاده برای انجام واکنش که در دامنه حرارتی بهترین نتیجه را داد، دمای ^{o}c ۵۷-۵۶ بود.

در پایان، محصولات PCR را به یخچال ۴ درجه سانتی گراد انتقال دادیم تا برای آزمایش های بعدی که شامل انتقال بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای سنجش کیفیت محصول PCR در دسترس باشد. پس از آزمایش فوق ، محصولات PCR به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد.

جدول ۳-۲- برنامه های داده شده به دستگاه PCR

مراحل		درجه حرارت(سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	تعداد چرخه(سیکل)
Denaturation	واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳	۱
Denaturation	واسرشته سازی	۹۵	۰/۷۵	۳۲
Anneling	الحاق	۵۷ -۵۶	۰/۷۵	۳۲
Extention	بسط	۷۲	۰/۷۵	۳۲
Elongation	بسط نهایی	۷۲	۵	۱

۶-۲- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت وقطعات تکثیر شده از نظر کیفیت وشارپ بودن باند حاصله بررسی شد.

محصول PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۱/۵٪ طی مراحل زیر الکترفورز گردید:

۱-۶-۲- مواد مورد نیاز

- پودر آگارز
- محلول TBE(1x)
- ارلن مقاوم در برابر حرارت
- محلول رنگی اتیدیوم برماید
- بافرسنگین کننده(Loading Buffer)
- سینی یا پلیت مخصوص ریختن ژل در آن
- شانه مخصوص ایجاد چاهک

برای آماده کردن ژل آگارز با توجه به حجم پلیتی که ژل در آن ریخته میشود طی مراحل زیر انجام شد:

۱- سینی مخصوص ژل را درمحلی مسطح قرار داده وشانه روی ژل قرار داده شده بطوری که تا یک میلی متر با کف سینی ژل فاصله داشته باشد ودوطرف سینی با استفاده از چسب نواری بسته شد.

۲- برای تهیه ژل آگارز ۱/۵٪ ۲۰ میلی لیتر بافر TBE(10 x) را در ارلن ریخته و۰/۳ گرم آگارز به آن اضافه گردید.

۳- سوسپانسون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز آن حل وشفاف شود وسپس ارلن در دمای محیط آزمایشگاه قرار میگیرد تا سردشود.

۴- ژل حاصله را پس از سرد شدن درسینی ژل ریخته واجازه داده شد تا منعقد گردد.

۵- پس از بسته شدن حامل های دوطرف سینی را باز وژل به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده شدوپس از مدتی شانه ژل به آرامی از ژل خارج گردید.

۶- ۶میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملا مخلوط وبا دقت به هریک از چاهک های مستطیلی شکل ژل(well) ریخته شد .

۷- تانک الکتروفورز به دستگاه مولد برق با ۹۰ ولت و ۱۲۰ میلی آمپر به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه وصل گردید.

۸- پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظرابتدا ژل به محلول رنگی اتیدیوم بروماید برای رویت در اشعه UV قرار داده شد، سپس به دستگاه ژل داکیومنشن منتقل گردید وکیفیت محصول PCR از لحاظ شارپ بودن ،پرنور بودن و نداشتن اسمیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۷- تعیین توالی (Sequencing) مستقیم محصولات PCR

عمل تعیین توالی با روش خاتمه زنجیره بادی داکسی (ddNTP) که بوسیله Sanger ، درسال ۱۹۷۷ میلادی ابداع شد(Pherson *et al.*, 2000) انجام شد.

در این راستا محصولات بدست آمده از واکنش PCR برای تعیین توالی به شرکت بیونر کره جنوبی فرستاده شد.در نهایت داده های بدست آمده از تعیین توالی قطعه ۵۵۲bp ژن 16S rRNA میتوکندریایی با استفاده از نرم افزارهای Bio Edit, DnaSP و MEGA4 مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در فصل بعد آمده است.

۲-۸- نرم افزارهای مورد استفاده برای آنالیز توالی های بدست آمده از نمونه های جمعیت شناسی

۲-۸-۱- BioEdit

جهت تصحیح توالی های زیستی بکار می رود که در محیط Windows 95/98/NT/2000/XP قابل نصب واجرا است. این نرم افزار می تواند عملیات پایه ای مانند تصحیح، alignment، دستکاری وآنالیز داده ها را برای توالی های نوکلئوتیدی وپروتئینی انجام دهد.سپس خروجی داده ها به صورت FASTA ذخیره میکنیم تا مرحله بعدی با نرم افزار DnaSP انجام شود.

۲-۸-۲- DnaSP (DNA Sequnce Polymorphism)

این نرم افزار بیشتر در ژنتیک جمعیت ها مورد استفاده قرار میگیرد. این نرم افزار در محیط Windows قابل اجرا بوده ومی تواند تعداد بسیار بالایی از توالی ها را مورد آنالیز قرار دهد. از کارایی های این نرم افزار میتوان به موارد زیر اشاره نمود:

- آنالیز پلی مورفیسم DNA از توالی نوکلئوتیدی

- بررسی ژنتیک مولکولی جمعیت
- اندازه گیری و محاسبه تنوع نوکلئوتیدی DNA درون وبین جمعیت در مکان های غیرکدشده یاغیر مشابه
- اندازه گیری جریان ژنی
- بررسی پارامترهای حفاظت ژنی

در این تحقیق از نرم افزار DnaSP برای تبدیل داده ها به فرم MEGA استفاده شده است.

۳-۸-۲- MEGA 4(Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 5.0)

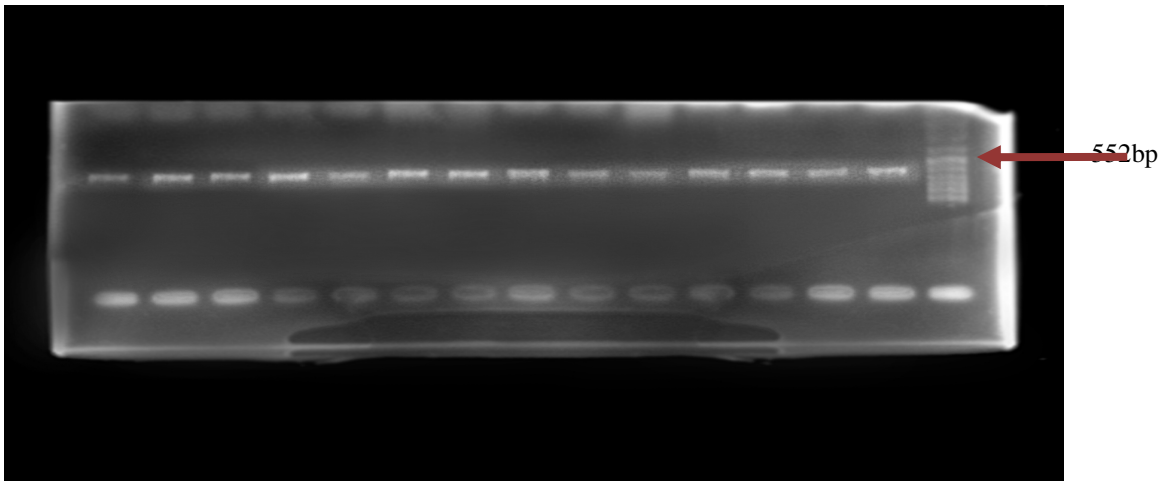
داده های مورد استفاده در این نرم افزار می تواند از هر دونوع پروتئینی واسیدنوکلئیکی باشد که این داده ها در این نرم افزار قابل تصحیح می باشند. توالی های داده شده به صورت فرمت های MEGA, NEXUS و FASTA قابل خواندن وذخیره می باشند. ازروش های بسیار متنوع ومهم آماری برای محاسبات فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنی می توان در این نرم افزار استفاده کرد.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی جمعیت کفال پوزه باریک

استخراج ژنوم میتوکندری به روش استات آمونیوم در مورد تمامی نمونه های ماهی کفال پوزه باریک انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت که از کیفیت مطلوبی برخوردار بود.

محصول PCR بدست آمده برای تمام نمونه ها حدود ۵۵۲ جفت باز بود که در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. پرایمر استفاده شده برای تمام نمونه ها باعث تکثیر قطعه ژن 16S rRNA میتوکندریایی موردنظر شد. نهایتا نتایج بدست آمده از تعیین توالی محصولات بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت که در ادامه ذکر خواهد شد.



شکل ۳-۱- نمایش باند حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪

۳-۱-۱- بررسی توالی ژن 16S rRNA میتوکندریایی

در نتیجه تعیین توالی ژن 16S rRNA با دستگاه تعیین توالی، قطعه ۵۵۲bp بدست آمده در نمونه های مختلف با استفاده از نرم افزارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت وتفاوت های نوکلئوتیدی در نمونه ها مشخص گردید. همانطور که گفته شد نمونه ها ازطریق شرکت بیونر کره جنوبی فرستاده شدند اما تعداد ۲ نمونه با توجه به غلظت کم DNAآنها جواب قابل قبولی نداشتند از رو مورد بررسی قرار نگرفتند.

تمامی توالی هابا شماره ثبت (FJ874767, EF437095 , AY169702 , GQ258709-10) از گونه مورد نظر در GenBank موجود بودند.

۲-۱-۳- توالی بدست آمده از نمونه *L.saliens*

GGGCTGACTCAGACGGGAGGTGCTGCCTGTCCTGTGACCCCTGGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGA
CCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTCTTAAATGAGGACCTGTATGAATGGCACAACGAGGGC
TTAACTGTCTCCTTTCCCCGGTCAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATCCTAACATAA
GACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACTCCAGAACAGATCATGTAAGCTACCCCCATAAAACAG
GTAATAACTATTGAATTTCTGTTCCCCTGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAAGAAAAAAACCC
CCATGTGGACCAGGAGCACATTACTCCTACAACCATGAGCCACAGCTCTAATGCACAAAACCTTTG
ACCATTAGATCCGGCAAAGCCGATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTT
TAAGAGTCCATATCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAG
CCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCAACGATTA AAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGAACCAGAGA

۳-۱-۳- مقایسه توالی های گونه مورد مطالعه

درجهت مقایسه توالی های گونه مورد مطالعه ومشخص نمودن نوکلئوتیدهای حفاظت شده وجهش یافته با استفاده از نرم افزار MEGA 4، تک تک نوکلئوتیدها در این گونه باهم مقایسه گردید که نتایج حاصل در ادامه نشان داده شده است. این بررسی ها نشان داد که از تعداد۵۵۲ ناحیه مورد مطالعه تعداد۴۸۵ ناحیه حفاظت شده و۶۷ ناحیه متغیر وجهش یافته در توالی ژن نمونه های مورد مطالعه وجود دارد.

٤-۱-۳- آنالیز داده ها

تمامی توالی ها بوسیله برنامه Clustal X (Thompson et al., 1997) در نرم افزار BioEdit 7.1.3.0ردیف شدند.

تنوع DNAمیتوکندری با سنجش تنوعنوکلئوتیدی(π) وتنوع هاپلوتایپی(h)(Nei, 1987)برای هر جمعیت با استفاده از نرم افزار DnaSP 5.10.01 (Rozas *et al.,* 2003)محاسبه شد.

درخت نزدیک همسایه (Neighbor Joining) برای نمونهها با استفاده از نرمافزار Mega Version 5.05رسم شد.

فاصله ژنتیکی (Kumar *et al.,* 2004)بین نمونه های مناطق بر اساس مدل Maximum Composite Likelihood،میانگیناختلاف جفت نوکلئوتیدی(Tamura *et al.,* 2007)داخل نمونه ها وبین نمونه های مناطقبا استفادهاز نرمافزارMega Version 5.05 بدست آمد.

شاخص ثابت (Fst)،(Hudson *et al.,* 1992) برای بدست آوردن تمایز ژنتیکی درتمام مناطق وبین مناطق با استفاده از نرم افزارDnaSp 5.10.01محاسبه شد. جریان ژنی(N_m) با استفاده از معادله Nm = [(1/Fst)-1]/2 (Weir and Cockerham,1984).

۵-۱-۳- نتایج حاصل از آنالیز داده ها

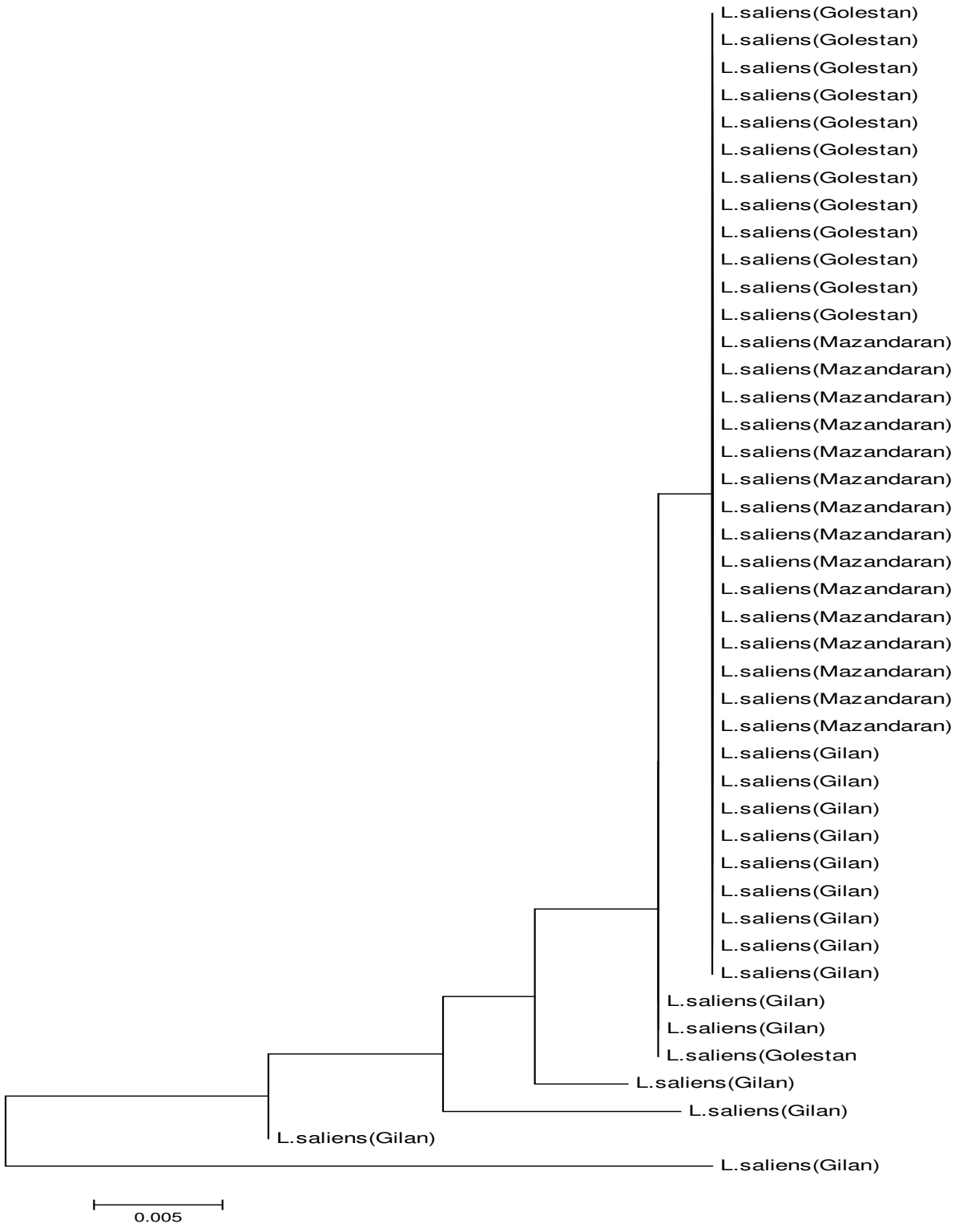
- **تنوع توالی هاوتوزیع هاپلوتایپ ها**

توالی ردیف شده mtDNA ناحیه 16S rRNA ، پس از ردیف و ویرایش شدن شامل۵۵۲ جفت باز (bp) بود. از میان توالی ها در مجموع ۶هاپلوتایپ مشاهده شد وتعداد ۲۹ جایگاه متغیر بدست آمد. ۶ هاپلوتایپ در نمونه های منطقه گیلان (Ha6,Ha5,Ha4, Ha3,Ha2,Ha1) ، ۱ هاپلوتایپ درنمونه های منطقه مازندران(Ha1)و ۲هاپلوتایپ در نمونه های منطقه گلستان(Ha2,Ha1)مشاهده شد.از بین هاپلوتیپ های بدست آمده، تمامی نمونه های *Liza saliens*در حوضه جنوبی دریای خزر سهم مشترکی در هاپلوتایپ Ha1 داشتند.هاپلوتایپ Ha2 بین مناطق گیلان وگلستان مشترک بودو چهار هاپلوتیپ Ha3,Ha4,Ha5,Ha6در نمونه های منطقه گیلان منحصربفرد بود(جدول ۳-۱). میانگین ترکیب اصلی نوکلئوتیدها در ناحیه 16s rRNAبرابر: 29.65% (A), 23.70% (T), 24.83% (C), 21.81% (G)بود.

جدول ۳-۱- توزیع هاپلوتایپ میتوکندریایی درنمونه های *L.saliens*آنالیز شده در این مطالعه

مکان / Hyplotype		گیلان	مازندران	گلستان	Σ
Ha1	9	15	1235		
Ha221	3				
Ha3	1			1	
Ha4	1		1		
Ha5	1			1	
Ha6	1			1	
				Σ 43	151513

درخت Nj بدست آمده از نمونه ها به دو شاخه اصلی تقسیم شده است، در شاخه اول شامل تمامهاپلوتایپ های بدست آمده از نمونه های *Liza saliens*در سه ناحیه گیلان ومازندران وگلستان گسترده شده بودند(Ha1,Ha2,Ha3, Ha4,Ha5)، تمامی نمونه های منطقه مازندران دارای یک هاپلوتایپ مشترک(Ha1) بودند ودر یک شاخه قرار گرفتند که مقدار بسیارپائینی از تنوع نوکلئوتیدی(۰.۰۰۰)رانشان دادند در حالیکه در شاخه دوم تنها یک هاپلوتایپ باقیمانده(Ha6)از نمونه کفال منطقه گیلان بود.



شکل۲-۳- درخت Njبدست آمده از نمونه های ماهی کفال پوزه باریک

- **آنالیزهای ساختارژنتیکی**

تنوع هاپلوتایپی(h) ژن 16s rRNA در نمونه های مناطق گیلان، مازندران و گلستان به ترتیب ۰/۶۴، ۰/۰۰ و ۰/۱۵ بود در حالیکه تنوع نوکلئوتیدی (π) به ترتیب ۰/۱۲۴، ۰.۰۰۰ و ۰/۰۰۱ بود(جدول ۳-۲).

جدول ۳-۲. تنوع ژنتیکی بین نمونه های *L.saliens* در سه منطقه (n: تعداد نمونه ، h : تنوع هاپلوتایپی ، π : تنوع نوکلئوتیدی)

منطقه	n	تعداد هاپلوتایپ	شاخص تنوع مولکولی $h\pi$
گیلان	۱۵	۶۰.۰۱۲۴۰.۶۴	
مازندران	۱ ۱۵	۰.۰۰۰	۰.۰۰
گلستان	۱۳	۲۰.۰۰۱	۰.۱۵
تمام نمونه ها	۴۳	۸ ۰.۰۰۴	۰.۲۹

نتایج بدست آمده از داده ها میزان پائینی از تنوع نوکلئوتیدی(Nei and Kumar, 2000)را بین نمونه ها نشان داد و اختلاف ژنتیکی بین نمونه ها معنی دار نبود ($p<0.05$).

محاسبه میزان جریان ژنی در نمونه های سه منطقه حاکی از وجود جریان ژنی(N_m) را در بین سه منطقه بود و بین این سه منطقه جدایی تولید مثلی وجود ندارد.

برای اندازه گیری تمایز ژنتیکی از فاکتور F_{st} استفاده می شود که به طور مستقیم ویا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز می باشد. میزان پائینی از ارزش F_{st} را در تمام نمونه های سه منطقه نشان داد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳.ارزش جفت F_{st} بین نمونه های *L.saliens* مورد بررسی در مطالعه حاضر(سطح شاخص $P<0.05$).

منطقه	گیلان	مازندران	گلستان
گیلان	–		
مازندران	۰.۱۱ –		
گلستان	۰.۰۹۰.۰۰ –		

میانگین فاصله ژنتیکی با استفاده از مدل Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) بدست آمد(جدول ۴-۳) که فواصل ژنتیکی بین نمونه های مناطق بسیار پائین بود ومقدار بالای شباهت ژنتیکی بودو

جدول ۴-۳-.مقادیر جفت فاصله ژنتیکی(*d*) بین نمونه های *L.saliens* مورد بررسی در مطالعه حاضر

منطقه	گیلان	مازندران	گلستان
گیلان	-		
مازندران	۰.۰۰۷	-	
گلستان	۰.۰۰۷	۰.۰۰۰	-

داده های بدست آمده نشان داد که بین مناطق گلستان ومازندران فاصله ژنتیکی وجود ندارد. ومقدار کل فاصله ژنتیکی بدست آمده در تمام مناطق بود.

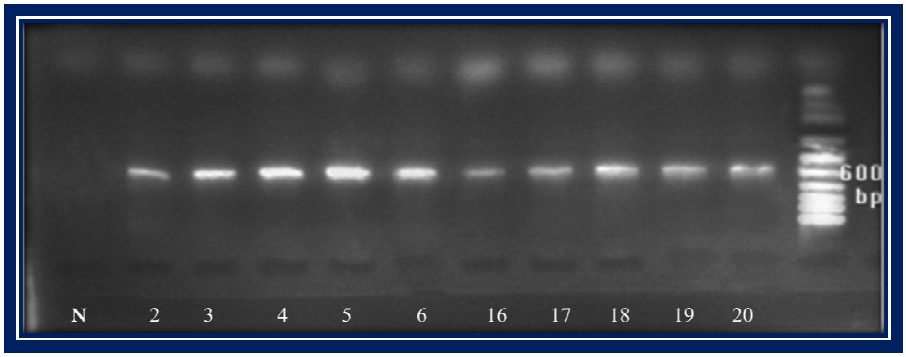
۲-۳- نتایج بررسی رابطه فایلوژنی

محصول PCR بدست آمده برای تمامی نمونه ها حدود۵۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز بود و همچنین اندازه باندها در تمامی گونه ها یکسان بودند و هیچ گونه هتروپلاسمی مشاهده نشد.

اسم نشانگر استفاده شده50bpو اندازه باندهای این نشانگر حدود ۶۰۰ جفت باز بوده همانطوریکه شکل۱۵-۳ نشان می دهد اندازه باند محصول۵۵۰ تا ۶۰۰جفت باز است (شکل ۳-۳). جفت پرایمر استفاده شده برای تمامی گونه ها باعث تکثیر قطعه ژن16srRNAمیتوکندریایی موردنظر شد، بهترین برنامه حرارتی ترموسایکلر ۶۰ درجه سانتیگراد می باشد که خوشبختانه در همان اولین بار بدست آمد.

از هر گونه ماهی ۵ نمونهPCR شد وسپس تعیین توالی شد. نهایتاً نتایج بدست آمده از توالی محصولات بدست آمده

مورد بررسی قرار گرفت که در ادامه ذکر خواهد شد.



شکل ۳-۳:نمایش باند حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

۱-۲-۳- تعیین چینش نوکلئوتیدی محصولات PCR

- ***Mugil cephalus***

توالی بدست آمده برای این گونه تا ۶۱۰ جفت بازطول خوانده شد. این توالی با CCTGCCشروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه به CGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در زیر توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

CCTGCCCNGTGACCCCTGTTCNNGGCCGCGGTATTTTAACCGCGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGT
CCCTTAAATGAGAACCAGTATGAATGGCTAGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTTCCCGACCAATG
AAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATACTAACATAAGACGAGAAGACCCTGCGGAGCTTTA
GACGCCAGAATAGATCACGTCAAATATCTCTCTCAAACAGATAACAACAAATGAACCCTATTCCAC
GTCTTAGGTTGGGGCGACCACGGTGAACAGAAAAACCCCCGCGTGGACTAAGAGCATATATTCAC
ATTTATCAATACTGCTTCTCACAACCATGAGCTACAGCTCTAAATAACAGAACTTCTGACCAAAAA
AATGATCCGGCAATGCCGATTAACGGACCAAGTTACCCCAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTAGA
GTCCATATCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAACCGCT
ATTAAGGGTTCGTTTGTTCAACGATTAAAGTCTTA(610bp)

- ***Mugil capito***

توالی انتخاب شده برای این گونه 590جفت باز طول دارد.این توالی باTCCTGCCشروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه بهCGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در زیر توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

TCCTGCCTGCCCAGTGACCCCTGTTCAACGGCCGCGGTATTTTAACCGCGCAAAGGTAGCGCAATC
ACTTGTTCCTTAAATGAGAACCAGTATGAATGGCTAGACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTTCCCAAC
CAATGAAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATACTAACATAAGACGAGAAGACCCTGCGGAG
CTTTAGACGCCAGAACAGATCACGTCAAATACCTCTCTCAAACAGGTAACAACAAATGAACCCTGT
TCCACGTCTTAGGTTGGGGCGACCACGGTGAACAGAAAAACCCCCGCGTGGACTGAGAGCATATAT
TCACACTTATTAATAC
TGCTTCTCACAACCATGAGCTACAGCTCTAAATAACAGAACTTCTGACCAAAAAAATGATCCGGCA
ACGCCGATTAACGGACCAAGTTACCCCAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTAAGAGTCCATATCGA
CAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAACCGCTATTAAGGGTTC
GTTTGTTCAACGATTAAAGTCTTA (590bp)

- ***Liza saliens***

توالی انتخاب شده برای این گونه ۵۸۰ جفت باز طول دارد. این توالی باGTCCTGC شروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه بهCGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در زیر توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

GTCCTGCCTGCCCTGTGACCCCTGGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAA
TCACTTGTCTCTTAAATGAGGACCTGTATGAATGGCACAACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTCCCCG
GTCAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATCCTAACATAAGACGAGAAGACCCTATGG
AGCTTTAGACTCCAGAACAGATCATGTAAGCTACCCCCATAAAACAGGTAATAACTATTGAATTTC
TGTTCCCCTGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAAGAAAAAAACCCCCATGTGGACCAGGAGCAC
ATTACTCCTACAACCATGAGCCACAGCTCTAATGCACAAAACCTTTGACCATTAGATCCGGCAAAG
CCGATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTAAGAGTCCATATCGACAA
GGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTT
TGTTCAACGATTAAAGTCTTA (580bp)

- ***Valamugil buchanani***

توالی انتخاب شده برای این گونه ۵۹۰ جفت باز طول دارد . این توالی باCCTGCCC شروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه بهCGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در ذیل توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

CCTGCCCTGTGACCCCCAGTTTAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTT
GTCCCTTAAATGAGGACCTGTATGAATGGCACAACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTCCCCGGTCAAT
GAAATTGATCTCCCCGTGCAGAAGCGGGGATCCTAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTA
GACTCCAGAACAGACCATGTCAGCTACTCCCCTTAAACATAGTAGTAACTATTGAGCCTCTGTTCTC
TGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAAGAAAAAATCCCCCATGTGGACCGGGAGCACCAATCTCA
CTCCCACAACCACGAGCCACAGCTCTAATGCGCAGAACTTCTGACCATATAGATCCGGCAACTAGC
CGATCAACGGACCGAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTAAGAGTCCCTATCGACAAG
GGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTT
GTTCAACGATTAAAGTCTTA (590bp)

- ***Liza subviridis***

توالی انتخاب شده برای این گونه ۵۷۰ جفت باز طول دارد. این توالی باGTCCTGCشروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه بهCGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در زیر توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

GTCCTGCCTGCCCTGTGACCCCTGGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAA
TCACTTGTCTCTTAAATGAGGACCTGTATGAATGGCAAAACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTCCCCG
GTCAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATCCTAACATAAGACGAGAAGACCCTATGG
AGCTTTAGACGCTAGAGCAGATCATGTAAGCTACCTCCATGAAATAGGTAATAACTATTGAATTTC
TGTTCCCCTGTCTTCGGTTGGGGCGACCACGGGGAATAAAAAAACCCCCATGTGGACCAGGAGCAC
ATTACTCCTACAACCATGAGCCACAGCTCTAATGCACAAAACATTTGACCATTAGATCCGGCAAAG
CCGATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTAAGAGTCCATATCGACAA
GGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTT
TGTTCAACGATTAAAGTCTTA (570bp)

- ***Liza aurata***

توالی انتخاب شده برای این گونه ۵۹۰ جفت باز طول دارد.این توالی با TCCTGCCشروع می شود و مانند تمامی توالی های بدست آمده از تمامی گونه های مورد مطالعه بهCGATTAAAGTCTTAختم می شوند که در زیر توالی کامل بدست آمده ارائه شده است.

TCCTGCCTGCCCTGTGACCCCTGGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATC
ACTTGTCTCTTAAATGAGGACCTGTATGAATGGCACAACGAGGGCTTAACTGTCTCCTTTCCCCGGT
CAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAGAAGCGGGAATCCTAACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAG
CTTTAGACTCCAGAACAGATCATGTAAGCTACCCCCATAAAACAGGTAATAACTATTGAATTTCTG
TTCCCCTGTCTTTGGTTGGGGCGACCACGGGGAAGAAAAAAACCCCCATGTGGACCAGGAGCACAT
TACTCCTACAACCATGAGCCACAGCTCTAATGCACAAAACCTTTGACCATTAGATCCGGCAAAGCC
GATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCCCTTTAAGAGTCCATATCGACAAGC
GGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAAGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGT
TCAACGATTAAAGTCTTA (590bp)

از نتایج به دست آمده مشخص است انتهای همه توالی ها یکسان است اما بعلت این که بطور طبیعی در ابتدا و انتهای تمام توالی ها مقداری بهم ریختگی ایجاد می شود توالی پرایمرها در جدول فوق قابل ردیابی نیستند.

۲-۲-۳- مقایسه چینش نمونه های مورد آزمایش با یکدیگر

در جهت مقایسه توالی گونه های مورد مطالعه و مشخص نمودن نوکلئوتیدهای حفاظت شده وجهش یافته با استفاده از نرمافزار MEGA 4 محل تک تک نوکلئوتیدها در این هفت گونه با هم مقایسه گردید که نتایج حاصل درادامه نشان داده شده است. این بررسیها نشان داد که تعداد ۴۸۸ناحیه حفاظت شده ۱۸و۱۱۴ناحیه متغیر۱۹در توالی ژن این گونه ها وجوددارد.

۳-۲-۳- رسم درخت فیلوژنتیک برای نمونه های مورد آزمایش با روش های آماری مختلف

توالی های بدست آمده از هفت گونه مورد مطالعه بعد از تأیید درستی نوکلئوتیدها با نرمافزارهای Generunner و Sequencer و بررسیهای چشمی تک تک نوکلئوتیدها ، با استفاده از برنامه Clustal X(Thompson et al., 1997)در نرم افزار Bio Edit، مرتب۲۰ شدند تا درخت آنها ترسیم شود. همچنین فرضیه های فیلوژنتیکی با استفاده از نرمافزار MEGA۴ و تست های ماکزیمم پارسیمونی و نزدیکترین همسایه بررسی شدند و آنالیز راه انداز برای شاخه های بدست آمده انجام شد. میتوان درختهای فیلوژنتیک بدست آمده باروشهای آماری متفاوت را در شکلهای مربوطه مشاهده کرد.

[18] conservation site
[19] variable site
[20] align

- **شرح درخت فایلوژنی رسم شده بروش ماکزیمم پارسیمونی[۲۱]**

بررسی نشان داد که*M.cephalus* وارداتی از مصر که در ایستگاه تحقیقات شیلاتی گمیشان گرگان نگهداری می شود و*M. Cephalus* موجود در دریای عمان در یک شاخه (A) و سایر گونه ها در شاخه ای دیگر (B) قرار گرفتندشاخهA دو زیر شاخه دارد که*M. Cephalus* وارداتی از مصر در یک گروه ژنتیکی (در یک زیر شاخه) و *M. cephalus* دریای عمان در گروه ژنتیکی دیگر (زیر شاخه ای دیگر) قرار دارند و این نشان دهنده این است که این دو گونه دارای تفاوت های ژنتیکی با هم هستند.(با عدد خود راه انداز۲۲ ۱۰۰ درصد)

شاخهB نیز خود به دو زیرشاخهD و C تقسیم می شود. در زیر شاخهC فقط گونه کفال خال آبی (*V.buchanani*) قرار دارد.(با عدد خود راه انداز ۱۰۰ درصد).

زیر شاخه D خود به دو زیر شاخه دیگرE وFتقسیم می شود. در زیر شاخهF (با عدد خود راه انداز ۶۱ درصد) گونه *L. saliens* دریای خزر وجود دارد که نشان دهنده فاصله ژنتیکی دو گونه موجود در دریای خزر می باشد.

زیر شاخهE خود به دو زیر شاخهgوh تقسیم می شود که گونه*L. subviridis* خلیج فارس و دریای عمان (رودخانه بهمن شیر) در زیر شاخهg(با عدد خود راه انداز ۹۹ درصد) و گونه های *L.aurata* و *M.capito*در زیر شاخه h (با عدد خود راه انداز ۸۰ درصد) قرار می گیرند. قرار گرفتن این سه گونه در یک شاخه (E) نشان دهنده این است که این گونه ها از نظر توالی نوکلئوتیدی بسیار به هم نزدیک هستند.(شکل ۴-۳).

- **شرح درخت فایلوژنی رسم شده به روش نزدیکترین همسایه**

رسم درخت فایلوژنی به روشنزدیکترین همسایه (N-J) نشان داد که درخت رسم شده به این روش تقریباً شبیه به درخت فایلوژنی رسم شده به روش ماکزیمم پارسیمونی (MP) می باشد. تفاوت این دو درخت در زیر شاخهD

[21]Maximum parsimony
[22]bootstrap

می باشد. همانطور که گفته شد در روش MPگونه *L. saliens*در زیر شاخهF و گونه های *L. aurata* و *L. subviridis,M.capito* در زیر شاخهE قرار گرفتند. ولی در روش N-J، گونه *L. subviridis*در زیر شاخهF(با عدد خود راه انداز ۱۰۰ درصد) قرار گرفت. زیر شاخهE که خود به دو زیر شاخه تقسیم شد سه گونه *L. aurata,M.capito* و *L. saliens*دریای خزر در این دو زیر شاخه قرار گرفتند.(با عدد خود راه انداز ۷۳ درصد) (شکل۵-۳).

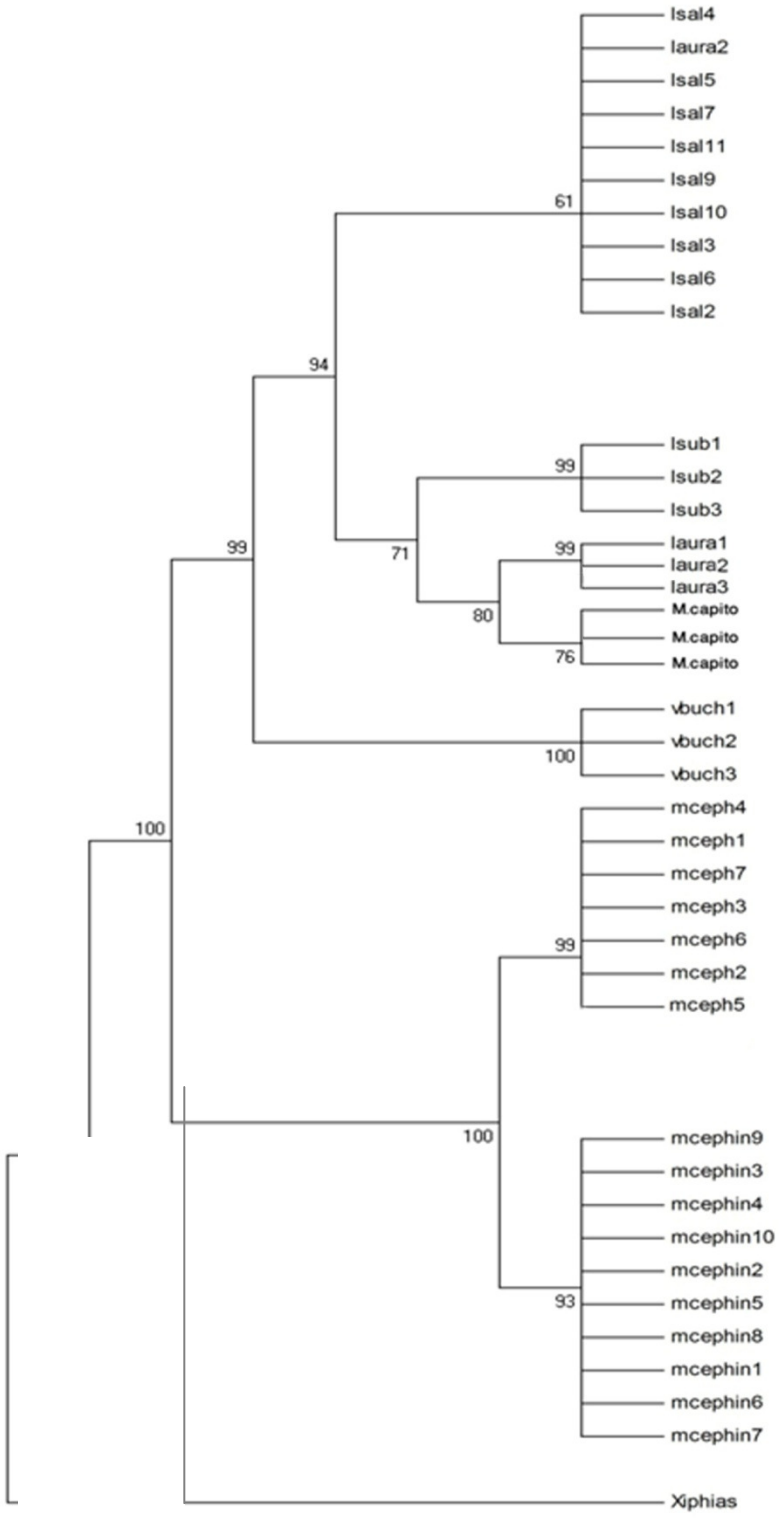
(در کل با مقایسه این دو درخت می توان نتیجه گیری کرد که توالی نوکلئوتیدی گونه *L. subviridis*خلیج فارس با گونه های *L. aurata* و *L. saliens* دریای خزر بسیار به هم نزدیک می باشند)

در درخت های رسم شده بروش N-Jو MP، گونه *Xiphias gladius*به عنوان برون گونه انتخاب شد (کد این گونه درgenbank , HM211195.1می باشد) که بدرستی در آخرین شاخه قرار گرفت و مجزا بودن آن از سایر گونه ها قابل مشاهده است.

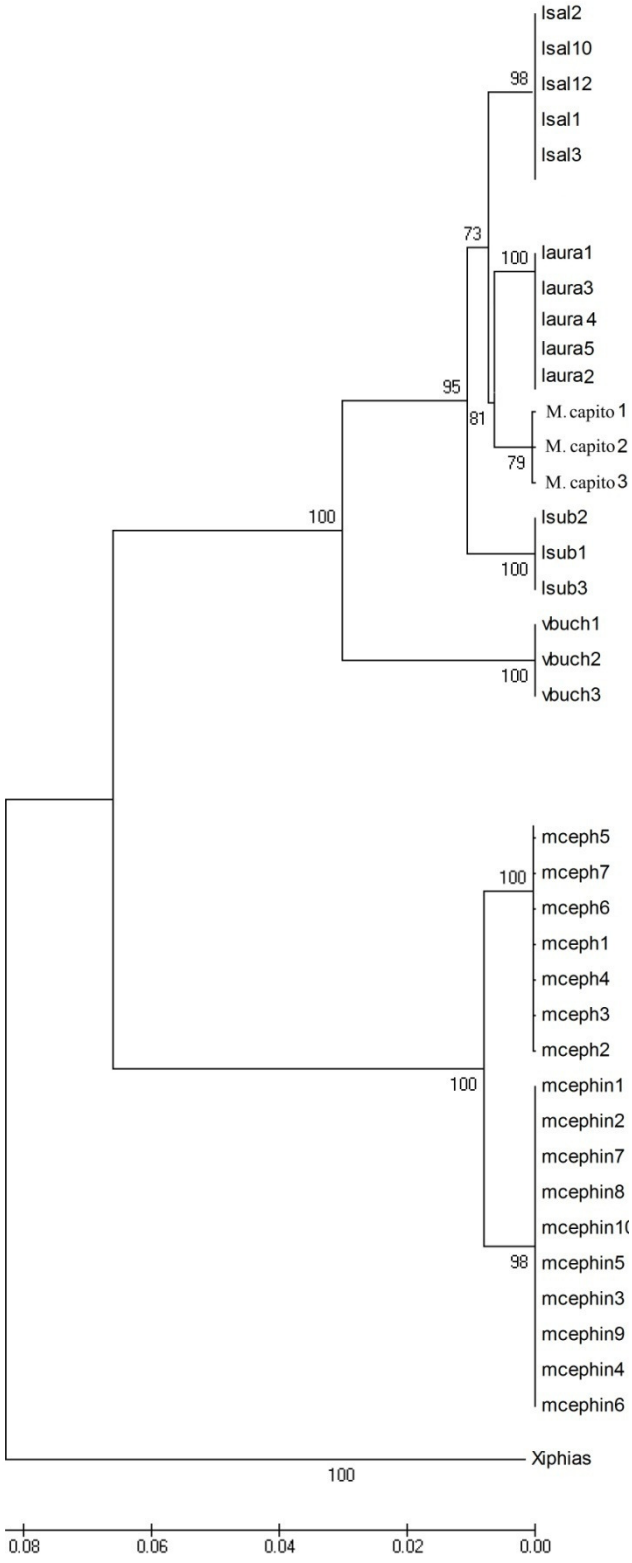
- **شرح درخت فایلوژنتیک به دو روش ماکزیمم پارسیمونی و نزدیکترین همسایه با استفاده از آنالیز خود راه انداز :**

در آنالیز خود راه انداز جایی که شاخه جدید ایجاد میشود عددی از ۱۰۰-۰ تعلق می گیرد که این عدد میزان اطمینان و صحت شاخه ایجاد شده را نشان می دهد. هرچهار عدد داده شده از ۱۰۰ کمتر باشد،این اطمینان به همان میزان کاهش مییابد. در شکل های (۴-۳) و (۵-۳) درخت های ترسیم شده به دو روش ماکزیمم پارسیمونی و نزدیکترین همسایه با استفاده از آنالیز خود راه انداز نشان داده شده است.در درخت ماکزیمم پارسیمونی گونه های *M. cephalus*موجود در دریای عمان و وارداتی از مصر در شاخهAجدا از سایر گونه ها قرار گرفتند و عدد ۱۰۰ درصد نشان دهنده این است که توالی نوکلئوتیدی این گونه با احتمال ۱۰۰ درصد از سایر گونه ها متفاوت است عددهای متفاوتی که در شاخهB و زیر شاخه های آن مشاهده می شود نشان دهنده تفاوت

های نوکلئوتیدی این گونه ها با همدیگر است.در درخت ماکزیمم پارسیمونی عدد مربوط به شاخهE که گونه های*L.Subviridis,M.capito* و *L. aurata*در زیر شاخه های این شاخه قرار می گیرند ۷۱ درصد است در صورتیکه در درخت نزدیکترین همسایه، عددها کمی متفاوت می باشند که در شکل (۵-۳) نشان داده شده است.



شکل ٤-۳: درخت رسم شده به روش ماکزیمم پارسمونی با آنالیز خودراه انداز



شکل ۵-۳: درخت رسم شده به روش نزدیکترین همسایه با آنالیز خود راه انداز

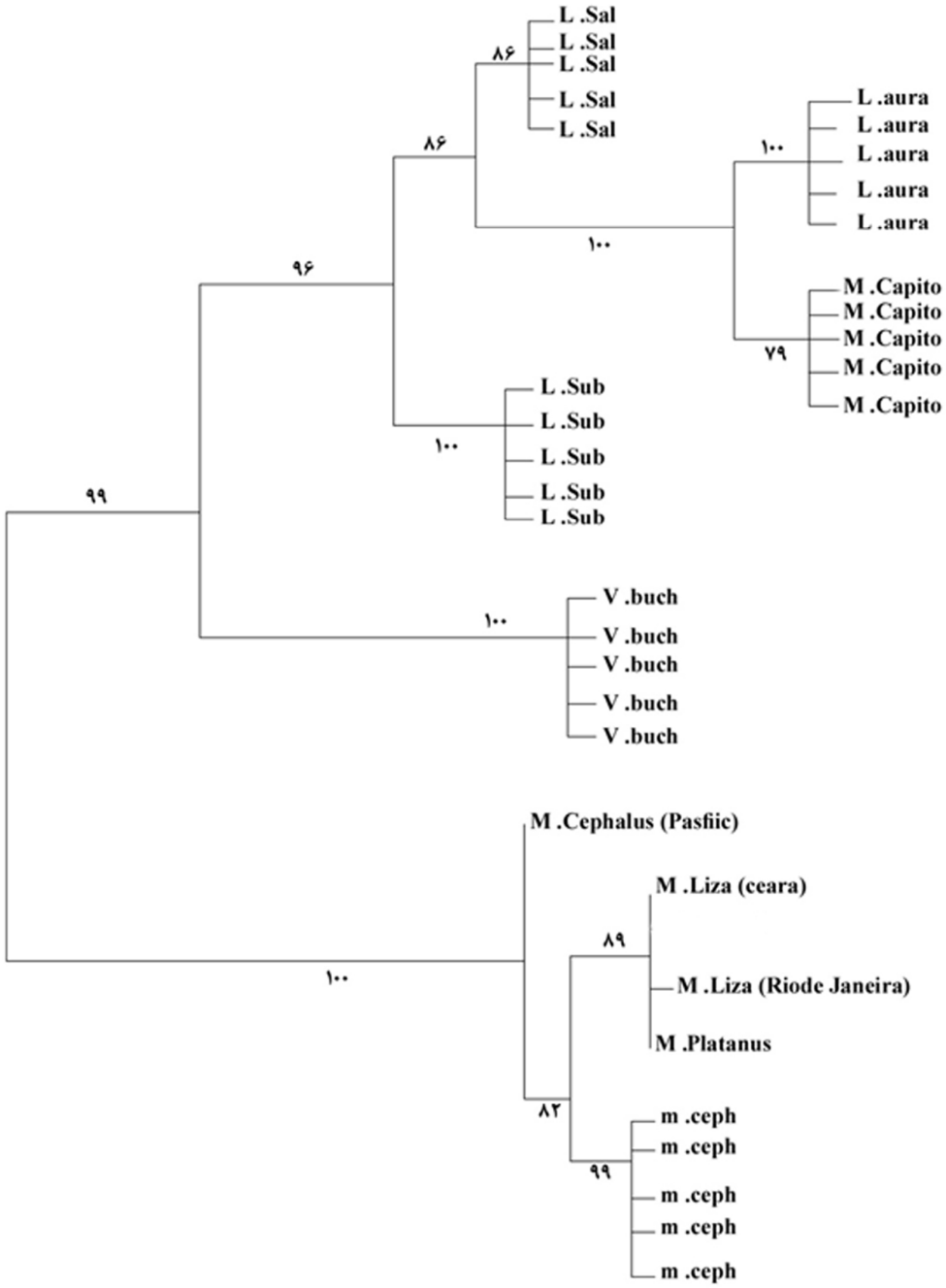
- رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از داده های بدست آمده واطلاعات موجود در بانک ژن[۲۳]

برای مقایسه جایگاه فیلوژنتیکی گونه های بررسی شده در این مطالعه با سایرگونه های کفال ماهیان که درمطالعات دیگری مورد بررسی قرار گرفته اند ،داده های ۴ گونه در کنار گونه های بدست آمده دراین مطالعه برای رسم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت(جدول۵-۳). درختهای حاصل از این مقایسه درشکلهای (۶-۳) و (۷-۳) آمده است.

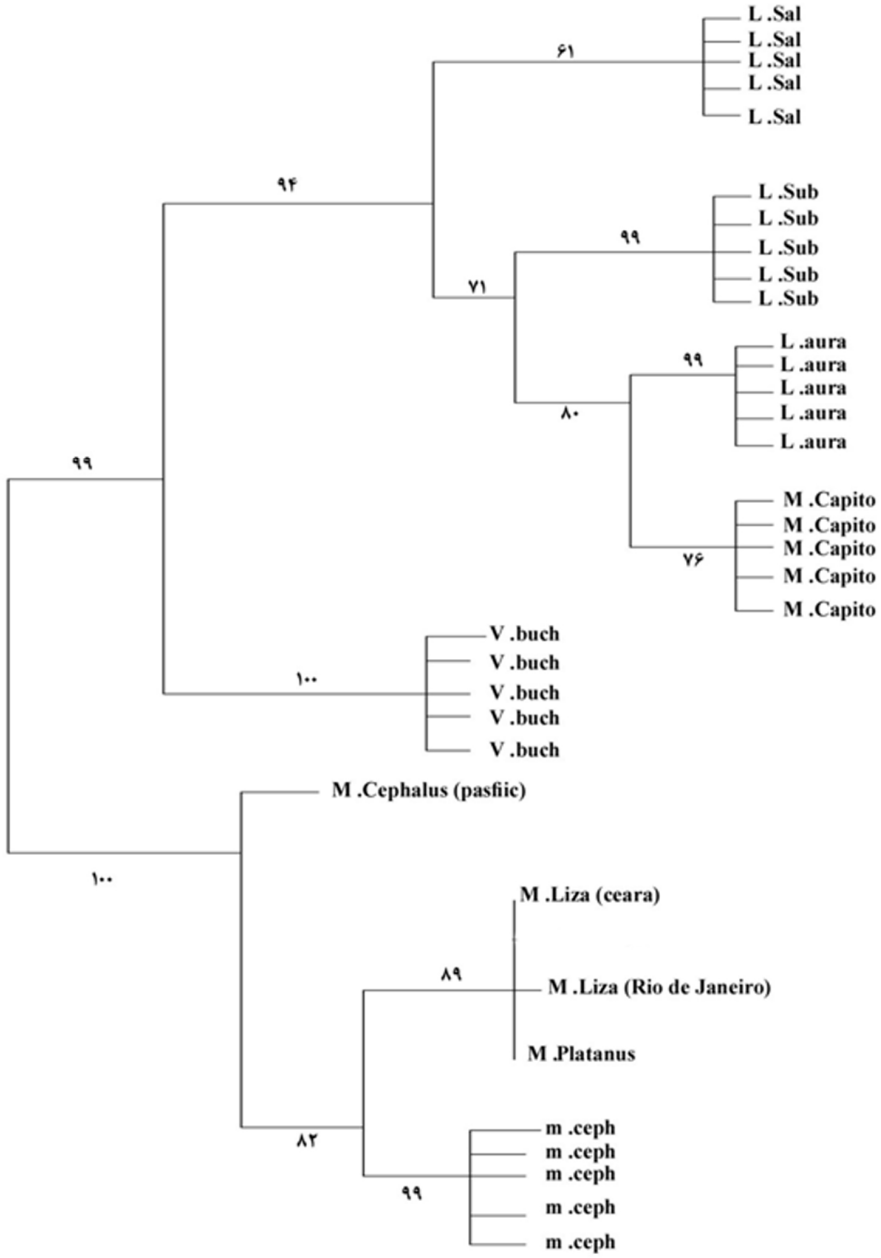
جدول ۵-۳: مشخصات گونه های بدست آمده از بانک ژن

نام گونه	کد گونه در بانک ژن
Mugil cephalus (Pasific)	*EF397140.1*
Mugil liza (Ceara)	*EF397124.1*
Mugil platanus (Santa Caterina)	*EF397137.1*
Mugil liza (Riode Janeiro)	*EF397123.1*

[۲۳] Genbank



شکل ٦-۳: درخت نزدیکترین همسایه رسم شده با استفاده از گونه موجود در بانک ژن با آنالیز خود راه انداز



شکل۷-۳- درخت ماکزیمم پارسیمونی رسم شده با استفاده از گونه موجود

در بانک ژن با انالیز خود راه انداز

- **محاسبه زمان اشتقاق گونه ها**

در اینتحقیق با استفاده از نرم افزار Bioedit فاصله ژنتیکی و نرخ زمان اشتقاق گونه ها محاسبه گردید(جداول ۶-۳ و ۷-۳).

جدول ٦-۳: فاصله ژنتیکی بین گونه های مورد مطالعه

	۱	۲	۳	۴	۵	۶
1.mugil cephalus	–	–	–	–	–	–
2.mugil capito	0.015		–	–	–	–
3.Liza Saliens	0.130	0.128	–	–	–	–
4.valamugil buchanani	0.149	0.142	0.057	–	–	–
5.Liza Subviridis	0.130	0.128	0.019	0.074	–	–
6.Liza aurata	0.142	0.139	0.015	0.067	0.027	–

همانطوریکه از این جدول بر می آید بیشترین فاصله ژنتیکی بین*V.buchanani* با *M.cephalus*(۰/۱۴۹)و کمترین فاصله ژنتیکی بین *M.capito*با *M.cephalus*و *L.aurata*با *L.saliens*(با مقادیر مساوی ۰/۰۱۵) می باشد.

جدول۷-۳ :نرخ زمان اشتقاق بین گونه ها

	۱	۲	۳	۴	۵
1.M.cephalus	----------	----------	----------	----------	----------
2.*M.capito*	0.47	----------	----------	----------	----------
3.L.saliens	1.19	0.50	----------	----------	----------
4.*V.buchanani*	0.58	0.31	0.33	----------	----------
5.*L.subviridis*	1.10	0.33	0.14	0.50	----------
6.L.aurata	2.12	0.20	1.29	1.20	0.33

همچنین کمترین نرخ زمان اشتقاق بین گونه *L.subviridis* با *L.saliens* می باشد و از آنجاییکه نرخ زمان اشتقاق به ازای هر ۱تا۲/۵ درصد یک میلیون سال می باشد(Palumbi&Maclean,1991).بنابراین نرخ زمان اشتقاق گونه های نام برده هفت میلیون سال می باشدو بیشترین نرخ زمان اشتقاق بین *L.aurata* با *M.cephalus* می باشد که حدودا ۱۰۶ میلیون سال است.

٤- بحث

١-٤- بررسی جمعیت کفال پوزه باریک

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از سه عامل ضروری حفاظت از گونه ها بیان شده است(Miller, 1997). طی سالیان گذشته با پیشرفت علم ژنتیک تکنیک های سریع وقابل اعتمادی برای تعیین ساختارژنتیکی جمعیت ها، میزان خویشاوندی بین گونه ای ودرون گونه ای بوجود آمده است. مدیریت بهینه ذخایر آبزیان به اطلاعاتی درمورد ساختار جمعیتی گونه ها نیاز دارد که این علم آنرا در اختیار محققین گذاشته است. در گذشته بدلیل نبود ابزار لازم برای مشخص کردن تنوع ژنتیکی ، اکتفا کردن به صفات مورفولوژی آبزیان وعدم وجود اهداف مشخص وروشن در برنامه های مدیریتی ، به این گونه مباحث کمتر توجه می شد. چندین نواحی DNA هسته ومیتوکندری برای شناسایی گونه های ماهیان وبررسی ساختار ژنتیکی آنها بکار گرفته شده است (Ballard and Whitlock, 2004). ناحیه 16s rRNA از DNA میتوکندری یک مارکر مناسب برای مطالعات ژنتیکی ماهیان می باشد(Dudud *et al.,* 2011;Hillis and Dixon, 1991).

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آنها می نماید. یکی از راه های بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان استفاده از ژنتیک جمعیت ها می باشد. شناسایی تحولات درون گونه ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی ، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه ای، سیستماتیک وطبقه بندی آنهامیباشد(Rezvani, 1997).

بررسی ساختار ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک به عنوان یک گونه مهم اقتصادی وباارزش که جمعیت آنها بطور قابل توجهی کاهش یافته است ، ضروری می باشد.بطور کلی یکی ازمهمترین نیازها در مدیریت شیلاتی شناختن ذخایر گونه هامی باشد. نداشتن آگاهی کافی از ساختار ذخیره نیز می تواند به برداشت نادرست(بیشتر یا کمتر) از آن منجر گردد(Papasotiropoulos*et al.,* 2002). مدیریت ذخایر در صورتیکه برپایه اطلاعات دقیق از قبیل مطالعات مولکولی باشد، بهتر می تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی ، میزان برداشت وبهره برداری را به حد معقول وحداکثربرساند(Murgia*et al.,* 2002).

مطالعات mt DNA می‌تواند در شناسایی ذخایر ماهیان و تعیین سهم ذخایر مذکور در صید ذخایر ترکیبی مفید واقع شده و اطلاعات مفیدی را برای مطالعه وجود اختلاف ژنتیکی ماهیان در اختیار قرار دهند(Murgia *et al.,* 2002). از آن جایی که تاکنون تحقیقاتی بر روی تنوع ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک در سواحل جنوبی خزر انجام نشده است و

با توجه به اهمیت اقتصادی این گونه در صنعت صیادی و ماهیگیری جهت مدیریت ذخایر بهتر در این تحقیق سعی نمودیم با استفاده از نشانگر mt DNA تا حدودی به رفع این مشکل کمک کنیم.

بررسی ساختار ژنتیکی و مطالعات جمعیتی ماهی کفال پوزه باریک از پیشینه مطالعاتی برخوردار نمی باشد به طوری که تنها پژوهش انجام انجام شده در ایران بر روی ماهی کفال پوزه باریک توسط نادری وهمکاران در سال ۱۳۸۸ بوده که با روش ریز ماهواره به بررسی جمعیت های ماهی کفال پوزه باریک در استان گلستان پرداخت. لذا میتوان گفت که این پژوهش برای اولین بار به برسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی در ماهی کفال پوزه باریک در حوضه جنوبی دریای خزر به روش توالی یابی ناحیه میتوکندری، که یک روش دقیق برای انجام مطالعات مولکولی می باشد پرداخته است.

- **تنوع mtDNA داخل وبین جمعیت های *Liza saliens***

در این تحقیق ژن 16s rRNA ماهی کفال پوزه باریک که روی ژنوم میتوکندری قرار دارد با تکنیک PCR تکثیر وسپس توالی یابی شد. تمام نمونه های *L.saliens* مناطق مختلف سطوح نسبتا بالائی از تنوع هاپلوتایپی وسطوح پائینی از تنوع نوکلئوتیدی را برای این مارکر مولکولی نشان دادند، که تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی کل بدست آمده به ترتیب ۰/۲۹و ۰/۰۰۴ بود.تعداد کل هاپلوتایپ بدست آمده ۶ عدد بود وتعداد ۲۹ مکان متغیر بدست آمد که بیانگر تنوع جمعیتی نسبتا بالا داخل جمعیت اما تنوع محدودی بین جمعیت ها بود. مقادیر بالای تنوع هاپلوتایپی در گزارش Nguyen وهمکاران در سال ۲۰۰۹ که به مطالعه تنوع ژنتیکی در گونه *Tor tambroides*و*T.douronensis* با استفاده از ژن 16s rRNA در آبهای مالزی پرداخت مشاهده شد.همچنین این مقدار با گزارشات Erguden *et al.*,2010در جنس های کفال ماهیان دریای مدیترانه و Caldara*et al.*, 1996، Papasotirpoulos*et al.*, 2007, Rossi *et al.*, 1998 , 2004در جنس های مشابه مطابقت داشت.

همچنین نادری وهمکاران در سال ۱۳۸۸ به مطالعه ساختار ژنتیکی کفال پوزه باریک دریای خزر در منطقه گلستان به روش ریزماهواره پرداختند که میزان بالائی از تنوع هاپلوتایپی مشاهده نمودند.

بطور کلی ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بیشتر واختلاف ژنتیکی کمتری نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می دهند که دلیل آن به اندازه بزرگ جمعیت موثر وجریان ژنی بالا در محیط های دریایی وبه عکس جریان ژنی محدود در ماهیان آب شیرین نسبت داده می شود (Rossi *et al.*, 2004).

فاکتور F_{st} نشان دهنده وجود تمایز بین جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی می باشد با توجه به گزارش Wrightدر سال ۱۹۷۸ هرگاه میزان F_{st} بدست آمده کمتر از ۰/۰۵ باشد نشان دهنده وجود تمایز کمی در بین جمعیت ها می باشد اگرچه حتی مقدار کم F_{st}نیز می تواند بازگوکننده اختلاف ژنتیکی مهمی در بین جمعیت ها باشد(Menezes*et al.,* 1992). هرگاه مقدار آن بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ باشد نشان دهنده تمایز متوسط ومقدار بالای ۰/۱۵ نشان دهنده تمایز بالاست.در این بررسی مقدار F_{st} کل بدست آمده (۰/۰۹) بود که بیشترین مقدار F_{st} بین دو منطقه گیلان ومازندران بود(۰/۱۱) وکمترین مقدار آن بین دو منطقه مازندران وگلستان (۰.۰۰) محاسبه گردید. در این مطالعه میزان تمایز ژنتیکی در دومنطقه گیلان وگلستان در محدوده تمایز ژنتیکی متوسط قرار دارد.با توجه به اینکه از لحاظ جغرافیایی فاصله بین دومنطقه انزلی(گیلان) ولاریم(مازندران) تا منطقه تالاب گمیشان زیاد می باشد، این نشان دهنده آن است که نمونه های منطقه گیلان ومازندران دارای ذخایر پایدارتری می باشند.

قطب رزمجو وهمکاران در سال ۱۳۸۷ ساختار جمعیت گاوماهی در حوزه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند که جمعیت قابل جداسازی تشخیص ندادند ویک جمعیت واحد بیان نمودند که آنها دلیل این امر را در مناسب ندانستن ژن COI و D-LOOP برای مطالعه جمعیت گاوماهی دانستند که توالی مورد استفاده دچار هیچگونه جهش در طی دوران تکاملی خود نگردیده است وچه بسا انتخاب ژن های دیگر نتایج متفاوتی نشان دهند. همچنین ممکن است شریط اکولوژیک دشواری که در دریای خزر در دو دهه اخیر روی داده ونیز اعمال فشار صید بر ذخایر موجب حذف افراد جمعیت با ژنوتیپ های متفاوت گردیده وژنوتیپ موجود به دلیل شرایط و ویژگی خاص خود، قادر به بقا وادامه حیات در دریای خزرباقی مانده اند.

میانگین جریان ژنی بین جمعیت ها ۵.۰۵ بود، براساس گزارش Li, 2007 ، هرگاه $N_m>1$باشد جریان ژنی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است وهرگاه $N_m<1$ باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی می شود. بر میزان جریان ژنی بدست آمده در بین مناطقمی توان اذعان کرد که جمعیت جدای بارزی در این مناطق وجود ندارد که می تواند به دلیل مهاجرتهای آزادانه مولدین به سایر مناطق ودر نتیجه اختطلاط ماهیان کفال سه منطقه می باشد.

از آنجایی که پدید آمدن گونه های جدید منوط به افزایش اختلافات ژنتیکی میان جمعیتهای جدا یا نسبتا جدا از یکدیگر می باشد، بنابراین بطور قطع می توان میان پارامترهایی نظیر جریان ژنی، فواصل جغرافیایی وگونه زایی ارتباط برقرار نمود(Beacham & Macconachi, 2004). هرچه میزان جریان ژنی بین مناطق بیشتر باشد، اختلاف ژنتیکی کمتر است(Nei, 1972).

مرحله اول گونه زایی نیز ایجاد جمعیت های جدا از هم بوده که بواسطه جدایی تولید مثلی نیز ایجاد می شودواصولا اختلاف ژنتیکی بین جمعیت ها در نتیجه مجتمع شدن افراد در یک منطقه خاص بوجود می آید وجمعیت های یک گونه بواسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می کنند و خصوصیات تولید مثلی یک گونه عامل اصلی در تمایز آن جمعیت می باشد(Turan *et al.*, 2005).

از آنجایی که ماهی کفال پوزه باریک یک ماهی رودکوچ نبوده ومهاجرت تخم ریزی به داخل رودخانه ندارد و با توجه به اینکه در دریا بین مناطق مختلف موانع فیزیکی وزیستی برای مهاجرت این ماهیان وجود ندارد ازاینرو این ماهیان قادرند آزادانه به تمامی مناطق مهاجرت تولید مثلی داشته وبا هم آمیزش کنند. مهاجرت تولید مثلی این ماهیان در همان دریا انجام میگیرد. از طرف دیگر شرایط شوری ودمایی قسمت های مختلف دریای خزر در حدی نمی باشد که به عنوان مانعی در برابر مهاجرت این ماهیان باشد ازاینرو نمونه های کفال مناطق مختلف گیلان،مازندران وگلستان می توانند آزادانه مهاجرت کرده با همدیگر آمیزش داشته باشند وجریان ژنی در نتیجه این آمیزش ها افزایش یابد وتنوع ژنی افزایش یافته ومیزان اختلافات ژنی کاهش یابد.

رحمانی وهمکاران در سال۱۳۸۸تنوع ژنتیکی جمعیتهای ماهی شاه کولی*Chalcalburnus chalcoides*در رودخانه های هراز،شیرود و گزافزود با استفاده از ژن 18S rRNA به روش PCR-RFLP موردبررسی قرار دادند. در این بررسی تنوع ژنتیکی وتفاوت های احتمالی با استفاده از آنالیز RFLP وبررسی ژن 18S rRNA مورد بررسی قرار گرفت. ۵آنزیم از ۸ آنزیم برش دهنده محصول PCR پلی مرفیسم را نشان داد و۱۰ هاپلوتیپ مختلف مشخص شد.میانگین تنوع نوکلئوتیدی در سه جمعیت مورد مطالعه ۰/۰۰۰۰۳۳۸ ± ۰/۰۴۵۹۸ بود. تست ناهمگنی با استفاده از شبیه سازی مونت کارلو با ۱۰۰۰ بار تکرار نشان دادکه اختلاف معنی داری بین هاپلوتیپ های سه جمعیت وجود ندارد وجمعیت ها از یک جامعه همگنی بودند.($P\geq$ ۰/۰۵).

لالوئی وهمکاران در سال ۱۳۸۵ به بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی(*Clupeonella cultriventris*) در حوضه جنوب دریای خزر به روش PCR-RFLP پرداخت. طی آن با استفاده از یک جفت پرایمر از توالی نوکلئوتیدهای ناحیه D-LOOP مولکول mtDNA در کل ۱۰۰ عدد نمونه محصول PCR حدود ۱۰۱۵ جفت باز بدست آمد وجهت هضم آنها از ۱۳ آنزیم اندونوکلئاز استفاده شد.۵آنزیم الگوهای پلی مرفیک را نشان دادند که درنتیجه آن ۹هاپلوتیپ مختلف بدست آمد. براساس نتایج حاصله وآنالیز آماری داده ها، تفاوت بین هاپوتیپ ها معنی دار نبود($P\geq$۰/۰۱) وبنابر این می توان گفت ساختار ژنتیکی متفاوتی بین دو منطقه نمونه برداری مشاهده نگردید. و ماهیان کیلکای معمولی از یک جمعیت واحد درحوزه جنوبی دریای خزر می باشند.

Lehoczky و همکاران در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی کپور معمولی را با استفاده از ژن‌های ND-3/4 و ND-5/6 میتوکندری و آنالیز PCR-RFLP و همچنین ۴ لوکوس ریز ماهواره‌ای مطالعه نمودند. در این بررسی برای ژن ND-5/6، ۴ آنزیم محدودکننده و برای ژن ND-5/6، ۲ آنزیم محدودکننده به کار بردند. که پلی‌مرفیسم را نشان ندادند و جمعیت کپورمعمولی از یک جمعیت واحد برخوردار بودند.

هرچند شناختن فاکتورهای قابل قبول برای یافتن علت سطوح پائین اختلافات ژنتیکی آسان نمی باشد ولی فعالیت های بیش ازحدانسانی می تواند یکی از این دلایل باشد از اهم این فعالیت های انسانی، صید بی رویه می باشد.بهره برداری بیش ازحد یکی از عوامل اصلی انقراض گونه های دریایی است(Cheng*et* al., 2008).طی سالهای بعد از انقلاب صید بی رویه ماهیان استخوانی وبویژه کفال ماهیان لطمه شدیدی بر ذخایر این گروه از ماهیان وارد نمود. میزان صیدسالانه کفال ماهیان در ایران بدلیل مهاجرت پائیزه این ماهیان برای زمستان گذرانی به سواحل ایران بیش از ده برابر صید سالانه سایر کشورهای حاشیه دریای خزر می باشد ومی توان گفت در ایران بیش از ۹۰ درصد ذخایر کفال ماهیان دریای خزر بهره برداری می شود. که از میزان اندازه جمعیت این ذخایر به شدت کاسته شده است. از دیگر فعالیت های انسانی می توانند برمحیط تاثیر گذار باشند آلودگی های محیطی می باشد که میتواند برروی تنوع ژنتیکی تاثیر منفی داشته باشد. از اینرو در منطقه جنوبی دریایی خزر برخی مقیاس ها برای صیدوآلودگی ها به منظور کاهش تاثیر فعالیت های انسانی استفاده وبکارگرفته شود.

مطالعات کمی مبنی بر وابستگی صید بی رویه و کاهش سطوح تنوع ژنتیکی انجام شده است که به طور قطع بیان کننده این موضوع باشد. این مطالعات شامل (Snape *Pagrus auratus*) (Hauser *et al.*,2002) ، North sea cod (Hutchinson *et al.*, 2003)*Gadus morhua* و Dark blotched rockfish *sebastes crameri* (Gomez-Uchida & Banks, 2006) می باشد. در حالیکه کاهش چشمگیری در ذخایروتعدادگونه هایی نظیر tambaqui (*Colossoma macropomum* Northern red snapper (*Lutjanus campechanus*) و red drum (*Sciaenops ocellatus*)گزارش شده که همراه با کاهش تنوع در mtDNA نبود. در واقع افزایش فعالیت های انسانی باعث افزایش تنوع ژنتیکی در منطقه و وارد نمودن فشار زیادی بر ذخایر منطقه می گردد(Cheng *et al.*, 2008).

یکی دیگر از دلایل کاهش اندازه جمعیت کفال ماهیان ورود شانه دار به دریای خزر است که طی سالهای گذشته وارد دریای خزر شده وبدلیل مناسب بودن شرایط محیطی بخوبی در دریای خزر گسترش یافته است(Ivanov *et al.*, 2000). شانه دار مهاجم بشدت از زئوپلانکتون ها تغذیه میکند که میتواند نوعی رقابت غذایی را بین شانه دار ولارو ماهی کفال پوزه باریک بوجود آورد وفقر غذایی موجب کاهش ضریب بقا کفال پوزه

باریک شود از طرف دیگر هم شانه دار مهاجم بشدت از تخم ولارو ماهیان تغذیه می کند(Kides & Romanova, 2001) ودرماه های گرم سال از تراکم آن کاسته می گردد(روحی وفضلی، ۱۳۸۱)، با توجه به اینکه زمان نکثیر وتخم ریزی کفال پوزه باریک ماه های گرم سال بوده، تراکم زیادشانه دار مهاجم وتغذیه از تخم ولارو این ماهی می تواند بر بازسازی ذخایر این گونه تاثیر نامطلوبی داشته باشد واز جمعیت این ذخایر کاسته شود(فضلی وغنی نژاد، ۱۳۸۳).

موضوع دیگری که وجود دارد این است که احتمالا ژن 16s rRNA ، ژن مناسبی برای بررسی جمعیت ماهیان کفال پوزه باریک نبوده ونمی تواند به خوبی اختلاف بین جمعیت ها را نشان دهد، از آنجایی که این ژن در درون گونه ها موتاسیون آنها پائین است ونقاط حفاظتی دارد نمی تواند بیان کننده جمعیت ها باشد وبیشتر برای تفکیک گونه ها از هم مناسبتر است. از اینرو توصیه می شود از ناحیه دیگری از ژنوم میتوکندریایی مثل ناحیه D-LOOP مورد مطالعه قرار گیرد.

۵- نتیجه گیری نهایی

داده های بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که در بخش جنوبی دریای خزر، مدرک کمی وجود دارد که بیان کند نمونه های *Lizasaliens*به سه جمعیت مجزا تقسیم شود ودر تمام مناطق مورد بررسی یک جمعیت واحد زندگی میکنند. وجود این ساختار ژنتیکی همسان می تواند بدلیل عادت های اکولوژیکی ، مهاجرت آزادانه ماهیان به سایر مناطق ، نبود تقابل بین گونه های کفال پوزه باریک ، فعالیت های شدید انسانی همچون صید وصیادی وآلودگی محیط دریایی باشد

۱-۵-بررسی رابطه فایلوژنی

تاکنون مطالعات ژنتیکی محدودی بر روی کفال ماهیان انجام شده است:Menzesو همکاران (۱۹۹۲) فاصله ژنتیکی دو جنس مختلف*L. subviridis*و*M. cephalus*را بسیار نزدیک به یکدیگر دانستند. Caldaraو همکاران (۱۹۹۶) نیز با استفاده از توالی یابی فاصله ژنتیکی بین*L. saliens*و*C. labrosus*را نزدیک به هم گزارش کردند. طبق مطالعاتی کهTuran و همکاران (۲۰۰۵) انجام دادند *L. abu* و *L. aurata*دریک شاخه قرار گرفتند و فاصله ژنتیکی کمی بایکدیگر دارند.Papasotiropoulos و همکاران (۲۰۰۷) روابط فیلوژنتیک بین ۵ گونه کفال ماهیان آب های یونان(*M. cephalus, Chelonlabrusus, L. aurata, L. ramada and L. saliens*) را با استفاده از توالی یابی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که*L. aurata*و*C. Labrosus*بسیار به یکدیگر نزدیک می باشند و*M.cephalus*از سایر گونه ها فاصله ژنتیکی بسیار زیادی دارد.Liuو همکاران (۲۰۱۰) رابطه فایلوژنی ۹ گونه از کفال ماهیان سواحل چین را به روش توالی یابی با استفاده از نشانگر مولکولی mtDNA (16s ,12s rRNA) بررسی کردند و مشخص شد که*M. cephalus*بیشترین اشتقاق ژنتیکی را در بین گونه های کفال ماهیان دارد.۴ گونه جنسLizaهمگی دارای جد مشترک می باشند.جنسOsteomugil نسبت به جنسEllochelon رابطه خویشاوندی نزدیکتری با جنس Vallamugil دارد.Erguden و همکاران (۲۰۱۰) رابطه فایلوژنتیک ۸ گونه کفال ماهیان ازدریای مدیترانه(*Mugil cephalus,L.*

ramada,L.aurata, L. abu, Chelon labrasis, Oedalachelis labeo) و گونه*M. Soiuy*از دریای سیاه بروش توالی یابی با استفاده از نشانگر مولکولی mtDNA(16s rDNA)تعیین کردند و مشخص شد کهگونه *M. Cephalus*بطور واضح از سایر گونه ها جدا افتاده است. آنها پیشنهاد کردند که گونه های*M.*soiuyو L. abuبهتر است با هم در جنس قرار گیرند و یا اینکه برای این دو گونه جنس جدیدی نامگذاری شود.همچنین هیچ تفاوت ژنتیکی بین *C. labrasus*و *L. ramada*وجود ندارد و گونه های*C. labrasus*و *O. labeo*بهتر است که در جنسLiza قرار گیرند.

در این تحقیق روابط خویشاوندی ۶ گونه از کفال ماهیان آبهای ایران *L. aurata, L. saliens, M.cephalus, L. (sabviridis, Valamugilbuchanani, M.capito*)را که دارای اهمیت اقتصادی بالایی هستند با استفاده از روش توالی یابی بخشی از ژنوم میتوکندری (16s rRNA) تعیین گردید. بدین منظور، ۱۰ نمونه از هر کدام از گونه های کفال مذکور را از سواحل دریای خزر خلیج فارس، دریای عمان و رودخانه هورالعظیم صید و توسط کلید FAO (1983)شناسایی شدند سپسDNA مربوط به آنها با استفاده از روش فنل کلروفورم استخراج گردید.

از آنجا که روش توالی یابی دقیق ترین روش می باشداز این روش استفاده شد تا به نتایج مطمئن تری دست یافته شود.پس از انجام مطالعات از پرایمری که توسط Palumbiو همکاران (1991) طراحی شده بود استفاده گردید. نتایج حاصل از PCR با این پرایمر نشان داد که محصولات PCRفقط یک باند بر روی ژل آگاروز ایجاد می نماید و هیچ گونه هتروپلاسمی مشاهده نشد که این نشان از صحت پرایمر برای تکثیر قطعه ژنوم 16s rRNAمورد نظر و نبود بیش از یک نوع مولکول میتوکندریایی در این گونه های مورد بررسی از سوی دیگر می باشد.

بیشترین میزان اشتقاق ژنتیکی[24]تخمین زده شده را گونه*M. cephalus*در مقایسه با سایر گونه ها دارد که این نتیجه مطابق با مطالعات(Papasotiropoulos et al. (2001, 2002, 2007 که با استفاده ازPCR-RFLP, allozymeو تعیین توالی سه قطعه ژن میتوکندریایی (COI,12s rRNA,16s rRNA) انجام دادند مطابقت دارد. همچنین مطابق با تحقیقات Caldara et al.(1996); Murgia et al.(2002); Rossi et al. (2004); Turan et al. (2005) and Liu et al. (2010);

[24]genetic divergence

Fraga et al. (2007) نیز می باشد. این نظریه توسط مطالعات کروموزومی نیز تایید شده (;Rossi et al.,(1997) Gornung et al. (2001);Cataudella et al. (1974)همچنین نتایج تحقیقات Liu و همکاران(۲۰۱۰) نشان می دهد که اشتقاق ژنتیکی زیادی بین اجدادM. cephalusموجود در بخش شمالی و جنوبی دریای چین وجود دارد که با رشد و تکامل اندامها شاید این اشتقاق ژنتیکی بواسطه متحدالشکل بودن این ماهیان (سفالوس های سواحل شمالی و جنوبی دریای چین) از نظر مورفولوژی مشخص نمی باشد.

به علت این اشتقاق ژنتیکی بزرگی که بین گونه *M. cephalus*با سایر گونه ها مشاهده می شود بعضی از دانشمندان (e.g., Caldara et al., (1996);Rossi et al. (2004); Turan et al., (2005); Smithet al., (2003))معتقدند که باید در طبقه بندی سیستماتیک گونه های کفال ماهیان تجدید نظر صورت گیرد.(1993) Bullو Hillisبا رسم درخت های فایلوژنتیکیN-Jو bayesian نشان دادند که گونه *M. cephalus* در یک شاخه ی کاملا جدا قرار گرفته است که این نتیجه را Papasotiropoulos et al., (2001,2002,2007)نیز بدست آورد. محققانی مانند(1996) ,.Caldara et al و Murgia et al., (2002)نیز چنین نتایجی را بدست آوردند.

در این مطالعه نیز با توجه به مقادیر بالای خودراه انداز در درخت فایلوژنی رسم شده با استفاده از روش هایMPوN-Jکه گونه *M. cephalus*در شاخه ای کاملاً جدا قرار گرفته است می تواند تاییدی بر نظریه تجدیدنظر طبقه بندی گونه های کفال ماهیان باشد.

درخت بدست آمده بروش neighbor-joiningنشان داد که دو گونه *L.saliens*و*L.aurata*در یک شاخه و گونه*L.subviridis*در شاخه ای جدا قرار گرفت درصورتیکه درخت رسم شده بروشmaximumparsimony نشان داد که گونه های*L.subviridis*و*L.aurata*در یک شاخه قرار می گیرند و گونه*L.saliens*در شاخه ای جدا قرار گرفت.

ولی در درخت رسم شده به روش N-J، گونه*L. subviridis*در شاخه ای جدا از دو گونه *L. saliens* و*L.aurata*قرارگرفت. با توجه به این دو درخت، این ۳ گونه از یک جنسLiza در یک شاخه قرار نگرفتند. این نتیجه مطابق با یافته های(2007) .Papasotiropoulos et alو متفاوت با نتایج (2002) .Papasotiropoulos et alمی باشد.Papasotiropoulos et al(2002)بیان کردند که سه گونه از جنس Liza همگی در یک شاخه قرار می گیرند) این تناقض مشاهده شده شاید به علت اختلاف در روش های کار باشد که نتیجه آن بدست آمدن نتیجه ای بهتر در اثر استفاده از توالی یابی نوکلئوتیدها در مقایسه با روش PCR-RFLPمی باشد (Papasotiropoulos, et al. 2007). لازم به ذکر است که(2004) .Rossi et alمطالعاتی را با استفاده از قطعه ژنوم 16s rDNAانجام دادند و به نتایجی شبیه به نتایج تحقیق جاری و نیز مشابه با نتایج (2007) .Papasotiropoulos et alدر ارتباط با روابط فایلوژنتیکی کفال ماهیان رسیدند.(2004) Rossi et laبیان کرد که ۳ گونه جنس Lizaخانواده کفال ماهیان بسیار به یکدیگر شبیه هستند که این، یک عامل محدودکننده برای پاسخگویی به سوالات روابط خویشاوندی این خانواده می باشد.

(1991) Howesو Harrisonبا بررسی اندامpharyngobranchial در گونه های کفال ماهیان بیان کردند که گونه های جنسLizaباهم در یک شاخه قرار نمی گیرند. تفاوت در روابط فایلوژنتیکی بین گونه های جنسLiza شاید به علت تفاوت در سیستم های ژنتیکی (genetic systems)استفاده شده (mtDNA vs. allozyme)،استفاده از قطعات متفاوت mtDNA و یا نمونه برداری گونه های مورد مطالعه از مناطق جغرافیایی مختلف باشد (Papasotiropoulos et al. 2007).

البته گاهی اوقات در روابط فایلوژنتیکی بدست آمده از طریق مطالعات مولکولی و مورفولوژیکی تفاوتی مشاهده می شود که این اصلا غیر عادی نیست، چرا که در علم طبقه بندی اثبات تفاوت های مورفولوژیکی مشکل می باشد و همچنین تصمیم اینکه کدام ویژگی مورفولوژی برای طبقه بندی صحیح تر است اصلاً آسان نیست (Liu et al. 2010).همانطور که(1975) Tortoneseنشان داد اهمیت پلک چشم به عنوان یک ویژگی قابل

شناسایی ابهام آمیزی می باشد و Song (1982) کشف کرد که نمو پلک چربی گونه *L. haematocheila* بستگی به رشد فردی هر کدام از نمونه های این گونه دارد. بنابراین، لازم است در ارتباط با تعیین رده بندی کفال ماهیان مطالعات بیشتری انجام شود، البته نه فقط گونه های بیشتری بررسی شوند بلکه بخش های متفاوتی از ژنوم (مثلا ژنوم هسته ای در مقابل ژنوم میتوکندریایی) مورد مطالعه قرار گیرند (Papasotiropoulos et al. 2007).

پیشنهادها

- پیشنهاد می شود که با استفاده ازسایر قطعات ژنوم میتوکندریایی گونه های کفال ماهیان نیز تحقیق شود.
- روابط فایلوژنتیکی سایر گونه های کفال ماهیان ایران را نیز بررسی گردد.
- تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف کفال ماهیان آب های ایران را نیز تعیین شود

منابع

اصلان پرویز، ح.، ۱۳۷۰. کفال ماهیان دریای خزر. ماهنامه آبزیان شماره ۱ صفحات ۲۰ تا ۲۵.

تقوی، ا. ۱۳۷۷. روش های مناسب حفاظت از آبزیان . مجموعه مقالات هفتمین کنفرانس ملی شیلات ایران (ماهیگیری مسئولانه). شرکت سهامی شیلات ایران .

رحمانی، ح.،کاظمی،ب.، پورکاظمی، م.،بندهپور،م.، نادریجلودار، م.، سید، ن.،عطایی، ف.، تنوع ژنتیکی جمعیت های ماهی شاه کولی *Chalcalburnus chalcoides* در رودخانه های هراز، شیرود وگزافزود با استفاده ازژن 18S rRNA به روش PCR-RFLP . علوممحیطیسالششم،شمارهسوم،بهار۱۳۸۸.

رزمجو، ا.ق.، رضوانی، س.، قوام مصطفوی، پ.، فاطمی، س.م.ر. و پورکاظمی، م.، بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری (*Neogobius caspius* Eichwald,1831) درحوضه جنوبی خزر به روش PCR-RFLP. مجله شیلات سال دوم،شماره سوم، پاییز۱۳۸۷.

رضوانی گیل کلائی، س.، سالاری علی آبادی، م.ع.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح.، نبوی، س.م.ب.، بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علمی شیلات ایران سال هجدهم، شماره ۳، پائیز ۱۳۸۸.

رضوی صیاد، ب.، ۱۳۶۹. ارزیابی ومدیریت ذخایرماهیان استخوانی واقتصادی دریای مازندران. مرکز تحقیقات شیلات استان گیلان. ۸۶ صفحه.

روحی، ا. و فضلی، ح. ۱۳۸۱. بررسی میزان تراکم وزیتوده *Menemiopsis leidyi* در آبهای سواحل مازندران وگلستان در طی سالهای ۸۰-۱۳۷۹. اولین همایش ملی شانه داران دریای خزر. ساری۱۳۸۱.

ستاری، م. (۱۳۸۹). ماهی شناسی عمومی، انتشارات حق شناس، ۱۸۰-۱۸۵.

یابلونسکایا، ا.، ۱۹۸۹. دریای خزر، فون و تولیدات بیولوژیکی ان، ترجمه ابوالقاسم شریعتی ۱۳۷۱ موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، ۲۸ صفحه.

صادقی، ن. (۱۳۸۰). ویژگی های زیستی و ریخت شناسی ماهیان آب های جنوب ایران (خلیج فارس و دریای عمان), انتشارات نقش مهر، ۲۱۰-۲۱۲.

عبدلی، ا.، نادری، م. ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان، ۲۳۸ صفحه.

غنی نژاد ومقیم. ۱۳۷۲. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر. مرکز تحقیقات شیلاتی گیلان. ۶۵ صفحه.

فضلی، ح . و غنی نژاد، د.(۱۳۸۳). بررسی صید و برخی جنبه های زیست شناختی کفال ماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر مجله علمی شیلات ایران.116-97.

قلیچی،ا. عریان، ش. احمدی، م. کاظمی، ر. حلاجیان، ع. (۱۳۸۲).مطالعه بافت شناسی Mugil cephalusدر مرکز تکثیر و پرورش مراحل مختلف رسیدگی تخمدان در ماهی کفال خاکستری ماهی و میگوی گمیشان. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری..صفحات ۱۰۰-۱۱۵

لالوئی. ف.، رضوانی گیل کلائی، س.، فاطمی، ر. و تقوی، ج. ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA (PCR-RFLP). مجله علمی شیلات ایران،سال هفدهم، شماره ۲،تابستان ۱۳۸۷، صفحات۱۰۱-۸۹.

لالوئی. ف. ; رضوانی گیل کلائی، س; نیرانی، م. و تقوی، ج. ، ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۱۲۸-۱۱۹.

نادری، ل.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب.، رضائی، ح.ر. ۱۳۸۸ . بررسی تمایز ژنتیکی ماهی کفال پوزه باریک *Liza saliens* (Risso, 1810) در آبهای ساحلی گلستان با استفاده از جایگاه های ریزماهواره. دومین کنفرانس ملی علوم شیات وآبزیان ایران. لاهیجان.

نقوی، م.ر.، قره یاضی، ب.، حسینی سالکده، ق . ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی. انشارات دانشگاه تهران، ۳۴۰ صفحه.

هالرمن، اریک.، ۱۳۸۴. اصول وروش های مطالعات ژنتیکی ماهیان(جلد اول). ترجمه: ایرج هاشم زاده سقرلو. انتشارت نقش مهر، ۴۴۸ صفحه.

وفایی، ب.(۱۳۸۰). بیولوژی ماهیان آب های شور با تأکید بر خانواده های کفال ماهیان، گیش ماهیان،آزاد ماهیان دریایی، پایان نامه کارشناسی، دانشگده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، ۱۰۷ص.

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

یوسفیان، م. عریان، ش. فرخی، ف. و عصائیان، ح. (۱۳۸۲).مطالعه رشد تخمک در ماهی کفال پوزه باریک *Liza saliens Risso* ، مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۱. صفحات ۱۳۱تا ۱۵۲.

Abdulsamadov, A. S., Pushbarank, A. B. and Kahli Bigaf,K., 2004. Biology of sea herring, common Kilka and mullet the fishing prospects in the west Caspian sea. Research report, 2003. Kaspernikh Astrakhan pages 381-383.(In Russian).

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A.,Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C., 1991. Complementary DNA sequencing:expressed sequence tags and human genome project. Science 252, 1651– 1656.

Adcock, G.L., Ramírez, B., Hauser, L., Smith, P., Carvalho,G.R., 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scalesfrom New Zealand snapper. Journal of Fish Biology 56:1283-1287.

Agresti, J.J., Seki, S., Cnaani, A., Poompuang, S., Hallerman, E.M., Umiel, N., Hulata, G., Gall, G.A.E., May, B.,2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. Aquaculture 185, 43– 56.

Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., Lundeberg, J., 2000. Singlenucleotidepolymorphism analysis by pyrosequencing. Anal. Biochem. 280, 103–110.

Akyol, O., 1999. Homa Dalyanı (İzmir Körfezi) Kefal (Mugilidae) Türlerinin Demekolojisi. PhD Thesis. Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir. 124P. (in Turkish).

Akyol, O. Kinacigil, T., 2001. Comparative body and otolith morphometrics of Mugilidae in Homa Lagoon (Izmir Bay, Aegean Sea). Acta. Adriatica, 42(2): 3-13.

Amini, F., 1989. Biology of mullet species and their adaptation to fresh water. Nat. conf. fisheries resource management of the Caspian Sea, Babolsar, pp. 73–79.

Anene,A., 1999. Morphometric and meristic description of Tilapia mariae (Boulenger, 1901) and *Tilapia zillii* (Gervais, 1848) from the Umuoseriche Lake in the freshwater reaches of the Niger delta floodplains. Acta. Hydrobiol. 41: 211-218.

Aranishi, F., 2006. Single fi sh egg DNA extraction for PCR amplifi cation. Conservation Genetics 7:153-156.

Asensio,L.G. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. Food Science & Technology journal (18)558-568.

Avanesov, A.M., 1972. The present status of mullets reproduction (the genus mugil) in the Caspian sea. Voprosy Ikhtiologii(Problems of Ichthyology). Vol.12.3: 467-470 pp.(In Russian).

Avise, J.C., 1989. A role for molecular geneticists in the recognition and conservation of endangered species. Trends Ecol. Evol. 4, 279– 281.

Avis,J.C. (1991). Molecular markers, natural history and evolution champman and hall,New York.

Avise, J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution.Chapman & Hall,London.

Avise, J.C., 1998. Conservation genetics in the marine realm. J. Hered. 89, 377–382.

Avise JC, Helfman GS, Saunders NC, Hales LS, 1986. Mitochondrial DNAdifferentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an nusual life history pattern. Proc Natl Acad Sci USA. 83:4350-4354.

Azam, A., Paul, J., Sehgal, D., Prasad, J., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., 1996. Identification of novel genes from Entamoeba histolytica by expressed sequence tag analysis. Gene 181, 113– 116.

Ballard, J. W. O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13: 729–744.

Bartlett & Stirling., 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 226:3-6.

Beachman, T.D. and MMacconachi, C., 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley sound, British Colombia. Journal of fish Biology, 61:1021-1032.

Beaumont, A.R. (Ed.), 1994. Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman & Hall, London.

BenTuvia, A., 1986. Mugilidae. pp1197-1204. In: P.J.P., Whiteland, M.-L Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean.Unesco, Paris.

Benzie, J.A., Ballment, E., Forbes, A.T., Demetriades, N.T., Sugama, K., Moria, S., 2002. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, Penaeus monodon. Mol. Ecol. 11, 2553–2569.

Berg, L. S., 1948. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Zoological Institute Akademy Nauk Moscow USSR 1(27), Vol. 1. [In Russian, English translation, 1962: Office ofTechnical Services, Department of Commerce, Washington, DC].

Berg, L. S., 1965. Freshwater fishes of the U.S.S.R and adjacent countries, Vol. III. Academy of Science of the USSR Zoological Institute, ISPT Press, Jerusalem, 510 pp. (Translated from Russian, Israel Program for Scientific Translations).

Billington,N. and Hebert,P.(1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Can J Fish Aqua Sci 48:80-94.

Birky CW, Jr, Maruyama T, Fuerst P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. Genetics. 1983 Mar;103(3):513–527.

Birky, C.W., Fuerst, P., Maruyama, T., 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. Genetics 121, 613– 627.

Blel. H., Chatti. N., Besbes. R., Farjallah. S., Elouaer. A., Guerbej. H., Said. K., 2008. Phylogenetic relationships in grey mullets (Mugilidae) in a Tunisian lagoon. Aquacult. Res. 39: 268-275. Costa JL, De Almeida PR, Costa MJ .

Brock, T. D., & Freeze H. (1969). Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile.Journal of Bacteriology. 98, 289-297.

Brown, W.M., 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), Molecular EvolutionaryGenetics. Plenum, New York, NY, pp. 95–130.

Brown, B., Epifanio, J., 2003. Nuclear DNA. In: Hallermann, E.M. (Ed.), Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 458 pp.

Burton, R.S., 1996. Molecular tools in marine ecology. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 200, 85– 101.

Caldara,F., Bargelloni,L., Ostellari,L., Penzo,E., Colombo,L., Patarnello,T.(1996). Mullecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: Evidence of differential rate of evolution at the intrafamily level.Mol Phylogenet Evol 6:416-424.

Cardona, L., 1999. Age and growth of leaping grey mullet (*Liza saliens* (Risso, 1810)) in Minorca (Balearic Islands). Scientia Marina, 63(3), 93-99.

Carvalho, G.R., 1998. Advances in molecular ecology NATO Sciences Series. Serie A: Life Sciences, vol. 306.IOS Press, Amsterdam.

Cataudella, S., Civitelli, M.V., Capanna, E. (1974). Chromosome complements of the Mediterranean mullets (Pisces, Perciformes). Caryologia 27, 93–105.

Chakraborty, A., Sakai, M., and Iwatsuki, Y., 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. Journal of Applied Ichthyology 22:160-166.

Chang, D.D., Fisher, R.P., Clayton, D.A., 1987. Roles for a promoter and RNA processing in the synthesis of mitochondrial displacement-loop strands. Biochimica et Biophysica Acta 909: 85-91.

Cheng, Q., Ma, C., Cheng, H., Zhang, Q., 2008. Mitochondrial DNA diversity of Coilia mysyus (Clupeiformes: Engraulidae) in three Chinese estuaries. Environ Biol fish 83:277-282.

Chow, S., Clarke, M.E., Walsh, P.J., 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. Fish. Bull. 91, 619–627.

Chow, S., Kishino, H., 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus Thunnus (Scombriidae: Teleosrei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. J. Mol. Evol. 41, 741– 748.

Coad ,B.W.(1995). Fresh water fishes of Iran. Nat. Acad .Sci.Brno.29(1):1-64.

Congiu, L., Dupanloup, I., Patarnello, T., Fontana, F., Rossi, R., Arlati, G., Zane, L., 2001. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. Mol. Ecol. 10, 2355–2359.

Cox, D.R., Burmeister, M., Price, E., Kim, S., Myers, R.M., 1990. Radiation hybrid mapping: a somatic cellgenetic method for constructing high-resolution map of mammalian chromosomes. Science 250, 245–250.

Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C., Bickham, J.W., 1993. Mitochondrial DNAvariation in chinook (*Oncorhyncus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 708– 715.

Cummings, A.S., and Thorgaard, G.H., 1994.Extraction of DNA from fish blood and sperm.Biotechniques 17:426.

De Silva, S.S. 1980. Biology of juvenile grey mullet: a short review. Aquaculture 19:21-36.

Dmitriev, A.N., 1964. Mullet in the Iranian waters of Caspian. Priroda, 12: 74-75.

Dodgson, J.B., Cheng, H.H., Okimoto, R., 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. Poult. Sci. 76, 1108–1114.

Dudud, A., Georgescu, S. E., Popa, O., Dinischiotu, A., Costache, M. 2011. Mitochondrial 16S and 12S rRNA sequence analysis in four Salmonid species from Romania. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 57(3), pp. 233–246.

Elzaeem, S.Y. 2011.Phynotype and genotype differentiation between flathead grey mullet Mugil) (cephulusand thinlip grey mullet (*Liza ramada*). African Journal of Biotechnology. 10(46), 9455-9492.

Erguden,D., Gurlek,M., Yaglioglu,D., Turan,C. (2010). Genetic identification and taxonomic relationship of Mediterranean Mugilid species based on Mitochondrial 16s rDNA sequence data. Journal of animal and veteinary advances. 9(2):336-341.

FAO.(1983). Species identification sheets for fishery purpose, Vol 3.Western Indian Ocean (fishing area 511).

FAO 2006 Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit FISH-STAT Plus: Universal software for ¢shery statistical time series [database on the Internet].Version 2.3. Food and Agriculture Organization of the UnitedNations, Rome, 1996^2000 (date of update/revisionunknown; cited 28 August 2006). Available from:ftp://ftp.fao.org/ FI /stat/windows/ ¢ shplus/fst_plus.zip.

Fazli, H., 1998. Some biological characteristics of Liza aurata in thesouthern coasts of the Caspian Sea, Iranian Sci. Fish. J. 7, 41–56.[In Farsi].

Fazli, H. ; Janbaz, A.A. ; Taleshian, H. and Bagherzadeh, F., 2008. Maturity and fecundity of golden grey mullet (Liza aurata Risso, 1810) in Iranian.

Feral, j.p., 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 268: 121– 145.

Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodo¨ hl, P. A., McMeel, O., Thompson, C.,

Stone, C., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Journal of Fish Biology, 47, S103eS126.

Fevolden,S.E. and Pogson,G.H.(1997).Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian Coastal and North-east Arctic population of Atlantic Cod.J.of fish biology. 51:895-908.

Fraga, E., Schneider, H., Nirchio, M., Santa-Brigida, E., Rodrigues-Filho, L.F., Sampaio, I. (2007). Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. J. Appl. Ichthyol 23, 598–604.

Franco, G.R., Adams, M.D., Bento, S.M., Simpson, A.J.G., Venter, J.C., Pena, S.D.J., 1995. Identification of newSchistosoma mansoni genes by the EST strategy using a directional cDNA library. Gene 152, 141–147.

Ghaninejad, D. ; Abdolmalaki, S. ; Kuliyev, Z. M., 2009. Reproductive biology of the leaping grey mullet, Liza salience in the Iranian coastal waters of the Caspian sea. Iranian journal of fisheries sciences, 9(3) 402-411.

Gold, J.R., Richardson, L.R., Furman, C., King, T.L., 1993. Mitochondrial DNA differentiation and population structure in red drum (Sciaenops ocellatus) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. Mar. Biol. 116, 175–185.

Gomez-Uchida, D. and Banks, M.A. 2006. Estimation of effective population size for the long-lived darkblotched rockfish Seabastes cramen. Journal of Heredity. 97: 603-606.

Gornung E, Cordisco CA, Rossi AR, Innocentiis DS, Crosetti D and Sola L (2001) Chromosomal evolution in Mugilidae: Karyotype characterization of Liza saliens and comparative localization of major and minor ribosomal genes in the six Mediterranean mullets. Mar Biol 139:55–60.

Graves, J.E., McDowell, J.R., Jones, M.L., 1992. A genetic analysis of weakfish Cynoscion regalis stock structure along the mid-Atlantic coast. Fish. Bull. 90, 469–475.

Harrison IJ., 2002. Mugilidae: mullets. In: Carpenter KE, Ed. The livingmarine resources of the western central Atlantic. Vol 2. Bony fishespart 1 (Ascipenseridae to Grammatidae). Rome, FAO Species IdentificationGuide for Fishery 2: 1071-85.

Harrison ,I.J. and Howes ,G.J. (1991). The pharyngobranchial organ of mugilid fishes: its structure , variability, ontogeny, possible function and taxonomic utility. Bull Br Mus Nat Hist (Zool) 57:111-132.

Hauser L, Adcock G, Smith PJ, Bernal Ramirirez JH and Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*) PNAS 99: 11742-11747.

Hillis,D.M. and Bull,J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst Biol 42:182-192.

Hecker, K.H., Taylor, P.D., Gjerde, D.T., 1999. Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products. Anal. Biochem. 272, 156– 164.

Heras, S., M. I. Roldan & M. G. Castro. 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 19: 217-231.

Hillis,D.M. and Bull,J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst Biol 42:182-192.

Hillis, D. M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology 66: 411–453.

Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132, 583–589.

Imsiridou, A., Minos, G., Katsares,V., Karaiskou, N., Tsiora,A., 2007. Genetic identification and phylogenetic inferences in different Mugilidae species using 5S rDNA markers. Aquaculture Research, 1-10.

Ivanov, P.I., Kamakim, A.M., Ushivtzev, V.B., Shiganova, T., Zhukova, O., Aladin, N., Wilson, S.L., Harbison, G.R., Dumount, H.J., 2000. Invasion of Caspian sea by the Jelly fish menemiopsis leidyi (Ctenophora). Biological Invation, Vol.2.pp: 255-259.

Katselis G., 1996. Biology of the leaping grey mullet (*Liza saliens* Risso, 1826) (Pisces:Mugilidae) in Messolonghi Etolikolagoons. PhD Thesis, University of Patras, p. 193 (in Greek with English abstract).

Katselis G, Hotos G, Minos G, Vidalis K .2006. Phenotypic affinities onfry of four Mediterranean Grey Mullet species. Turk. J. Fish. Aquat.Sci. 6: 49-55.

Kaya, M., Bilecenoglu, M. & Ozaydin,O., 2000. Growth characteristics of the leaping greymullet (*Liza saliens*, Risso, 1810), in Homa Lagoon, Aegean Sea. Israeli Journal Aquaculure.-Bamidgeh, 52(4): 159-166.

Kaya, M., Mater, S., Korkut, A.Y. 1998. A new grey mullet species Mugil soiuy Vasilewsky (Teleostei: Mugilidae) from the Aegean coast of turkey. Turk J Zool 22:303-306.

Kideys, E. and Romanova, Z. 2001. Distribution of gelatinous macro zooplankton in the southern Black sea during 1996-99. Marin Biology. Pp:545-544.

King, M., 2007. Fisheries Biology, Assessment and management. Blackwell Publishing.Oxford, 382 P.

Khoshkholgh, M., Pourkazemi ,M., Nazari, S., Azizzadeh Pormehr, L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, Acipenser percicus, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. Caspian J. Env. Sci. 2011, Vol. 9 No.1 pp. 17~25.

Khoroshko, A.L., 1981. population abundance and structure in the long fined mullet (Gen Liz, Muglidae) during acclimation in the caspian sea. Kasp Nirkh, Kranso vodsk, pp: 62-69.

Konovalov, I. M., 1959: Unsuccessful experiment in acclimatizing grey mullet, USSR. English translation published by Office of Technical Service. Department of Commerce, Washington, DC (1961), Rybn. Khoz. 35, 20–22.

Kosarev, A. N.; Yablonskaya, E. A., 1994. The Caspian Sea. SPB Academic Publishing, The Hague, NL, 255 p.

Kumar S, Tamura K. & Nei M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform. 5, 150–163.

Lehoczky, I. ; Jeney, z. ;Magyary, I. ; Hancz, c. and Kohlmann, K. , 2005. Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at research Institute for fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. Aquaculture, Vol. 247, pp.45-49.

Li. D., Kang, D., Yin, Q., Sun. Z., Liang, L., 2007. Microsatellite DNA marker analysis of Genetic Diversity wild common corp (*Cyprinus carpio* l.) population. Genetic and Genomic, 34:984-993.

Liao, I.c. 2005. Aquaculture practices in Taiwan and its visions. Journal of the Fisheries Society of Taiwan, 32(3):193-206.

Liu, B.H., 2002. Mitochondrial DNA sequence variations and systematicsof the genus Distoechodon (Teleostei: Cyprinidae). J. Appl. Ichthyol. 18 ,181–184.

Liu,J.Y., brown,C.L., Yong,T.B.(2010). Phylogenetic relationships of mullets (Mugilidae) in China Seas based on partial sequences of two mitochondrial genes. Biochemical Systematics and Ecology 38:647-655.

Liu, Z.J & Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238 : 1 –37.

Liu, Z.J., Karsi, A., Dunham, R.A., 1999. Development of polymorphic EST markers suitable for geneticlinkage mapping of catfish. Mar. Biotechnol. 1, 437–447.

Liu, Z.J., Karsi, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R., 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channelcatfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. Genetics 165,687–694.

Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N., Panara, F., 2006. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store andextract high-quality DNA from fi sh body mucus and buccal cells. Molecular Ecology Notes 6:257-260.

Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Povh, J.A., Gomes, P.C., Vargas, L., and Streit.D.P. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplifi ed Polimorphic DNA) markers. Journal Animal Science 84:170.

Martins, C., Adriane P. W., Oliveira.C., Foresti, F., 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of Leporinus elongatus from the Paraná River basin. Genetics and Molecular Biology, 26, 1, 33-38.

Menzes,M.T., Martins,M., Naik,S.(1992). Interspecific genetic divergence in grey mullets from the Geo region. Aquaculture 105,117.

Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, p. 1.

Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computersoftware distributed by author.

Mortitz, C. 1994. Applications of mitochondrial Dna analysis in conservation: a critical review. Molecular Ecology 3:401-411.

Moritz,C., Dowling,T.E., Brown,W.M.(1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann Rev Ecol Syst 18:269-292.

Murgia, R., Tola, G., Archer, S.N., Vallerga, S., Hirano, J. (2002). Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (bottarga). Mar. Biotechnol. 4, 119–126.

Nam, Y.K., Park, J.E., Kim, K.K., Kim, D.S., 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fi sh using a restricted amount of fin tissue. Transgenic Research 12:523-525.

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283-292.

Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.

Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press.

Nelson,J.S. (1994). Fishes of the world. Wiley ,New York .

Nelson, J.S., (2006). Fishes of the World, fourth ed. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY.

Nguyen, T.T.T., F. Brian Davy, M. Rimmer and Sena De Silva. 2009. Use and exchange of genetic resources of emerging species for aquaculture and other purposes. FAO/NACA Expert Meeting on the Use and Exchange of Aquatic Genetic Resources Relevant for Food and Agriculture, 31 March – 02 April, 2009, Chonburi, Thailand.

Nikolskii, G.V. (1963). The ecology of fishes. Academic press. london.

Oren,O.H.(1981).Aquaculture of grey mullets.Cambridge university press,New York,pp.65-98.

O'Reilly, P., Wright, J.M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheriesand aquaculture. J. Fish Biol. 47, 29– 55.

Palumbi,S., Martin,A., Romano,S., McMillan,W.O., Stice,L., Grabowski,G. (1991). The simple fools guide to PCR, version II. Honolulu: University of Hawaii.

Papasotiropoulos,V. Klossa-Kilia,E. Alahiotis,N.S. Kilias,G.(2001). Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleost: Mugilidae) using allozyme data. Biochemical Genetics,39(5-6):68-155.

Papasotiropoulos,V. Klossa-Kilia,E. Alahiotis,N.S. Kilias,G.(2002). Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleost: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. Biochemical Genetics, Vol.40,Nos.3/4.

Papasotiropoulos,V. Klossa-Kilia,E. Alahiotis,N.S. Kilias,G. (2007).molecular phylogeny of grey mullets (teleostei:Mugilidae) in Greece: evidence from sequence analysis of mtDNA segments.biochem genet 45:623-636.

Partis, L., Wells, R.J., 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD).Mol. Cell. Probes 10, 435– 441.

Payne, A.L., 1976. The relative abundance and feeding habits of the grey mullet species occurring in an estuary in Sierra Leone, West Africa. Marine Biol. 35: 277-286.

Pherson MM, Moller S. Moller SG. (2000). PCR (Basic: from background to bench). BIOS Scientific Publishers Ltd.

Probatove, S. N. and Tereshchenko, K. K., 1951. The Caspian sea Mullet and its fisgeries. Pishchepromizdat, Moscw. P.115.

Rezvani-Gilkolaei, S., (1997). Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspion Sea. Ph.D. dissertation.University of Wales, Swansea.

Rodrigues, R., Schneider,H., Santos, S., Vallinoto, M., Sain-Paul, U., Sampaio,I., 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (Cynoscion acoupa, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. Genetics and Molecular Biology, 31, 2, 487-492.

Rossi, A.R., Gornung, E., Crosetti, D.(1997). Cytogenetic analysis of Liza ramada (Pisces, Perciformes) by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. Heredity 79, 83–87.

Rossi,A.R. Capula, M. Crosetti,D. Campton,D.E. Sola, L. (1998). Genetic divergence and phylogenetic inferences in five species of Mugilidae (Pisces: Perciformes). Mar boil 131:213-218.

Rossi, A.R., Ungaro, A., De Innocentiis, S., Crosetti, D., Sola, L.(2004). Phylogenetic analysis of Mediterranean Mugilids by allozymes and 16S mt-rRNA genes investigation: are the Mediterranean species of Liza monophyletic? Biochem. Genet. 42, 301–315.

Rozas, J., Sanchez, J. C., Delbarrio, X., ROZAS, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

Schultz ,L.P.(1946). A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae with description of three new genera. Proc US Nat Mus 96:377-395.

Semina,A.V., Polyakova,N.E., Barykov,V.A. (2007). Analysis of mitochondrial DNA: Taxonomic and phylogenic relationships in two fish taxa (pisces:Mugilidae and Cyprinidae). WWW.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205618.

Serapion, J., Kucuktas, H., Feng, J., Liu, Z.J., 2004. Bioinformatic mining of type I microsatellites fromexpressed sequence tags of channel catfish (Ictalurus punctatus). Mar. Biotechnol. (in press).

Sire, J.Y., Girondot, M., Babiar,O., 2000. Marking zebrafish, Danio rerio (Cyprinidae), using scaleregeneration. Journal of Experimental Zoology 286:297-304.

Smith,P.T., kambhampati,S., Armstrong,K.A.(2003). Phylogenetic relationships among Bactrocera species (Diptra: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 26:8-17.

Song, J.K.(1982). Revision of three common Mugilid fishes from China. Chin. J. Zool. 2, 7–12.

Sorrentino, R., Potolicchio, I., Ferrara, G.B., Tosi, R., 1992. A new approach to HLA-DPB1 typing combining DNA heteroduplex analysis with allele specific amplification and enzyme restriction. Immunogenetics 36, 248–254.

Soyinka & Olukolajo. 2008. The feeding ecology of Mugil cephalus (Linnaeus) from a high brackish tropical lagoon in South-west, Nigeria. African Journal of Biotechnology, Vol. 7 (22), pp. 4192-4198.

Stiassny ,M.L.J.(1993). What are grey mullets? Bull.Mar.Sci 52:197.

Surzycki, S. 2003. Human Molecular Biology Laboratory Manual, Blackwell Publishing.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. Proc Natl Acad Sci USA. 101:11030–11035.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. Mega 4: Molecular Evolution Genetics Analysis(MEGA) software version 4.0. Mol. Bio. Evol., 24:1596-1599.PMID:17488738. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F.,Higgins, D.G.(1997). Clustal_X windows interface: flexiblestrategies for multiple sequence alignment aided by quality analysistools. Nucleic Acids Res. 25: 4876–4882..

Thomson,J.M. (1963).synopsis of biological data on the grey mullet (*Mugil cephalus*) 1758.fish.synop.div.fish.oceanogr.C.S.I.R.O. Astralia,(1).

Thomson,J.M.(1981). The taxonomy of grey mullets. In: Aquaculture of grey mullets (O.H.Oren,Ed.). Combridge university press, New York, pp 1-15.

Tomazo, G. I., 1940. The mullet of the northeast part of the Black Sea. Tr. Novoross. Biol. Stn. 2, 25 pp.

Tereshenko, K. K., 1950. Materials for the Caspian sea mullets fisheries (KASPINIRO) in tarybn. Khva I okeanogr. 11:49-86.9(In Russian).

Tortonese, E.(1975). Fauna de Italia ''Osteichthyes''. In: Pesci Ossei, vol. 11. Calderini, Bologna.

Trewaves,E and Ingham,S.E.(1972).A key to species of Mugilidae in the northeastern Atlantic and Mediterranean, with explanatory notes. J Zool lond 167:15-29.

Turan,C., Caliskan,M., Kucuktas,H.(2005).Phylogenetic relationships of nine mullets species (Mugilidae) in the Mediterranean Sea.Hydrobiologia 532:45-51.

Was A and Wenne R., 2002. Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. Aquaculture 204:493-506.

Wasko, A.P., Martins, C. Oliveira, C., Foresti, F., 2003. Nondestructive genetic sampling in fi sh. An improved method for DNA extraction fromfish fins and scales. Hereditas 138:161-165.

Weber, L.P., Higgins, P.S., Carlson, L.I., Janz, D.M., 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fi shes. Journal of Fish Biology 63:637-658.

Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18, 7213–7218.

Weir B.S.& Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis ofpopulation structure. Evolution 38, 1358–1370.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531– 6535.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G.,Palumbi, S.R., Prager, E.M., et al., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics.Biol. J. Linn. Soc. 26, 375– 400.

Wright, S., 1978. Evolution the Genetics of population variability within and Natural population. University of Chicago press, vol 4.

Young, W.P., Ostberg, C.O., Keim, P., Thorgaard, G.H., 2001. Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (Oncorhynchus mykiss irideus) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). Mol. Ecol. 10, 921– 930.

Yue, G.H. and L. Orban: Rapid isolation of PCR-ready DNA from fresh and preserved fish scales, Marine Biotech. 3: 199-204 (2001).

Yue, G., Li, Y., Chen, F., Cho, S., Lim, L.C., Orban, L., 2002. Comparison of three DNA marker systems forassessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*). Electrophoresis 23, 1025– 1032.

Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. pulication 0 534 858 A1, bulletin 93/13. European patent office, Munich, Germany.

Zablotski, V. I., 1966: Changes in the parasite fauna mullet in connection with its acclimatization in the Caspian Sea. In:Acclimatization of animals in the USSR. A. I. Yanushevich(Ed.). Israeli Program for Scientific Translation, Jerusalem, IPST.Cat. No. 1218, pp. 238–239.

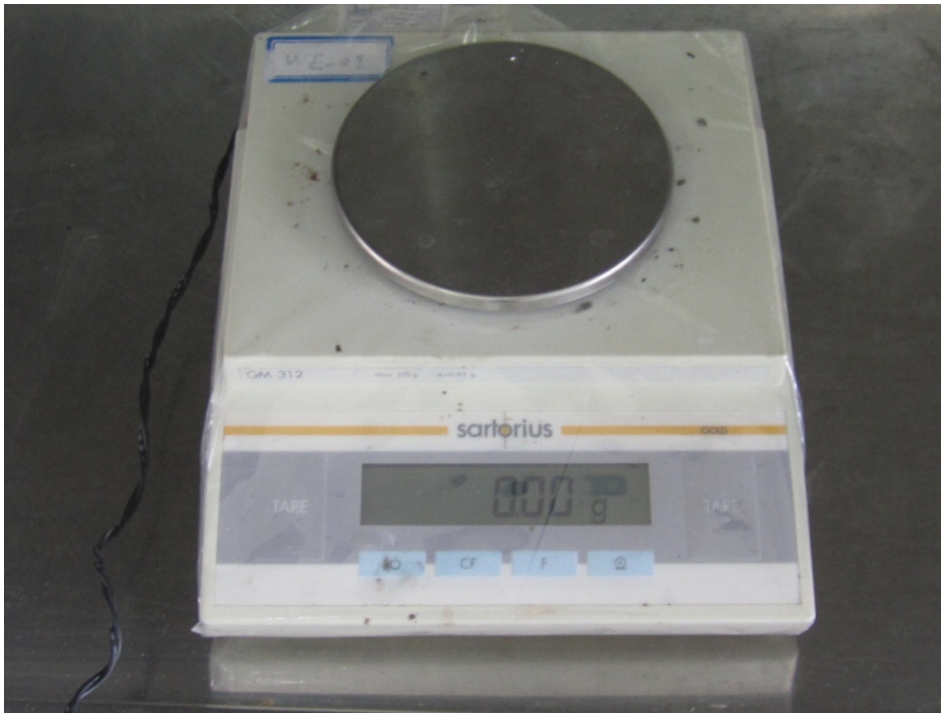
Zisman,L.(1981).Means of identification of grey mullet fry for culture.In : Aquaculture of grey mullets (O.H.Oren,Ed.)Cambridge university press,New York,pp.17-63.

جستجو در وب :

www.irani.at/html/.../Persian-daryache-mazandaran.php
www.icp.be/~opperd/private/parsimony
www.dimacs.rutgers.edu
www.icp.be/~opperd/private/neighbor
www. Fishbase.org
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
http://en.wikipedia.org/wiki/mullet_(fish)#classification and naming

پیوست

دستگاه های مورد استفاده در آزمایشگاه



ترازوی دیجیتال مدل Sartorius GM 312

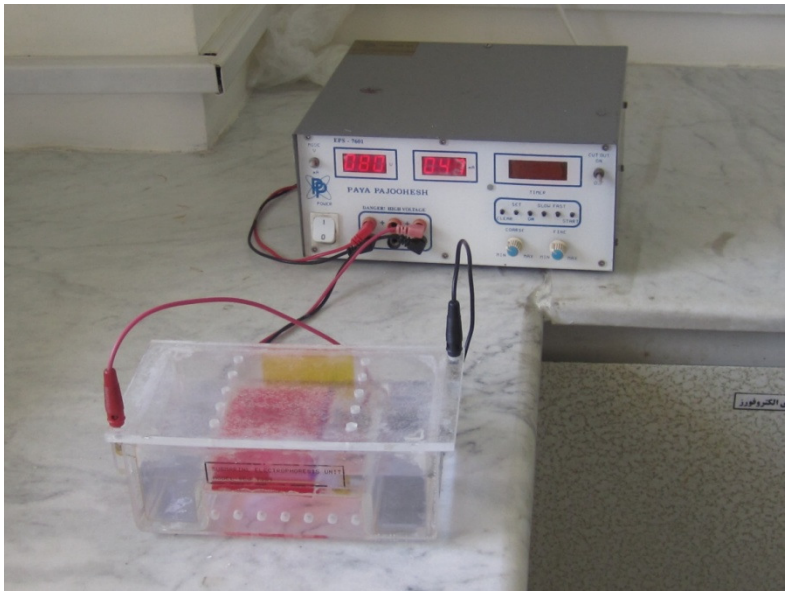
دستگاه Vortexمدل AKHTARIAN Rs 502

دستگاه بن ماری مدل AKHTARIAN

دستگاه سانتریوفیوژ مدل Hettich- MIKRO 22R

دستگاه شیکر مدل ROTATOR Instrument

دستگاه PCR مدل Auto Q QuantaBiotech



دستگاه الکتروفورز افقی مدل PAYA-Pajoohesh EPS-7601و تانک الکتروفورز مدل SEU 7304

دستگاه ژل داکیومنشن مدل UVi tec

-طرز تهیه محلول های لازم جهت استخراج DNA

- سدیم دودسیل سولفات(SDS) ۱۰ درصد

مقدار ۵۰گرم کریستال یا پودر SDS در ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۶۸ درجه سانتی گراد حل گردید وسپس با اضافه کردن HCl، pH را به ۷/۲ رسانده وحجم این محلول به ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محصول در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید.

- STE

برای تهیه یک لیتر STE، ۶ گرم تریس(۰/۰۵ مولار) و۳/۶ گرم EDTA(۰/۰۱ مولار) و ۵/۸ گرم Nacl ۱(۰/ مولار) را در ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل نموده و pH را به ۸ رسانده وحجم نهایی به یک لیتر افزایش داده میشود.

محلول های لازم جهت الکترفورز روی ژل آگارز

- بافر TBE

این بافر در غلظت های ۱X استفاده میشود بطوریکه هنگام استفاده از غلظت ۱۰ برابر ان رقرق سازی انجام میگیرد.

- لودینگ بافر

این بافر به دو منظور استفاده می شود: اول اینکه به دلیل داشتن گلیسرول ، چگالی نمونه را افزایش داده تا DNA سریع تر به ته چاهک برود. دوم به دلیل آنکه محلول بهینه آن دارای دو رنگ برومونفل بلو و زایلن سیانول است، میزان حرکت نمونه ها به سمت آند را قابل پیش بینی می کند. این بافر معمولا به صورت محلولی باغلظت ۶ برابر(6X) ساخته می شود ودارای Tris-HCl ۱۰ میلی مولار(pH=۷/۶)، ۰/۰۳٪برومونفل بلو، ۰/۰۳٪ زایلن سیانول، ۶۰٪ گلیسرول و ۶۰EDTA میلی مولار می باشد. EDTA موجود در محلول به یون های فلزی دو ظرفیتی (Divalent) متصل ونوکلئازهای وابسته به فلزات را مهار میکند.

- محلول اتیدیوم بروماید

مناسب ترین روش برای مشاهده DNA در ژل آگارز، رنگ آمیزی آن با رنگ فلوئورسانت اتیدیوم بروماید است. این رنگ حاوی گروه های سطحی (Planar) است که بین جفت بازهای DNA قرار گرفته وباعث میشود تا فلئورسانت تشدید شده ای را نسبت به رنگ آزاد در محلول، در زیر نور ماوراء بنفش نشان دهد.

مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR

- DNA الگو

DNA استخراج شده به عنوان الگو جهت واکنش PCR استفاده می گردد. به طور معمول ۲-۱ نانوگرم از DNA استخراج شده استفاده می شود.

- بافر PCR

بافر PCR یک بافر یونی دو قطبی است که pH آن با دما تغییر میکند. در واقع *Taq* DNA پلی مراز در مقادیر pH پائین تر صحت عمل بیشتری خواهد داشت که این pHدر دمای بالای PCR ایجاد می شود. KCl نیزمی تواند به اتصال پرایمر/ الگو کمک کند. اگرچه در غلظت های بالا این عمل ممکن است بیش ازحد مطلوب شده وباعث پایداری به الگو وایجاد محصولات ناخواسته گردد(Pherson *et al., 2000*).

-کلرید منیزیوم($MgCl_2$):

منیزیوم یکی از اساسی ترین اجزا PCR است، زیرا غلظت آن میتواند بردقت وبازده واکنش تاثیر بگذارد.فعالیت *Taq* DNA پلیمراز به وجود یون منیزیوم وابسته است و بیشترین فعالیت خود را در محدوده غلظت ۱/۳ - ۱/۲ میلی مول منیزیوم آزاد نشان می دهد. غلظت منیزیوم همچنین برصحت(میزان اشتباه) DNA پلیمرازها اثر می گذارد. در غلظت بالای منیزیوم نسبت به غلظت پائین آن، خطای *Taq* DNA پلیمراز افزایش می یابد وباعث افزایش غیراختصاصی می شود، درصورتی که در غلظت های بسیار پائین ، بازده واکنش کم خواهد شد.

- دی اکسی نوکلئوتیدتری فسفات ها(dNTP)

برای موفقیت PCR باید غلظت هر چهار dNTP (dGTP , dTTP , dATP , dCTP) برابر باشد، در غیر اینصورت دقت PCR کاهش خواهد یافت. در اکثر موارد، غلظت dNTP ها باید در حدود ۲۰۰-۵۰ باشد. اگرغلظت بالاتر رود، دقت واکنش کم می شود زیرا *Taq*پلیمراز در این حالت بازهای اشتباه را به میزان بیشتر از حد معمول وارد زنجیره می کند. در حالیکه اگر غلظت پائین تر باشد ممکن است بر بازده PCR تاثیر داشته باشد (Pherson *et al.,* 2000).

- آنزیم Taqپلی مراز

نوعی DNA پلی مراز وابسته به DNA مقاوم به حرارت است که اولین بار توسط(1969)freeze and Brock واز باکتری گرمادوست *Thermophilus aquaticus* به دست آمد. این آنزیم یک پلی پپتید ۹۴ کیلودالتونیاست که دارای فعالیت □۳ □DNA۵ پلی مرازی است وبرای فعالیت خود نیاز به یون منیزیوم دارد.سرعت ساخت DNAتوسط آن ۶۰-۵۰ نوکلئوتید در ثانیه است که این سرعت معادل سرعت 3Kb/min در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد. این آنزیم نیمه عمری حدود ۴۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد دارد که معادل ۵۰ چرخه

تحت شرایط عادی PCR می باشد. دمای بهینه فعالیت این آنزیم در حدود $^{\circ}C$ ۷۵-۷۲ می باشد. با استفاده از این آنزیم میتوان از دماهای بالا حتی $^{\circ}C$ ۷۰ در مرحله اتصال پرایمرها استفاده کرد، که این مزیت باعث دقت بیشتر در شناسایی توالی هدف توسط پرایمرها می گردد وتوالی هدف به طور اختصاصی تکثیر می شود(Pherson *et al., 2000*).

- پرایمر

آغازگرها برای پیش برد فرایند PCR به منظور افزایش تعداد نسخه های ناحیه خاصی از ژنوم طراحیمیشوند. طراحی مناسب آغازگر از یک سو درعملکرد موفق وبهینه فرایند PCR از سوی دیگر درپیشرفت مراحل بعدی بررسی های ژنتیک نظیر توالی یابی نقش به سزایی دارد(Surzycki, 2003).

Abstract:

Two of the three objectives of project was carried out success that one of them is following: The genetic diversity of Liza salien(Risso,1810) in the south part of Caspian sea using the Mitochondrial DNA sequencing (mtDNA) was carried out as first objective of project that based on the mitochondrial DNA sequencing (mtDNA) of 16S rRNA was used in order to clarify genetic structure and genetic diversity of *lizasaliens* in three western (Anzali) , middle(sari) , and eastern(Gomishan lagoon) of south part of Caspian sea. As a result we obtained 552base pairs of 16SrRNA sequence. A total of 6 different haplotypes and 29 variable sites were identified .The average nucleotide diversity(π) and haplotype diversity(h) in samples of all regions were 0.29 , and 0.004 respectively . The results obtained from genetic distance showed low rate in that of 3 regions. Estimates of gene flow indicated there is no reproductive isolation between three regions and also there was not significant genetic differentiation between differentregions ($p>0.05$). the findings from the present study suggest that there is equal population of Liza saliens in the studied regions .: Genetic differences and phylogenic relationships among six Mugilidae species (Mugilcephalus, M. capito, Liza subviridis, L. saliens, L. aurata, Valamugilbuchanani) were determined using PCR-sequencing as second objective of project. *M. cephalus*, *L. subviridis*, and *V. buchanani* from the Persian Gulf and Oman Sea, and *L. aurata* and *L. saliens* from the Caspian Sea were collected. Samples of an imported, Egyptian species *M. capito* (this species was mixed with the main imported species as *M. cephalus*fingerling) were obtained from the Gomishan Research Center in Gorgan. Total DNA from the samples were extracted according to phenol-chloroform method Mithochondrial DNA ,16s RNA was amplified using thermo cyclermachine with universal primers and thensequenced by sending to Takapoozist Company and thereafter to France. Analysis of the sequences showed great differences between *Mugil* species and the other studied species. The phylogenetic tree obtained through Neighbor-Joining method revealed that *L. saliens*and*L. aurata* were in the same branch while *L. subviridis* was in a separate branch. In contrast, Maximum Parsimony tree located *L. subviridis* and *L. aurata* in a single branch and assigned *L. saliens* to a distinct branch. This result brings in the question of monophyletic origin of the genus *Liza*.Also.

Keywords:Mugillidae,Phylogeny,Population,mtDNA,PCR,PersianGulf and Oman Sea,CaspianSea,Iran.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Inland Waters Aquatics Stocks Research Center

---

Project Title : Genetic variation study on the grey mullet (*Mugilcephalus*) stocks from Mediterranean Sea, the Pacific Ocean and Oman Sea
Apprpved Number: 4-77-12-89197
Author: Sohrab Rezvani Gilkolaei
Project Researcher : Sohrab Rezvani Gilkolaei
Collaborator(s) *:* Ghoroghi. A , Safari. R, GhadinejadShiyade. H, HamiTabari. A, Shafeei. A, AminiRad. T, ArfaniMoghadam. V, Darbani. R, HashemiRostami,Fahim.Azin,Llooei.F
Advisor(s): -
Supervisor: M.Pourkazemi
Location of execution : Golestan province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 1 Year & 6 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2013***

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 & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Project Title :

Genetic variation study on the grey mullet (*Mugilcephalus*) stocks from Mediterranean Sea, the Pacific Ocean and Oman Sea

Project Researcher :

Sohrab Rezvani Gilkolaei

Register NO.
42353