

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

عنوان :

بررسی امکان استفاده از مارکر مولکولی
برای تفکیک تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)
و تاسماهی روسی (*A. gueldeustadtti*)

مجری :

محمد پور کاظمی

شماره ثبت

۴۴۹۲۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان دریای خزر

عنوان پروژه : بررسی امکان استفاده از مارکر مولکولی برای تفکیک تاسماهی ایرانی
(*Acipenser persicus*) و تاسماهی روسی (*A. gueldeustadti*)
شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۰۴-۱۲-۸۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد پور کاظمی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد پور کاظمی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : لیلا عزیززاده، مهتاب یارمحمدی، محمد حسن زاده صابر
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : سهراب رضوانی گیل کلائی
محل اجرا : استان گیلان
تاریخ شروع : ۸۹/۴/۱
مدت اجرا : ۲ سال و ۹ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۴
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 امکان استفاده از مارکر مولکولی برای تفکیک تاسماهی

ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاسماهی روسی (*A. gualdeustadtti*)

کد مصوب: ۲-۸۶-۱۲-۸۹۰۰۴

شماره ثبت (فروست): ۴۴۹۲۱ تاریخ: ۹۳/۲/۲۷

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد پور کاظمی دارای مدرک

تحصیلی دکتری تخصصی در رشته ژنتیک مولکولی و بیوشیمیایی

می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۹۲/۹/۵ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد پژوهشکده مرکز ایستگاه

با سمت رئیس مرکز در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان دریای خزر

مشغول بوده است.

عنوان	فهرست مندرجات	صفحه
چکیده	۱
۱- کلیات	۳
۱-۱- مقدمه	۳
۲- مروری بر منابع و معرفی دو گونه مورد بررسی	۱۳
۲-۱- تاسماهی ایرانی (<i>Acipenser persicus</i> Borodin, 1897)	۱۳
۲-۲- تاسماهی روسی (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> Brandt, 1833)	۲۴
۳- مواد و روش کار	۳۹
۴- نتایج	۸۷
۴-۱- نتایج سیتوکروم ب	۸۷
۴-۲- نتایج مایکروستلایت	۹۱
۴-۳- نتایج روش AFLP	۱۱۱
۴-۴- نتایج روش ND5	۱۱۹
۴-۵- نتایج 16srDNA	۱۲۶
۴-۶- نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز محصولات آن	۱۳۴
۴-۷- نتایج مطالعات با استفاده از هورمون رشد	۱۶۵
۴-۸- نتایج الکتروفورز محصول PCR	۱۶۷
۴-۹- نتایج روش پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی	۱۸۲
۵- بحث و نتیجه گیری	۱۸۵
۵-۱- سیتوکروم b ، مایکروستلایت، AFLP، ND5، 16srDNA	۱۸۵
۵-۲- بحث RAPD	۱۸۹
۵-۳- بحث GH	۱۹۷
۵-۴- بحث SNP	۲۰۹
پیشنهادها	۲۱۲
پیوست	۲۱۳
منابع	۲۱۸
چکیده انگلیسی	۲۳۳

چکیده

تاسماهی ایرانی بعنوان گونه غالب در خزر جنوبی، بیشترین سهم تولید گوشت و خاویار ایران و درآمد ارزی کشور را بخود اختصاص میدهد ولی از لحاظ سیستماتیک و تمایز این گونه از تاسماهی روسی بحث بر انگیز بوده و تعدادی از محققین روسی بر این باورند که تاسماهی ایرانی یک گونه مستقل نبوده بلکه بعنوان زیر گونه تاسماهی روسی می باشد.

این تحقیق با هدف شناسایی و معرفی نشانگر مولکولی مبتنی بر DNA اختصاصی جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی و اثبات مولکولی تمایز آنها انجام گردید. برای این منظور از ۸ روش مولکولی شامل: میکروستلایت، AFLP، RAPD، توالی یابی ژن سیتوکروم b، تعیین توالی ژنهای 16sDNA و ND5، ژن رشد (Growth Hormone Gene) و در نهایت روش نوین SNP استفاده شد.

بر حسب روش کار بین ۵-۱۶ نمونه بافت باله دمی از هر یک از گونه های مورد بررسی از نقاط مختلف دریای خزر، رودخانه سفید رود، اورال، ولگا جمع آوری شد. پس از استخراج DNA و ارزیابی کمیت و کیفیت آن، با استفاده از پرایمر های متعدد (بر حسب نوع ژن و روش کار بین ۵ الی ۱۱۰ پرایمر) واکنش PCR انجام گردید. محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلامید الکتروفورز گردید و سپس با نیترا نقره رنگ آمیزی شد و یا بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی ایتیدیوم بروماید مشاهده شد. در روش RAPD باندهای متمایز DNA را بر روی ژل برش داده و پس از خالص سازی در وکتور کلون و در باکتری E.coli سویه Top 10 انتقال و سپس توالی یابی شد. بعلاوه ژنهای رشد تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی ابتدا با استفاده از نرم افزار های 4 MEGA و Gene Runner، پرایمر های مورد نظر طراحی گردید، پس از تکثیر با PCR در وکتور PTZ57R/T کلون و در باکتری E.coli سویه Top 10 انتقال و سپس توالی یابی شد. کل محصول PCR حاصله از تکثیر سایر ژنها هم برای تمامی نمونه ها توالی یابی شد و آنالیز آماری، فیلوژنی و درخت تکاملی آنها رسم گردید. در روش پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) پس از تشکیل بانک ژنومی، در مجموع ۱۴/۴ میلیارد عدد نوکلئوتید توالی یابی شد و با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیک اختصاصی، آنالیز شباهت و تمایز ژنتیکی دو گونه مورد بررسی انجام گرفت. نتایج بررسی نشان داد که روشهای میکروستلایت و AFLP تنوع ژنتیکی بین و درون گونه ای بسیار بالایی را آشکار ساختند. توالی ژن سیتوکروم b زمانیکه تعداد نمونه ۴ عدد برای هر یک از دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی مقایسه گردید تمایز را نشان میداد ولی با تکرار آزمایش بر روی ۱۵ نمونه برای هر گونه، این روش نتوانست دو گونه را از همدیگر تفکیک نماید. توالی کامل ژنهای 16sDNA و ND5 میتوکندریای نشان داد که دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در بعضی از جایگاهها نوکلئوتیدی تفاوتی با یکدیگر دارند ولی اختلاف معنی داری نبود. نتایج توالی حاصل از قطعات کلون شده بروش RAPD و همچنین طراحی پرایمر اختصاصی بر مبنای توالی های بدست آمد موفق به تمایز یک باندهای DNA گردید که میتواند دو گونه را متمایز نماید. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که ژن رشد دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی از ۶۴۵ نوکلئوتید

تشکیل یافته و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را ترجمه میکند. نتایج آنالیز توالی بیانگر آن است که ژن کد گذاری کننده هورمون رشد

در تاسماهی ایرانی و روسی بالاترین شباهت را ابتدا با ژن رشد پستانداران (۷۱٪) و سپس با مار ماهی شکلان (۶۳٪) و کمترین شباهت را با ماهیان استخوانی (۳۷٪) دارد. آنالیز فیلوژنی بیانگر آن است که تاسماهی ایرانی و روسی در مقایسه با سایر جانوران از گونه های بسیار قدیمی بوده و این ژن از یک ژن رشد اجدادی منشا گرفته است.

در این تحقیق بهترین نتایج از روش پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) بدست آمد که با تعیین توالی بیش از ۱۴/۴ میلیارد نوکلئوتید از ژنوم دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی شمال و جنوب خزر، اثبات نمود که تاسماهی ایرانی یک گونه مستقل از تاسماهی روسی است. این دستاورد ارزشمند بعنوان بزرگترین دستاورد علمی در تمایز دو گونه از تاسماهیان مهم تجاری دریای خزر در دو دهه اخیر محسوب میشود.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، تمایز گونه ای، مارکر مولکولی ، SNP، دریای خزر،

۱- کلیات

۱-۱- مقدمه

تاسماهیان با قدمت بیش از ۲۰۰ میلیون سال، جزء یکی از قدیمی ترین ماهیان بشمار میروند که نه تنها سهم مهمی در تنوع زیستی، اشتغال ساحل نشینان و درآمد های اقتصادی کشور ها، بلکه بعنوان فسیل زنده (living fossils) هنوز بر روی زمین یافت شده و در نیمکره شمالی کره زمین پراکنش دارند. بعبارت دیگر تاس ماهیان بدلیل تمایزات اکولوژیکی، تنوع زیستی، تکامل و قدمت بسیار طولانی آن ها و همچنین اهمیت اقتصادی آن از منظر تولید محصول شیلاتی گرانبها یا "خاویار" از دیر باز همیشه مورد توجه محققین بوده است.

از ۲۷ گونه تاس ماهی شکلان (Acipenseriformes) تعداد ۶ گونه ارزشمند آن در دریای خزر بعنوان بزرگترین زیستگاه طبیعی ماهیان خاویاری جهان و حوضه آبریز آن زیست میکنند (Ruban, 2011). بجز استرلیاد بقیه گونه های خاویاری شامل فیل ماهی، تاس ماهی ایرانی، تاس ماهی روسی، اوزون برون، شیپ، تقریباً در تمامی نواحی خزری پراکنش دارند (Artyukhin, 1997). دریای خزر با مساحتی معادل ۳۸۴ ۰۰۰ کیلومتر مربع، با بیش از ۱۰۰ رودخانه تغذیه میشود (Pikitch et al., 2005). ماهیان خاویاری به دلیل قدرت سازگاری اکولوژیک زیاد، توانایی همزیستی با ماهیان استخوانی و قابلیت استفاده از بیوتوپ های گوناگون و برخورداری از مزایایی همچون رشد سریع، نیاز اکسیژنی پایین و قابلیت پرورش در سیستم های پرورشی مختلف مورد توجه آبرزی پروران هم قرار گرفته است (Chebanov et al., 2001).

ذخایر تاس ماهیان خزر به دلیل صید غیر مجاز، از دست رفتن زیست گاه های تولید مثل و انواع آلودگی ها به خطر افتاده است (Pourkazemi, 2006). طی ۶۰ سال اخیر مدیریت صید تاس ماهیان در حوضه دریای خزر چندین بار مطابق با فراوانی ذخایر و ساختار جمعیتی تغییر یافت (Ruban, 2011). به اعتقاد لویانکو و همکاران دریای خزر و حوضه آبریز آن آخرین پناهگاه تاس ماهیان با ۱۰ جمعیت بزرگ از ۶ گونه محسوب میشود (Luk'yanenko et al., 1999).

اولین گام در اجرای هر برنامه مدیریت و حفاظت ذخایر، شناسایی دقیق گونه ها و جمعیت های وابسته به آن است، بنابراین به منظور اجرای مقررات ماهیگیری و مدیریت پایدار به یک روش دقیق برای شناسایی این گونه ها نیاز است (Birstein et al., 1998). امروزه بدلیل اهمیت بالای اقتصادی و وضعیت مخاطره انگیز ماهیان خاویاری توجه حفاظتی زیادی به آن ها می شود، بطوریکه همه گونه های تاسماهیان به ضمایم کنوانسیون سایتس الحاق شدند تا تجارت آنها در مرز های بین المللی کنترل گردد (Doukakis et al., 2005).

برای چندین قرن سیستماتیک انواع آبریان من جمله تاسماهیان با ثبت و اندازه گیری خصوصیات مورفولوژیک و مرستییک انجام می شد. ابداع و توسعه روشهای مولکولی به تقویت مطالعات سیستماتیک ماهیان کمک فراوانی کرد. روشهای جدید برای سیستماتیک ماهیان صفات مناسب جدیدی را برای آنالیز روابط مابین گونه ها پیشنهاد کرد. روشهای مولکولی، بسیاری از تقسیم بندی های مورفولوژیک را تایید می کند و در برخی موارد

طبقه بندی ناصحیح آن را نیز آشکار می کند. در کل بین روشهای مولکولی و مورفولوژیک هماهنگی بالایی وجود دارد. گرچه روشهای مورفولوژیک در شناسایی جنس عملکرد خوبی دارد ولی شناسایی در حد گونه و روابط مابین آنها با مشکل روبه روست.

از بین ۵ گونه از ماهی خاویاری دریای خزر، تاسماهی ایرانی بیشترین سهم تولید گوشت و خاویار را بخود اختصاص داده و بالطبع بیشترین درآمد ارزی کشور از صادرات خاویار این گونه می باشد. طی یک دهه حد فاصل سالهای ۲۰۰۰-۲۰۱۰ در بین ۵ کشور حاشیه دریای خزر سهمیه صادرات خاویار تاسماهی ایرانی فقط به جمهوری اسلامی ایران تعلق گرفت. کشورهای روسیه، آذربایجان و همچنین قزاقستان ادعای دارا بودن گونه تاسماهی ایرانی در محدوده آبهای خود هستند و هر سال در اجلاس های کمیسیون منابع زنده دریای خزر، سهمیه صید و صادرات خاویار تاسماهی ایرانی را می نمایند ولی تاکنون موفق به دریافت سهمیه صادرات خاویار این گونه نشده اند. گرچه روسیه و قزاقستان در سال ۲۰۰۷ سهمیه صید تحقیقاتی این گونه را برای بازسازی ذخایر به ترتیب میزان ۱۱ و ۱ تن را دارند ولی تا کنون منجر به تصویب سهمیه برای صید تجاری و صادرات خاویار نگردید.

از طرف دیگر از لحاظ سیستماتیک و تفکیک این گونه از تاسماهی روسی بحث و جدل علمی فراوانی بین محققین ارشد ماهیان خاویاری جهان وجود دارد. تعدادی از محققین روسی اعتقاد دارند که تاسماهی ایرانی گونه مستقل نبوده بلکه بعنوان زیر گونه و یا شکل و فرمی دیگر از تاسماهی روسی می باشد این طرح در نظر دارد با استفاده از تجارب کسب شده قبلی با استفاده روشهای مختلف که در ذیل به آن اشاره میشود مارکر تفکیک دو گونه را شناسایی نماید.

۲-۱- روش های بررسی تمایز و تفکیک گونه ها

روشهای مولکولی متعددی برای ارزیابی ساختار جمعیت، تعیین منشاء جغرافیایی و یا ردیابی محصولات شیلاتی وجود دارد (Ogden 2008). انتخاب نوع مارکر عمدتاً به سطح تاکسونومی گونه مد نظر بستگی دارد. در گذشته برای شناسایی گونه ها از روشهایی از قبیل صفات مورفومتریک، مریستیک، بیوشیمیایی (پروتئین های غیر آنزیمی و آنزیمی یا آلوزایم)، مولکولی مبتنی بر DNA (ژنوم یا میتوکندری) بویژه توالی یابی ژن سیتوکروم ب (cytochrome b) در میتوکندری، یا ژن سیتوکروم اکسیداز یک (COI) استفاده میشد و برای شناسایی جمعیت ها و ارتباط خویشاوندی والدین از روش میکروستلایت استفاده میگردد. امروزه روش " مارکر چند شکلی تک نوکلئوتیدی " یا (Single Nucleotide Polymorphism or SNP) بعنوان یک نشانگر مطلوب و مناسب برای آنالیز جمعیت ها مورد استفاده قرار میگیرد که حتی قادر است تفاوت ۲ عدد ماهی را در حد یک نوکلئوتید از همدیگر متمایز نماید. مزیت این روش، پراکنش آن در کل ژنوم، خنثی و آداپته پذیری آن، ژنوتایپینگ آسان و تبادل راحت بین آزمایشگاهها می باشد. که در ذیل به تشریح هر یک از روشها اشاره میگردد.

۳-۱- نشانگرهای ژنتیکی (Genetic Marker)

هر فنو تیپ یا صفت (قابل توارث) موجود زنده که با صفت معادل خود در موجود زنده دیگر تفاوت داشته باشد یک نشانگر محسوب می شود. نشانگرهای ژنتیکی جایگاههای خاص روی یک کروموزوم دارند که به عنوان نشانه‌های اختصاصی برای تجزیه و تحلیل‌های ژنومی به خدمت گرفته میشوند. در واقع تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم در افراد یک جامعه و یا نژاد که از افراد به نتاج آنها منتقل می گردد می تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شود. برای آنکه صفتی بعنوان نشانگر ژنتیکی استفاده شود بایستی حداقل واجد دو ویژگی الف) متفاوت بودن در بین دو فرد (بروز چند شکلی)، همچنین ب) قابلیت توارث داشته باشد. نشانگرهای ژنتیکی به عنوان ابزاری برای تهیه نقشه های پیوستگی مولکولی و ارزیابی جایگاههای ژنتیکی چند شکلی در صفات کمی کاربردهای بالقوه ای را در برنامه های اصلاح نژاد حیوان و گیاه پیدا کرده اند.

گرچه نشانگرها و روشهای متناظر تخمین تنوع ژنتیکی در جای خود بسیار مفید و سودمند است، اما اخیراً استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA، تفاوت‌های ژنتیکی را بیشتر مشهود ساخته که این تفاوتها تحت تاثیر محیط و اثراتی همچون پلوتربی و اپیستازی و دوره رشد حیوانی نبوده و امکان آگاهی دقیق و کافی از تنوع ژنتیکی در سطح DNA را فراهم می سازد (قره یاضی، ۱۳۷۵)

بطور کلی نشانگرهای مولکولی به دو دسته مبتنی بر پروتئین و روش مبتنی بر DNA تقسیم می شوند و عبارتند از: هر گونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNA که از والدین به نتاج قابل انتقال باشد. گرچه هدف از این تحقیق معرفی انواع روشها جهت تمایز گونه نیست ولی سعی گردید تا روش های مولکولی که جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی بکار رفته به اختصار بیان شود:

تفاوتهای موجود در سطح DNA که هیچ گونه تظاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینه رشته های پلی پلوئیدی تاثیر بر جا می گذارند در واقع نشانگرهای DNA چند شکلی موجودات را در سطح DNA تعیین می کنند این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می کنند و در نتیجه توالیهای کد کننده و غیر کد کننده را در بر می گیرد. بررسی اینگونه تفاوتها که فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم DNA امکان پذیر است و به آنها نشانگرهای مولکولی در سطح DNA گویند. (جوآنروح علی آباد، ۱۳۸۱)

فراوانی بالا، هم بازر بودن اکثر این نشانگرها، امکان به کار گیری 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 بالای این نشانگرها نمایان ساختن تفاوت بین ترتیبهای غیر کننده علاوه بر اختلاف موجود در ترتیبهای کد کننده از مزایای این نشانگرها میباشد. این نشانگرها به دو دسته مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می شوند. انواع مختلفی از این نشانگرها، با تفاوت های بسیاری از لحاظ تکنیکی، روش تولید، نحوه کاربرد و امتیاز بندی و تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع گردیدند و تحولی عظیم در اطلاعات تنوع ژنتیکی ایجاد

کرده اند (قره یاضی ۱۳۷۵) و به عنوان ابزارهای ضروری در ایجاد اهدافی چون نگهداری بیولوژیک مطالعات تکاملی و نیز پروژه های نقشه برداری ژنی در آمده اند (دانشور آملی، ۱۳۸۳). از ۳۰ سال گذشته توجه به نشانگرهای DNA افزایش پیدا کرده، در ابتدا DNA میتوکندریایی و سپس تکنیکهای مولکولهای پیشرفته کرده به سمت DNA هسته ای سوق پیدا کرده است (Ferguson, 1995).

۴-۱- مواد ژنتیکی خارج کروموزومی (mt-DNA)

در اکثر جانوران اندازه مولکول mtDNA بین ۱۸۰۰۰-۱۵۰۰۰ جفت باز می باشد، در گونه های جانوری ژنوم میتوکندری دارای ۳۷ ژن میباشد که عبارتند از ۱۳ ژن رمز دهنده پروتیین ۲۲ ژن rRNA دو ژن رمز دهنده rRNA و یک ناحیه غیر کد گذار بعنوان ناحیه آغاز همانندسازی یا D-loop می باشد (Anderson et al., 1981). کوچکترین ژنوم میتوکندری متعلق به یک گونه نماتد با ۱۴۵۰۰ جفت باز (Brown, 1985) و بزرگترین آن یک گونه صدف با ۴۱۰۰۰ جفت باز (Synder et al., 1987) می باشد. در مطالعات مختلف دو منشا پدری و مادری برای mtDNA ثابت شده است. هر چند که ژنوم میتوکندری جانوری اغلب منشا مادری دارد، ولی منشا پدری ژنوم میتوکندری در دروزفیل و موش گزارش شده است. با توجه به اینکه در اکثر موجودات میتوکندری منشا مادری دارد و نو ترکیبی در آن انجام نمیگیرد لذا این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و نشانگر خوبی برای تشخیص گروههایی بوده اند. سرعت جایگزینی نوکلوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته ای است که ۲ درصد تغییر به ازای هر میلیون سال میباشد. سرعت تغییرات نوکلوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است. ژنهای tRNA, rRNA نسبت به سایر قسمتها محفوظ تر و ناحیه D-loop منطقه ای است که بیشترین تغییر را دارا میباشد. این ناحیه تنوع کافی با قابلیت تمایز زیاد را در سطح جمعیت نشان میدهد. Brown et al., 1992. اندازه مولکول mtDNA در تاسماهی سفید (*A. transmontanus*) را بین ۱۶/۷۵-۱۶/۳۴ هزار جفت باز بسته به تعداد توالی های ۸۲ جفت باز تکراری تخمین زده است.

در تاسماهی دریایچه ای (*A. fulvescens*) مولکول mtDNA هضم نشده با آنزیم های قطع کننده حدود ۱۷۵۰۰ جفت باز برآورد شده در حالیکه Guenette et al., 1993 جمع کل مولکول میتوکندری برش داده شده را $1/3 \pm$ ۱۶۰۰۰ جفت باز برآورد نموده است. از طرفی Ferguson et al., 1993 متوسط اندازه مولکول میتوکندری DNA تاسماهی دریایچه ای را ۱۶۶۰۰ جفت باز تخمین زده است.

۵-۱- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

در سال ۱۹۸۰، روش جدیدی در متیک مولکولی بنام "تفاوت طول قطعات حاصل از هضم" یا RFLP برای مطالعه مستقیم DNA به عنوان نشانگرهای ژنتیکی جدید توسط Bostein و همکاران معرفی گردید. اساس روش

مولکولی RFLP وجود یا عدم وجود نقاط قابل تشخیص انزیمهای محدود کننده به علت وقوع جهشهای نقطه ای، حذف، اضافه یا معکوس شدن قطعه ای از کروموزوم و یا سایر تغییرات ژنی - کروموزومی میباشد. کلیه این تغییرات باعث ایجاد چند شکلی شدن یا پلی مورفیسم میگردد. به طور کلی RFLP به دو شکل صورت می گیرد :

- هضم آنزیم و سپس الکتروفورز و استفاده از لکه گذاری سادرن

- PCR قطعه مورد نظر و هضم آنزیمی آن

فراوانی بالا، توارث همباز، عدم اثرات پلوتروپی، عدم تاثیر شرایط محیطی، قابلیت شناسایی در تمام بافتهای زنده و در تمام مراحل رشد از مزایای این نشانگر میباشد. در طبقه بندی و تعیین ژنتیکی گونه های جانوری و گیاهی و تعیین تنوع ژنوتیپی جمعیتها و تهیه نقشه های لینکاژ ژنومی مورد استفاده قرار می گیرد. (دانشور آملی، ۱۳۸۳)

۶-۱- نشانگرهای ژنتیکی درون هسته ای یا کروموزومی

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

این تکنیک انگشت نگاری قابل تشخیص ژنوم بدون استفاده از سیستم های رادیو اکتیو و توالی یابی DNA برای ژنوم را ارائه میدهد. سابقه ابداع آن به دو گروه مستقل، Williams et al. 1990 و گروه Welsh & McClelland 1990 بر میگردد که این روش را بعنوان روشی جدیدی برای ارزیابی پلی مورفیسم بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز در انستیتوی تحقیقاتی بیولوژیک کالیفرنیا ارائه کردند. هر چند اساس این دو تکنیک یکسان بوده است ولی Welsh و همکاران (۱۹۹۰) آنرا AP-PCR (Arbitrary Primed DNA) و Williams و همکاران (۱۹۹۰) آنرا RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) نامیدند. روش AP-PCR مشابه با RAPD بود و در هر دو از یک پرایمر استفاده می شود ولی غلظت پرایمر مورد استفاده در آن حدود ۱۰ برابر بیشتر است. پلی مورفیسم مشاهده شده به دلیل تفاوت توالی در یک یا هر دو جایگاه اتصال پرایمر است که در صورت حضور یا فقدان یک باند متجلی می شود. پرایمرهای RAPD مختص به ژنوتیپ، گونه و جنس خاص نیست و قابل استفاده در تمام موجودات می باشد. امکان بررسی همزمان بیش از یک مکان ژنی در این تکنیک وجود دارد. این روش گرچه آسان و کم هزینه است ولی معایب فراوانی دارد که از جمله آن می توان به عدم تکرار پذیری نشانگرهای RAPD، حساسیت فوق العاده به آلودگی، عدم تشخیص سیستم آللی (به دلیل غالب و مغلوبی بودن RAPD تشخیص هموزیگوتی و هتروزایگوتی غیر ممکن است)، امتیازدهی باندها و نامعلوم بودن قرابت و شباهت باندهائی که بر روی ژل الکترو فورزی دارای مهاجرت یکسان هستند، اشاره نمود. (Phillips and Vasil, 2001)

(Amplified Fragment length Polymorphism) : AFLP

این روش ترکیبی از AFLP و واکنش زنجیره ای پلیمرز است بطوریکه در مرحله اول DNA مورد نظر با دو آنزیم برش دهنده هضم می شود به نحوی که دو انتهای برش یافته دارای فرم برشی متفاوت باشند. سپس دو آداپتور (DNA دو رشته ای به طول حدود ۱۸ جفت باز که یکی از آنها از انتهای آن مکمل دو انتهای برش یافته باشد) به دو انتهای برش یافته اتصال می یابد. در مرحله بعد با استفاده از روش PCR و به کمک پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی آداپتورها (حدود ۲۰ جفت باز) قطعات مورد نظر تکثیر می شوند. این مارکر ژنتیکی بر اساس آنالیز قطعات برش یافته DNA بنیان نهاده شده و در آن از تکنیک DNA برای تکثیر قطعات مورد نظر و شناسایی آن استفاده می شود. به علت استفاده از واکنش PCR، این تکنیک متفاوت از روش RFLP می باشد، دارای تکرار پذیری بالای هستند و در یک واکنش مناسب بین ۵۰ تا ۱۰۰ باز قابل تشخیص است. بر این اساس مقدار زیادی باند پلی مورفیک جهت بررسی تنوع ژنتیکی یا تهیه نقشه ژنتیکی امکان پذیر است. این روش توسط Zebeau و همکاران در سال ۱۹۹۳ ابداع گردید. مارکر AFLP غالب است و شناسایی وضعیت هتروزیگوتی از هموزیگوتی مسیر نیست (Phillips and Vasil, 2001).

مایکروستلایت‌ها:

از زمانیکه مشخص گردید که در سانتریفوژ سزیم کلراید، بخش کوچکی از DNA کل، باند ماهواره‌ای تشکیل داده و از باند ژنومی اصلی جدا قرار می‌گیرد، "DNA ماهواره‌ای" شناسایی گردید. این بخش کوچک دارای توالیهای ساده کمتر از ۵۰۰ جفت باز میباشد که هزاران و یا حتی میلیونها بار تکرار می‌شوند. مایکروستلایت (microsatellite) یا ریز ماهواره‌ها عبارتست از توالی کوتاهی از DNA، بطول کمتر از ۶ عدد نوکلئوتید که بصورت توالی‌های پشت سر هم بدون هیچگونه قطع یا انفصال در ژنوم اکثر موجودات مشاهده می‌گردد (Hancock 2000). در گذشته واژه مایکروستلایت به توالی ۲ تایی نوکلئوتید (عمدتاً دو عدد باز GT) بیان می‌شد و بعضاً به نامهای دیگری از قبیل "توالی تکراری، توالی ساده، توالی تکراری کوتاه" اطلاق میشد (Hancock 2000) که این امر خود سبب اشتباه در منابع مختلف می‌گردید. در حال حاضر واژه "مایکروستلایت یا مایکروستلایت" عبارت رایج و عمومی برای تمام منابع است که بطور یکسان بکار می‌رود. با توجه به مطالعات وسیع انجام شده مشخص گردید که مایکروستلایت در اکثر موجودات وجود دارد و در همه آنها تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از خود نشان داده است.

انواع دیگری از DNA تکراری یا واحدهای تکراری بسیار کوتاهتر بعداً در طی توالی‌یابی ژن انسولین انسانی و مستقل از سانتریفوژ سزیم کلراید کشف گردید. اینها شامل ماهوارک‌ها (minisatellites) با واحدهای تکراری ۶-۱۰ جفت باز و ریز ماهواره‌ها (microsatellites) با واحد تکراری ۲-۶ جفت بازی هستند. باید توجه داشت که طول کل ریز ماهواره‌ها عمدتاً کوتاه بوده (۲۰۰-۱۰ جفت باز) در حالیکه بیشتر ماهوارک‌ها از چند صد تا چند

هزار جفت باز متغیر هستند. وجود جایگاههای ریزماهورهای در ژنومهای یوکاریوتی از سالهای ۱۹۷۰ شناخته شده بود، اگر چه اطلاعات اندکی در مورد وجود پراکنش فراوان این توالیها موجود بود تا اینکه در سال ۱۹۸۲، Hamda و همکاران کپیهای متعدد Poly (dT-dG)n را از بسیاری از موجودات کشف کردند. این یافتهها را Tautz و Renz در سال ۱۹۸۴ با تکنیک هیبریداسیون در موجودات مختلف مورد ارزیابی قرار دادند و دریافتند که چندین نوع از این توالیها وجود دارد.

در سال ۱۹۸۹ معلوم شد که امکان استفاده از PCR در آنالیز ریزماهورها وجود دارد. در این بررسیها پرایمرها براساس توالیهای تثبیت شده مجاور توالیهای تکرار شوند طراحی شدند و محصولات PCR بر روی ژلهای پلی آکریل آمید از همدیگر جدا شدند. این روش امکان جداکردن آللهها با اختلاف یک جفت باز را فراهم نمود.

عناوین دیگری که برای ریزماهورها بکار می‌برند عبارتست از Short Tandem Repeats (STR) و یا Simple Sequence Repeats (SSR) که این ریزماهورها از واحدهای ۲-۶ جفت بازی تشکیل شده و پشت سر هم تکراری می‌شود مانند (TG)_n یا (AAT)_n.

مزایای ریزماهورها نسبت به سایر نشانگرها

اغلب چند شکلی بالایی دارند، Single-Locus بوده و دارای وراثت هم بارز (Codominant) هستند. در ژنوم فراوانی یافت می‌شوند. ریزماهورها پراکندگی وسیعی در ژنوم یوکاریوتها دارند. همچنین، مقدار اندک DNA مورد نیاز در بکارگیری این نشانگرها و در نتیجه نمونه‌گیری از موجودات بدون از بین بردن آنها از مزایای دیگر آنهاست. مزیت دیگر ریزماهورها این است که پرایمرهای ایجاد شده برای یک گونه را می‌توان در گونه‌های نزدیک آن بکار برد و این باعث صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌گردد.

ظاهراً ریزماهورها هیچ محصولی را کد نمی‌کنند و در نتیجه از نظر انتخاب طبیعی خنثی هستند. ولی باید متذکر شد اگر چه ریزماهورها نقش عملی ندارند ولی این لزوماً به این معنا نیست که از نظر تکاملی خنثی هستند چرا که این نشانگرها با ژنها، پیوستگی ژنتیکی نشان می‌دهند. حتی گزارشهایی دال بر امکان وجود نقش عملی برای VNTRs وجود دارد.

براساس مدلی به نام Stepwise mutation model بدلیل اینکه تفاوت طول در این نشانگرها معمولاً بواسطه تغییرات گام به گام در تعداد واحدهای تکراری است از روی تعداد تکرارها اطلاعات تکاملی نیز قابل دریافت می‌باشد. اگرچه کاربرد ریزماهورها در فیلوژنی ممکن است به گونه‌هایی با تغییرات سریع یا گونه‌های نزدیک محدود شود. بالاخره مزایای عمده تکنیکی ریزماهورها بر سایر نشانگرها شامل نمره‌دهی آسان و دقیق و قابلیت خودکار شده آنها می‌باشد.

از معایب ریزماهورها می‌توان به صرف وقت و هزینه زیاد در مرحله شناسایی و جداسازی پرایمرهای اختصاصی گونه‌ای، دانش اندک در مورد نحوه جهشی آنها و لزوم ایجاد روشهای جدید برای آنالیز داده‌ها اشاره کرد. همچنین بعلت پلی‌مورفیسم زیادتر از حد ریزماهورها، کاربرد آنها فقط در رده‌بندی‌های درون گونه‌ای پیشنهاد می‌گردد.

مدیریت صحیح ذخایر شیلاتی باید بر مبنای ارزیابی ساختار ژنتیکی ذخایر و یا منابع بیولوژیکی باشد. اگرچه تعیین حدود مرزهای فرضی این ذخایر در محیطهای آبی و دریایی یک مسئولیت پیچیده و سختی است. ولی در بسیاری از نقاط جهان از این تکنولوژی بهره بردند و در حفظ و بهره‌برداری پایدار از ذخایر به بهترین نحوه استفاده کردند. بطوریکه از مارکرهای ژنتیکی برای توصیف ساختار ذخایر بسیاری از گونه‌های ماهیان خصوصاً سالمونیدها استفاده شده است. سطوح خیلی بالای تنوع به میکروستلایتها مربوط می‌باشد. سرعت عمل و پتانسیل جدا نمودن تعداد زیادی لوسای که قادر به کشف اختلافات در میان جمعتهای خیلی نزدیک به هم می‌باشد، توسط این مارکر فراهم می‌گردد. بنابراین یکی از کاربردهای مهم میکروستلایت جداسازی جمعیتها و ذخایر مختلف متعلق به یک گونه است. از دیگر کاربردهای میکروستلایت تعیین رابطه خویشاوندی علی‌الخصوص رابطه بین والدین و فرزندان است که براحتی می‌توان از این مارکرها استفاده نمود.

براساس مطالعات (May, et al., 1997) motif 11 از میکروستلایت ۳ و ۴ تایی در تاسماهی دریاچه‌ای شناسایی شد و سپس بر روی ۸ گونه دیگر از تاسماهی شکلان *Acipenseriformes* آزمایش گردید. در طی این بررسی ۸ لوسای بطور یکنواخت در ۸ گونه مشاهده گردید و ۳ لوسای فقط در سه گونه دیده شد. از ۸ لوسای بررسی شده در ۸ گونه یک لوسای بصور مونومورف و بقیه لوسای در هر ۸ گونه بصورت پلی مورفیک بودند. بررسی فوق مارکرهای ابداع شده را روشی مناسب برای شناخت جمعیتها و ذخایر تاسماهیان آمریکای شمالی اعلام نموده است.

تاکنون مطالعات معدودی بر روی ژنتیک جمعیت ۵ گونه از تاسماهیان دریای خزر با استفاده از روش میکروستلایت گزارش شده از جمله پورکاظمی ۱۳۸۶، پورکاظمی ۱۳۸۷ خوش خلق ۱۳۸۵، نوروزی ۱۳۸۶، صفری ۱۳۸۵، باقری ۱۳۸۸، مقیم و همکاران ۲۰۱۳.

در سالهای اخیر، مطالعات متعددی توسط محققین آمریکا، آلمان، ایتالیا، روسیه، ایران از طریق ژنتیک مولکولی و با استفاده از روشهای متنبری بر DNA و mtDNA انجام شد گرچه روشهای فوق قادر بود ۲۵ گونه دیگر از ماهیان خاویاری را جداسازی نماید ولی تاکنون هیچیک موفق به تفکیک این گونه و یا یافتن مارکر مولکولی برای تمایز آن نشدند. تنها روشی که تاکنون توانسته مارکر مولکولی تفکیک دو گونه فوق را معرفی نماید روش RAPD بود که توسط قرائی و همکاران (۱۳۸۴) مطالعه شد ولی ضعف روش فوق عدم تکرار پذیری آن بوده و پروژه بخاطر عدم تعیین توالی مارکرهای شناسایی شده نیمه تمام باقیمانده و مورد پذیرش جوامع بین المللی قرار نگرفت.

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

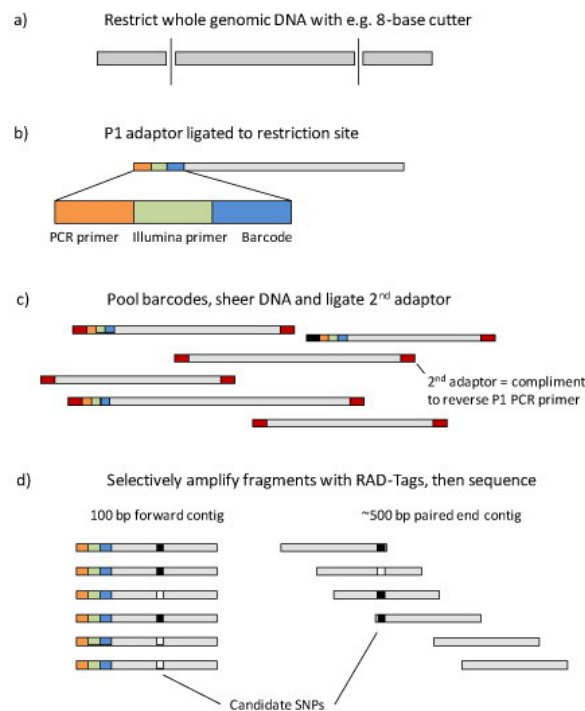
در سالهای اخیر مارکر یا نشانگر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) بعنوان نشانگری مطلوب برای آنالیز ژنتیک جمعیت معرفی گردید. علت این محبوبیت بخاطر این است که این مارکر در کل ژنوم موجودات توزیع شده و با تنوع نوع خنثی یا آدپتیو مشارکت داشته و همچنین تعیین ژنوتیپ آن آسان و روش کار آن در بین آزمایشگاههای مختلف قابل انتقال است. مزایای فوق سبب گردید که روش SNP از مطلوبیت و کاربرد ویژه‌ای در علوم شیلاتی داشته باشد (Ogden 2010).

روشهای شناسایی نشانگر SNP عمدتاً تحت تأثیر دسترسی انواع روشهای توالی‌یابی برای گونه‌های غیر مدل می‌باشد. در حال حاضر این امکان وجود دارد که تعداد بیشماری از مارکر SNA را در داخل ژنوم موجودات شناسایی نمود که در نتیجه با شناسایی هزاران SNP می‌توان برای هدف مد نظر و یا پاسخ به سؤال خاص از آنها بهره جست. هدف مشترک تمامی روشهای مرتبط با معرفی نشانگر مولکولی این است که بخش قابل توجهی از ژنوم را به نحوی کاهش دهد تا بتوان نسخه‌های متعدد مشابه از DNA با همدیگر مقایسه گردد و مارکر SNP شناسایی گردد. یکی از این روشها، روش RAD (Restriction Site Associated) یا توالی DNA محل‌های قطع مشترک می‌باشد که برای شناسایی SNP بسیار مورد پذیرش محققین قرار گرفته و در این تحقیق هم از روش RAD استفاده گردید.

روش RAD بدین صورت است که ابتدا ژنوم کل (DNA) با آنزیم‌های قطع کننده محدود (۸ بازی)، مناطق و توالی‌های حفاظت شده DNA را شناسایی و قطع می‌کند. سپس قطعات DNA تولید شده توالی‌یابی می‌گردد. در این مرحله از DNA بارکدهای اختصاصی استفاده می‌شود و به قطعات انفرادی و یا مجموعه‌ای از قطعات علامت‌دار شده تا بتوان در بین توالی‌ها مورد شناسایی قرار گیرند (شکل ۱).

بدین طریق در نهایت مارکرهای SNP انتخاب خواهند شد که در بین افراد، جمعیت‌ها و یا گونه‌های مختلف تنوع و پلی مورفیسم نشان دهند. می‌توان به نحوی برنامه‌ریزی نمود که برنامه توالی‌یابی RAD بخش معین از توالی را برای هر نشانگر مورد هدف قرار دهد تا اطمینان و اعتبار کافی به نشانگر SNP بدست آید. اما وجود خطا در توالی‌ها و معایبی که بعضی از روشهای توالی‌یابی دارند ممکن است پیدا کردن SNP واقعی را با مشکل مواجه سازد.

این مشکل تا حدی با انتخاب فیلترهای خاص شناسایی SNP در هنگام آنالیز بیوانفورماتیک با استفاده از داده های RAD مد نظر قرار خواهد گرفت. برنامه نرم‌افزاری اختصاصی برای آنالیز داده‌های RAD طراحی گردید تا این مشکل را برطرف نماید اما تاکنون تحقیقات اندکی برای تنظیم نشانگر SNP در گونه‌های چندپلوئیدی مثل تاسماهیان انجام شده است.



شکل ۱- مراحل شناسایی RAD-Tag SNP.

الف- قطع با آنزیم های قطع کننده ۸ بازی. ب- آداپتور P1 به محل قطع آنزیمی الحاق میگردد. ج- DNA یک نمونه یا DNA چند نمونه ادغام شده با آداپتور های مختلف در واکنش های مجزایی متصل میشود. قطعات با آداپتور های متفاوت در یکجا ادغام شده، بصورت انتخاب توسط PCR تکثیر میشوند. د- توالی یابی محصول PCR جهت یافتن SNP.

بنابراین، استفاده از روش توالی یابی RAD جهت شناسایی SNP در ماهیان خاویاری که تترا یا اکتاپلوئیدی هستند و همچنین شناسایی و توسعه نشانگرهای مولکولی متعدد برای کاربرد در بخش های مختلف را با مشکلات متعددی مواجه ساخته است.

هدف از انجام این تحقیق که برای مدیریت و حفاظت ماهیان خاویاری می باشد، کشف و شناسایی مارکر SNP در گونه تاسماهی روسی، تاسماهی ایرانی، تاسماهی سیبری و تاسماهی آدریاتیک (*A. nacaarii*) می باشد. بعبارت دیگر دنبال شناسایی و معرفی مارکر SNP که تنوع درون و بین گونه ای در حد یک نوکلئوتید را در افراد و جمعیت های مختلف شناسایی نماید به نحوی که این مارکر مبتنی بر DNA قادر باشد تا خاویار در تجارت را برحسب گونه مورد شناسایی قرار دهد. از اهداف اختصاصی این تحقیق، شناسایی نشانگر SNP برای تفکیک تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی در دریای خزر می باشد.

۲- مروری بر منابع و معرفی دو گونه مورد بررسی

۲-۱- تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

رده بندی و جایگاه تاکسونومی تاسماهی ایرانی (قره برون)

Super Class	Pisces
Class:	Osteichthyes
Sub Class:	Actinopterygii
Infraclass:	Chondrostei
Order:	Acipenseriformes
Family:	Acipenseridae
Genus:	Acipenser
Species:	<i>Acipenser persicus</i> Borodin



تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

تاسماهی ایرانی نخستین بار توسط Borodin (1897) به عنوان گونه ای ارزشمند از رودخانه اورال معرفی شد. اگرچه Berg (1933) آن را بعنوان زیرگونه ای از تاسماهی روسی با نام *A. guldenstadtii persicus* اعلام نمود و اعتقاد داشت این گونه جدید همان تاسماهی روسی است که تنها در رنگ بدن با یکدیگر تفاوت دارند اما پس از مطالعات زیاد در سال ۱۹۳۴ اعلام کرد که این گونه، یک زیرگونه مستقل از تاسماهی روسی می باشد و این طبقه بندی تا سالها مورد تأیید بود. در سال ۱۹۷۷، مطالعات ایمونوالکتروفورز نشان داد که ترکیب آنتی ژن سرم تاسماهی روسی با تاسماهی ایرانی بطور کامل در تعداد و نوع با یکدیگر تفاوت دارند. تفاوت های مورفولوژیک، اکولوژیک و ایمونولوژیک بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی و همچنین عدم وجود جمعیت های بینینی بین تاسماهیان ولگا، سفیدرود و جدایی تولیدمثلی حتی در زمان تخمیزی در داخل یک رودخانه نظریه Borodin را مبنی بر مجزا بودن این دو تاسماهی از یکدیگر ثابت می کند (Artyukin, 1979, 1983; Luk`yaneko et al., 1974).

با بررسی های انجام شده (پرواریوخا، ۱۳۷۴) مشخص گردید که تاسماهی ایرانی نیز دارای دو نژاد بهاره و پائیزه می باشد. بطوریکه در سرم خون نژاد بهاره، ۲ آنتی ژن مشاهده می شود که با نژاد پائیزه متفاوت است. شباهت های ظاهری این نژادها، به قدری زیاد است که حتی صیادان با سابقه نیز در تشخیص آنها دچار اشتباه می شوند. وجود این دو نژاد نخستین بار توسط رستمی از مولدین مهاجر به سفیدرود گزارش گردید (Rostami, 1961). ذخایر اصلی

تاسماهی ایرانی از جنوب دریای خزر تا قسمت‌های شمالی آن کاهش می‌یابد (آرتوخین، ۱۹۸۳) بطوریکه قسمت اعظم ذخایر آن در بخش جنوبی و مقدار کمتری در بخش میانی خزر دیده می‌شود. علاوه بر مطالعات قبلی Artyukhin, Zarkua در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که این ماهی مشخصات جایگاه یک گونه مستقل را دارد. بهر حال مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی تاسماهیان اواخر بهار از رودخانه های ولگا و اورال با نمونه های مشابه از جمعیت کورا نشان داد که شباهت زیادی در بین آنها وجود داشت. بعلاوه تفاوت های زیادی در بین گروه اواخر بهار و فرم زمستانه تاسماهی روسی مشاهده شده است Mageramov, 1972; Artyukhin and Zarkua, 1983) به نقل از (Holcik 1989).

تحقیقات مورفولوژیکی جزئی تر در خصوص تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی از رودخانه ولگا توسط Putilina (1983) انجام شد. تفاوت ها در ۵ خصوصیت مرفومتريک و ۳۵ خصوصیت مریستیک همانند ردیفی از شاخص های زیستی تعیین شد.

مورفولوژی تاسماهی ایرانی

تاسماهی ایرانی دارای بدنی کشیده و باریک و پوزه ای تیز است. ارتفاع بدن به طور متوسط ۱۶/۸ درصد طول کل بدن است و حداکثر ارتفاع بین اولین و سومین صفحات استخوانی پشتی در عقب پر می باشد. ارتفاع سر ۱۷/۲ درصد طول کلی بدن می باشد. طول سر این گونه در نمونه هایی بررسی شده رودخانه کورا ۱۱/۱ تا ۲۶/۸ درصد و طول پوزه ۸ تا ۱۵ درصد طول کل بدن است. باله های سینه ای آن نسبتاً کوچک بوده و هریک دارای یک شعاع استخوانی ضعیف هستند و اغلب خمیده یا دارای پیچ خوردگی مارپیچی می باشند. تاسماهی ایرانی کفزی بوده، دهان آن همراه با فرورفتگی در وسط لب بالا و لب پائین جدا شده و به شکل یک شکاف عرضی است. دارای ۲ جفت سیلک می باشد که موقعیت آنها به نوک پوزه ماهی نسبت به دهان نزدیکترند. در نمونه ای رودخانه کورا، پهنای دهان ۲۴ تا ۳۶ درصد طول سر بوده است. تنوع رنگ در سرتاسر دامنه جغرافیایی این گونه مشاهده می شود، اما عموماً پشت بدن ماهی خاکستری سفید یا آبی متمایل به خاکستری با یک درخشش آبی فولادی در پهلوهاست. بخش شکمی بدن به رنگ سفید گاهی اندک متمایل به زرد می باشد. رنگ صفحات استخوانی پشتی و جانبی، روشن تر از بقیه بدن بوده و معمولاً در ماهیان بالغ به رنگ مات و در ماهیان جوان طلایی می باشد. نمونه های این گونه در دریای سیاه دارای رنگ تیره تری می باشند (عقیلی نژاد، ۱۳۷۱).

تعداد شعاعهای غیرمنشعب باله پشتی ۲۷ تا ۵۱ عدد، تعداد شعاعهای غیرمنشعب باله مخرجی ۱۶ تا ۳۵ عدد، تعداد صفحات استخوانی پشتی ۷ تا ۱۹ عدد، تعداد صفحات استخوانی پهلوئی (جانبی) ۲۳ تا ۵۰ عدد، تعداد صفحات استخوانی شکمی ۷ تا ۱۳ عدد تعداد خارهای کمان آبششی ۱۵ تا (۳۶) ۳۱ عدد می باشد. معمولاً یک ردیف جانبی - پشتی و جانبی شکمی از Scuttle در بین ردیفهای صفحات استخوانی وجود دارد. پوشش پوستی

حداقل جذب را داشته و ضمائم قلاب مانند دائمی بر روی صفحات استخوانی وجود دارد. صفحات پیش پستی کوچک و به صورت جفت و معمولاً ۲ تا ۳ عدد می باشد. صفحات پیش مخرجی، ۱ تا ۳ عدد بوده و در یک ردیف منفرد قرار دارد.

براساس مطالعات انجام شده توسط Berg (1948) حداکثر طول تاسماهی ایرانی کورا - خزر به ۲۲۸ سانتیمتر و وزن آن به ۷۰ کیلوگرم می رسد. در رودخانه ولگا حداکثر طول ۱۷۰ سانتیمتر بوده و وزن متوسط ماهیان نر بالغ ۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم و در ماهیان ماده بالغ ۳۵-۳۰ کیلوگرم می باشد (Putilina, 1983).

تاسماهی ایرانی شبیه تاسماهی روسی است ولی در تعداد صفحات استخوانی و خارهای کمان آبششی کمی با هم اختلاف دارند. در مقام مقایسه، تاسماهی ایرانی دارای سری با ارتفاع کمتر و درازتر و بدن کشیده تر و پوزه درازتر و باریک و کمی متمایل به پائین است و رنگ بدن آن نیز نسبت به تاسماهی روسی روشن تر می باشد. جنس ماده در این گونه به طور قابل ملاحظه ای بزرگتر و سنگین تر از جنس نر هم سن خود می باشد. تفات میان دو جنس به طور واضح در پارامترهای هماتولوژی و مورفولوژی قابل مشاهده است.

پراکنش

نام persicus بر روی گونه تاسماهی ایرانی بدلیل فراوانی و پراکنش دائمی این گونه در خزر جنوب بویژه در طول نوار سواحل ایرانی دریای خزر انتخاب شده است. انتشار اصلی تاسماهی ایرانی در حوضه دریای خزر است اما عمدتاً تغذیه و زمستان گذرانی آن در بخش های جنوبی و مرکزی این دریا صورت می گیرد و بیشتر جمعیت این ماهی در نزدیکی آبهای سواحل جنوبی و جنوب شرقی و در رودخانه های فرعی آن باقی می ماند (Kazanchev, 1981).

از آنجا که این ماهی نسبت به تاسماهی روسی، آب گرمتر را ترجیح می دهد، در قسمتهای شمالی دریای خزر از فراوانی کمتری برخوردار است. پراکنش این ماهی را به طور عمده می توان در اعماق ۵۰ متری مشاهده کرد. در حال حاضر برای تاسماهی ایرانی دو زیر گونه *A. persicus persicus* Bordin, 1897 با پراکنش در دریای خزر، رودخانه های سفیدرود، کورا، گرگانرود و تجن و تعداد محدودتری در رودخانه های ولگا و سولاک و سامور و اورال و زیر گونه *A. persicus colchicus* Marin, 1940 با پراکنش در ناحیه شرقی دریای سیاه، قفقاز، رودخانه ریونی و سواحل آناتولی شناسایی شده است (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۳).

نژادها و جمعیت های تاسماهی ایرانی و مهاجرت آنها:

با توجه به پراکنش محدود تاسماهی ایرانی، مطالعات اندکی در خصوص ژنتیک این گونه با ارزش انجام شده است. با توجه به پیچیدگی و دشواری روشهای مبتنی بر DNA در گذشته بیشتر مطالعات به مقایسه مورفولوژیکی این گونه را مورد بررسی قرار داده است.

برای نخستین بار Marti, 1940 نزدیکی خصوصیات تاسماهی سواحل دریای سیاه را با تاسماهی ایران در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه کورا اعلام کرد. در سالهای اخیر Artyukhin & Zarkura (1986) مشخص نمودند که *A. guldenstaedti* واریته Colchica بخش شرقی دریای سیاه، مجموعه‌ای از خصوصیات مورفولوژیک عمومی و اکولوژیک *A. persicus* را نیز دارد. این محققین معتقد بودند که جمعیت دریای سیاه را باید تحت عنوان زیر گونه *A. persicus colchicus* نام برد. براین اساس طبقه بندی خاصی به شرح ذیل ارائه شد (Holcik, 1989):

۱- میانگین طول پوزه ۵/۶٪ طول کل بدن، پهنای پوزه در محل دهان ۳۷٪ طول پشت چشمی اپرکولوم سر، رنگ بدن در پشت خاکستری و آبی تیره، رنگ سر و طرفین بدن در زیر ردیف پلاک‌های جانبی بسیار روشن تر از قسمت پشت، ردیف پلاک‌های پشتی عمدتاً در منطقه پشتی بدن. (تاسماهی ایرانی دریای خزر) *A. persicus* Borodin, 1897

۲- میانگین طول پوزه ۶/۹٪ طول بدن، پهنای پوزه در محل دهان ۳۰٪ طول پشت چشمی اپرکولوم سر، رنگ پشت بدن از آبی تیره تا سیاه، تفاوت رنگ سر و طرفین بدن در زیر ردیف پلاک‌های جانبی با رنگ پشتی بدن محسوس نیست. ردیف پلاک‌های جانبی علاوه بر منطقه پشتی در زیر محور مرکزی نیز قرار دارند. (تاسماهی ایرانی شرق دریای سیاه) *A. persicus colchicus* Marti, 1940

هرچند که در هر منطقه دریای خزر و رودخانه ولگا نمونه‌هایی دیده شده‌اند که خصوصیات بینایی *A. persicus* و *A. guldenstaedti* را داشته و بنظر می‌رسد که باید هیبریداسیون بین این دو گونه باشند (Holcik, 1989).

Berg در سال‌های ۱۹۳۲-۱۹۱۱ معتقد بود که زیرگونه تعریف شده توسط Borodin، همان تاسماهی روسی است که تنها در رنگ بدن با یکدیگر تفاوت دارند. اما پس از مطالعات زیاد در سال ۱۹۳۴ اعلام کرد که این گونه، یک زیرگونه مستقل از تاسماهی روسی می‌باشد و این طبقه‌بندی تا سالها مورد تأیید بود. در سال ۱۹۷۷، مطالعات ایمونوالکتروفورز نشان داد که ترکیب آنتی‌ژن سرم تاسماهی روسی با تاسماهی ایرانی به طول کامل در تعداد و نوع با یکدیگر تفاوت دارند. تفاوت‌های مورفولوژیک یا اکولوژیک و ایمونولوژیک بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی و همچنین عدم وجود جمعیت‌های بینایی بین تاسماهیان ولگا سفیدرود و جدایی تولیدمثلی حتی در زمان تخم‌ریزی در داخل یک رودخانه نظریه Borodin را مبنی بر مجزا بودن این دو تاسماهی از یکدیگر ثابت می‌کند (Artyukin, 1979, 1983; Luk`yaneko et al., 1974).

تاسماهی ایرانی در دریای خزر شرایط درون گونه ای نسبتاً پیچیده ای دارد. این گونه ممکن است به جمعیت های متعددی تقسیم شود. تاسماهی ایرانی دارای ۲ نژاد فصلی است، تابستانه و زمستانه که در زمان ورود به رودخانه ها و فصل تخم‌ریزی با هم تفاوت دارند. نژاد بهار براساس وجود ۲ آنتی ژن خاص از نژاد پائیزه تشخیص داده می شود. همچنین وجود دو نژاد از این گونه در ماهیان مولدی که به رودخانه ها سفیدرود مهاجرت می کنند نیز توسط رستمی (۱۹۶۱) گزارش شده است. در رودخانه سفیدرود ۲ گروه شناسایی شده که یکی از آنها از ماه آوریل تا ژوئن و دیگری در سپتامبر تخم‌ریزی می کند.

کیوانفر در سال (۱۹۸۷) با استفاده از روش الکتروفوکوسینگ و در pH ۳/۵ تا ۱۰ با استخراج پروتئین‌های دانه‌های خاویار موفق شد که از لحاظ بیوشیمیایی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی را از همدیگر تفکیک نماید. نصری چاری (۱۳۷۲) با بررسی ۲۶ پارامتر مورفومتریک و مرستییک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی در ۲۲ پارامتر اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.01$) در مقایسه دو گونه فوق مشاهده نمود.

براساس مطالعات اولیه انجام شده در توالی DNA ناحیه D-Loop میتوکندری دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی مشخص گردید که دو گونه فوق حدود ۱ میلیون سال پیش از همدیگر تفکیک شده‌اند (Pourkazemi, 1996, Pourkazemi et al., 2000).

Rezvani Gilkolaei در سال ۱۹۹۷ توالی DNA هسته "تاسماهی ایرانی" در شرق و غرب سواحل جنوبی دریای خزر را مورد بررسی قرار داد و اختلاف معنی‌داری در فراوانی الیها مشاهده نکرد.

قرائی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) و ۵۵ آغازگر دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی را مورد مطالعه قرار داد. نوزده آغازگر بر روی ژنوم تاسماهی ایرانی و روسی محل‌های پهلوگیری (annealing) نداشتند و هیچگونه بانندی ظاهر نگردید و ۳۶ آغازگر نوار باند DNA بر روی ژل پلی‌آکریلامید نشان دادند که از بین آنها سه آغازگر یک شکل (monomorphic) و ۳۳ آغاز پلی‌مورفیک بودند که در مجموع ۳۴۱ نوار DNA ظاهر گردید. محاسبات آماری نشان داد که دو گونه بطور متوسط بمیزان ۷۰٪ تفاوت ژنتیکی دارند و از لحاظ مولکولی اثبات گردید که دو گونه فوق مستقل از یکدیگر هستند.

در گذشته جمعیت این ماهی در رود کورا به چهارگروه زیستی تقسیم شده است. نژاد اوایل بهار، نژاد اواخر بهار، نژادهای زمستانه و نژاد پاییزه. همچنین در بخش جنوبی دریای خزر، دو نژاد تاسماهی ایرانی از فراوانی بالایی برخوردار بوده و اکثریت را دارند که یکی بهاره و دیگری پاییزه که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها مهاجرت می‌کنند.

در رودخانه ولگا دو گروه زیستی در جمعیت تاسماهی ایرانی معرفی شده که در اوایل و اواخر بهار مهاجرت می‌کنند و یک گروه (اواخر بهار) بعنوان جمعیت رودخانه اورال طبق مطالعات Artyukin, 1983 (به نقل از Holcik, 1989) شناسایی شده است.

پورکاظمی (۱۳۸۵)، ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی ایرانی جنوبی دریای خزر را با استفاده از روش مایکروستلایت مورد مطالعه قرار داد. وی در مطالعات خود ۶۹ نمونه تاسماهی ایرانی از مناطق مختلف سواحل ایرانی دریای خزر شامل ۲۴ نمونه در منطقه استان گلستان، ۲۶ نمونه از ناحیه ۱ شیلات و ۱۹ نمونه از ماهیان مولد تاسماهی ایرانی در رودخانه سفیدرود و صیدگاه‌های اطراف که جهت تکثیر به مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید بهشتی منتقل گردید جمع‌آوری نمود و با پرایمرهای طراحی شده برای تاسماهی دریاچه ای توسط (May et al., 1997) مورد بررسی قرار داد.

در تاسماهی ایرانی مجموعاً ۳۵ الل در ۲ لوسای (۱۵ الل در لوکوس اول و ۲۰ الل در لوکوس دوم) مشاهده شد و اللهای I و G با فراوانی ۰/۱۵۶۷ بیشترین فراوانی و اللهای A، C و D هر سه با فراوانی مشابه به میزان ۰/۰۰۷۵ کمترین فراوانی را داشتند. در لوکوس دوم بیشترین فراوانی مربوط به اللهای H و I که بطور یکسان به میزان ۰/۱۱۹۴ و کمترین فراوانی الل مربوط به اللهای S و X بطور یکسان به میزان ۰/۰۲۲۴ بوده است. فراوانی ژنوتیپ‌های GG، HH، II و JJ بین ۸ تا ۵ مورد بیشترین فراوانی را داشتند و ژنوتیپ‌های اختصاصی در هر یک از مناطق نمونه‌برداری دیده شد که در سایر نقاط مشاهده نگردید. میزان مهاجرت ژنی برای تمام لوسای محاسبه گردید بطوریکه میزان F_{is} در لوکوس اول ۰/۴۹۵۱ و برای لوکوس دوم ۰/۰۵۳۸ و میزان F_{it} در لوکوس اول و دوم به ترتیب ۰/۵۱۷۶ و ۰/۰۷۸۵ و میزان F_{st} برای دو لوسای اول و دوم به ترتیب ۰/۰۴۴۵ و ۰/۰۲۶۰ برآورد گردید. همچنین تخمین زده شد که بطور متوسط تعداد ۶/۹ مولد در طی دوران زندگی خود بین مناطق مورد بررسی مهاجرت می‌کنند و در بین آنها مهاجرت ژنی (gene flow) وجود دارد. براساس محاسبات انجام شده به روش UPGMA، تاسماهی ایرانی در بخش جنوبی دریای خزر از سه گروه با منشاء ژنتیکی متفاوت تشکیل یافته و طبق درخت تکاملی رسم شده تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک جمعیت مستقل بوده ولی تاسماهی ایرانی منطقه غرب (ناحیه ۱) و منطقه شرق (بندرترکمن) در گروه جداگانه و مستقلی تفکیک شده‌اند. براساس تست هتروژنی و مقایسه فراوانی الل و ژنوتیپ به روش Monte-Carlo و با ۱۰۰۰ بار تکرار مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد ($P \leq 0.05$).

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که ذخایر تاسماهی ایرانی در بخش جنوبی دریای خزر از گروه و جمعیت‌های مختلف تشکیل یافته است. بطوریکه تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک جمعیت مستقل بوده و تاسماهی ایرانی بخش غربی و شرقی ناحیه جنوبی دریای خزر از شباهت ژنتیکی بالایی برخوردارند. در نتیجه مدیریت شیلاتی برای حفظ ذخایر ارزشمند ماهیان خاویاری باید برنامه مستقلی برای تاسماهی ایرانی جمعیت رودخانه سفیدرود داشته باشد. از آنجائیکه در سالهای اخیر تکثیر طبیعی این گونه در رودخانه سفیدرود به حداقل مقدار ممکن و در حد صفر رسیده است لذا در تکثیر مصنوعی تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود باید تلاش و جدیت خاصی بر مبنای اصول ژنتیکی و دستاوردهای این تحقیق صورت پذیرد.

با جمع‌بندی تمام مطالعات می‌توان اعلام نمود که وضعیت درون گونه‌ای این گونه بسیار پیچیده است زیرا بنظر می‌رسد که تاسماهی ایرانی حدود ۱۸ گروه زیستی و یا جمعیت دارد و برای اثبات این امر نیاز به بررسی دقیق و انجام آزمایشات مولکولی دارد.

تاسماهی ایرانی برای تخم‌ریزی، مهاجرت‌های طولانی را به سمت بالادست جریان رودخانه‌ها انجام می‌دهد و در گذشته عمدتاً وارد رودخانه‌های کورا، اورال و ولگانه شده و کمتر به رودهای دیگر از جمله ترک، سولاک و سامور مهاجرت می‌کنند (Holcik, 1989).

در زمانی که فراوانی تاسماهیان در حد قابل قبولی بود تاسماهی ایرانی برای تخم‌ریزی در همه طول سال به رودخانه کورا مهاجرت می‌کرد اما بیشترین (۶۰٪) مهاجرت آن در اردیبهشت و در تمام خرداد ماه صورت می‌گرفت. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد گله‌های تاسماهی ایرانی رودخانه ولگا را ماهیان مسن تشکیل می‌دهند و گروه‌های کم سن در این رود مشاهده نشده است. بخش عمده ماهیان جوان جهت تخم‌ریزی رودخانه‌های سواحل جنوبی خزر را ترجیح می‌دهند (Holcik, 1989).

این ماهی در زمستان و پائیز به مناطق گرم خزر میانی و جنوبی مهاجرت می‌کند. در این فصول، درجه حرارت آب این مناطق به ۲۰-۱۰ درجه سانتیگراد می‌رسد.

این ماهیان در هنگام مهاجرت در رودها، نزدیک بستر رود حرکت می‌کنند. در دوره‌هایی که میزان سطح آب بالاست، آنها نزدیک ساحل رود حرکت می‌کنند و هنگامیکه سطح آب در حد طبیعی یا کم است، آنها به طور غالب در مجرای اصلی رود دیده می‌شوند.

ماهیان مهاجر به صورت دوره‌ای استراحت می‌کنند به این ترتیب که بدون حرکت و پنهان در قسمت‌های دور افتاده و معمولاً عمیق باقی می‌مانند، سپس حرکت خود را به سمت بالای رود از سر می‌گیرند (Artyukhin and Zarkua, 1986).

مهاجرت تاسماهی ایرانی تحت تأثیر شرایط هیدرولوژیک رودخانه و به جریان، دمای آب و سرعت حرکت رسیدگی گنادهای آنها بستگی دارد. با افزایش درجه حرارت (به بیش از ۲۶ درجه سانتیگراد) در تابستان، مهاجرت برای تخم‌ریزی و تولیدمثل پایان می‌یابد.

سرعت حرکت این ماهیان در رودخانه‌ها و دریا، براساس شرایط زیستی ماهی و میزان بلوغ عدد جنسی تغییر می‌کند. مهاجرت ماهیان خاویاری کاملاً بالغ به محل‌های تخم‌ریزی نسبت به ماهیان نسبتاً نارس با میزان رسیدگی جنسی کمتر که در محیط‌های آب با درجه حرارت یکسان به سر برده‌اند، با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد. علیرغم اینکه بازگشت ماهیان به دریا بطور طبیعی، سریعاً پس از تخم‌ریزی صورت می‌گیرد اما بعضی از ماهیان حتی به مدت یکسال یا بیشتر (بعد از تخم‌ریزی) در رودخانه‌ها باقی می‌مانند و به تدریج به سمت پائین رود حرکت کرده، زمستان را در حوضه‌ها یا قسمت‌های عمیق رودخانه می‌گذرانند و از ماهیان، سخت پوستان و نرم‌تنان تغذیه می‌کنند.

بلوغ، تولید مثل و تخم‌ریزی

سن بلوغ در گونه‌های مختلف تاسماهیان با در نظر گرفتن جنسیت و حوضه‌های مختلف زندگی، بسیار متفاوت است، به طوری که در یک گونه با محل‌های زیست متفاوت نیز اختلاف کلی مشاهده می‌شود. رسیدگی جنسی تاسماهیان در حوضه شمالی و جنوبی دریای خزر تفاوت قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر دارند. تاسماهی ایرانی تا حدودی، زودتر از تاسماهی روسی به بلوغ می‌رسد.

جنس ماده تاسماهی ایرانی در رودخانه کورا و سفیدرود در سن ۱۲ سالگی و نرها در سن ۸ سالگی به بلوغ می‌رسند، زمان بلوغ آنها در رودهای ولگا و اورال، اندکی دیرتر (ماده، ۱۸ سالگی و نرها ۱۵ سالگی) می‌باشد (Holcik, 1989).

غدد جنسی در مهاجرت های تولیدمثلی نسبت به غدد تاسماهیان روسی مهاجر، رشد بیشتری دارد. فصل تخم‌ریزی در مناطق مختلف متفاوت است. تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر در بین ماههای فروردین تا تیر و نیز از مرداد تا شهریور و زمانی که در درجه حرارت آب بین ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد است جهت تخم‌ریزی مهاجرت می‌کند. مدت تخم‌ریزی در فصل بهار حدود ۱۵ الی ۳۰ روز طول می‌کشد و در رودخانه سفیدرود این مدت طولانی‌تر بوده و از اواخر فروردین تا خرداد و حدود ۲ ماه ادامه دارد (نصری جاری، ۱۳۷۲).

در بخش بالایی رودخانه ولگا و مخازن ولگارود، تخم‌ریزی در بین ماههای خرداد، تیر و مرداد که درجه حرارت آب بین ۱۶ تا ۲۲ درجه سانتیگراد است، صورت می‌گیرد.

بهترین حرارت برای تولیدمثل تاسماهی ایرانی، ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد ذکر شده است. قره برون معمولاً برای تخم‌ریزی رودهای کوهستانی کوتاه و با جریان تند را ترجیح می‌دهد (Artyukhin and Zarkua, 1986). بسترهای تخم‌ریزی این گونه، مانند سایر ماهیان خاویاری معمولاً سنگریزه ای و شنی، پوسته نرمتان، قطعات شکسته سنگهای شنی و رس نسبت هستند. عمق آب در محل های تخم‌ریزی حدود ۲۰ تا ۲۲ متر و سرعت جریان آب در این محل ها نسبتاً زیاد (۱ تا ۱/۷ متر بر ثانیه) می‌باشد. سن متوسط مولدین ۱۳ تا ۳۸ سال می‌باشد.

مقدار اکسیژن محلول در آب های محل تخم‌ریزی ماهیان خاویاری در رودخانه کورا ۷/۲ تا ۹/۸ میلی گرم در لیتر و در رودخانه سفیدرود ۹/۲ میلی گرم در لیتر تعیین شده است (آذری، ۱۳۸۳).

هم آوری مطلق تاسماهی ایرانی که به سن و رابطه طول - وزن بستگی دارد، از ۸۵۰۰۰ تا ۸۴۰۰۰۰ متغیر بوده و میزان متوسط آن ۳۵۰۰۰۰ عدد می‌باشد. قطر تخم های رسیده تاسماهی ایرانی بین ۳/۲ الی ۳/۸ میلی لیتر و به رنگ خاکستری متمایل به قهوه ای است. طول اسپرم ها حدود ۰/۵ میلی لیتر و طول سر آنها ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۲ میلی لیتر می‌باشد. اسپرم ماهیان خاویاری می‌تواند به مدت چند دقیقه تا چند ساعت در آب زنده باقی بماند (Dettlaf et al., 1993).

معمولاً نرها زودتر از ماده ها در محل های تخم‌ریزی حاضر می‌شوند و ماده ها زمانی به این محل می‌رسند که تخمک های رسیده و اسپرم ها به مرحله شناوری رسیده اند. ماده ها با تحریک ماهی نر شروع به تخم‌ریزی می‌کنند و به دنبال آن ماهی نر اسپرم حدود در آب رها می‌کند. لازم به ذکر است که تاسماهیان قادر نیستند کلیه تخم های خود را یکباره خارج سازند بلکه این عمل در طی دوره تخم‌ریزی و به دفعات صورت می‌گیرد.

مرحله انکوباسیون یا نمو تخم های لقاح یافته بسته به درجه حرارت آب، ۲/۵ تا ۸ روز طول می‌کشد ولی اکثر تخم ها در مدت ۳ تا ۴ روز به لارو تبدیل می‌شوند (Dettlaf et al., 1993).

عادات غذایی

به طور کلی تاسماهی ایرانی در ناحیه فلات قاره و از بی مهرگان کفزی و سایر ماهیان ریز تغذیه می کند. طی زمانی که در دریای زندگی می کنند از ارگانسم های متنوعی به عنوان غذا استفاده می کنند. رژیم غذایی تاسماهی ایرانی با سن ماهی تغییر می کند. ماهیان جوان در اولین سال بر روی بستر رودخانه ها و پناهگاهها، از گامار دیده، لارو شیرونومیده، کرم های کم تار، کورفیوم، مایسیس، اولیگوخت ها تغذیه می کنند. در شمال دریای خزر، ماهیان جوان که طول کل آنها کمتر از ۴۰ سانتیمتر است، سوسکها، نرئیس و گاوماهیان را به عنوان غذا مصرف می کنند. در حالیکه تغذیه آنها در بخش های مرکزی و جنوبی دریای خزر از گامار دیده، کرم های پرتار، خرچنگها، شگک ماهیان کوچک و گاوماهی می باشد.

طیف غذایی تاسماهی ایرانی گوناگون و نسبتاً متغیر است. این تغییرات ممکن است براساس محیطهای غذایی بستر دریا باشد اما تفاوت حتی در یک ناحیه انتخاب شده از بستر دریای نیز مشاهده می شود.

تاسماهی ایرانی برخلاف تاسماهی روسی به طور غیرمعمول از کرم پرتار نرئیس و نرم تن آبرا که در دریای خزر وجود دارند، تغذیه می کند. قسمت عمده مواد غذایی گروههای سنی جوان تر تاسماهی ایرانی در دریا از ماهیان تشکیل شده است. در حالیکه ماهیان بالغ از نرمتنان، خرچنگها و ماهیان تغذیه می کنند.

این گونه در فصل پائیز عمدتاً از صدف و خرچنگ به عنوان طعمه اصلی و از ماهی کیلکا و بالانوس به عنوان طعمه ثانویه و از شگک ماهیان به عنوان طعمه اتفاقی تغذیه می کند. در فصل زمستان بیشتر از خرچنگ و گاوماهی و در فصل بهار از صدف و گاوماهی بعنوان طعمه اصلی و از کیلکا و بالانوس به عنوان طعمه اتفاقی تغذیه می کند (نصری چاری، ۱۳۷۲).

در بررسی های اخیر مشخص گردید که تاسماهی ایرانی از طیف وسیع غذایی در دریای خزر برخوردار است. ماهیان نارس (زیر دو سال سن) از گاوماهیان، گل آذین ماهی شکلان و شکک ماهیان تغذیه می کنند. غذای اصلی تاسماهی ایرانی نارس، کرمهای پرتار ساکن جنس *Hypaniola sp.* و غذای فرعی آن سخت پوستان از خانواده یزیده (*Paramysis sp.*) تشکیل می دهد (حدادی مقدم ۱۳۸۲).

صید

از آنجا که تاسماهی ایرانی همیشه تحت گونه تاسماهی روسی یا آسترا (*Acetra*) طبقه بندی می شد، به جز در مناطق محدودی، آمار صید تاریخی این ماهی در دسترس نمی باشد. طبق آمار موجود میزان صید تاسماهی ایرانی همانند سایر گونه های خاویاری دریای خزر روند نزولی داشته است. میزان صید این گونه در سال ۱۳۷۱ به مقدار ۵۵۹/۶ تن و در سال ۱۳۷۴ به ۳۸۶/۵۴ تن، در سال ۱۳۷۷ به ۵۴۷/۳۶ تن می رسد (جدول ۱-۲). در سال ۱۳۸۰ با کمی افزایش این میزان به ۵۶۴/۷ تن می رسد ولی در سالهای اخیر یعنی سالهای ۹۱-۸۷ به پائین ترین

حد خود می رسد. بنحویکه در سال ۱۳۸۷ به ۳۶ تن و سال ۹۰ به ۱۳/۹ تن و در سال ۱۳۹۱ به ۱۰/۹ تن رسید (جدول ۱).

جدول ۱- میزان صید تاسماهی ایرانی طی سالهای ۱۳۷۱-۱۳۹۱
(تن)

سال	میزان صید	سال	میزان صید
۱۳۷۱	۵۵۹/۶۶	۱۳۸۲	۳۴۶/۱
۱۳۷۲	۴۱۵/۰۳	۱۳۸۳	۱۹۷/۷۷
۱۳۷۳	۴۰۸/۹۶	۱۳۸۴	۱۰۸/۴۵
۱۳۷۴	۳۸۶/۵۴	۱۳۸۵	۸۳/۷۳
۱۳۷۵	۴۸۸/۳	۱۳۸۶	۵۹/۴۹
۱۳۷۶	۴۴۶/۲۶	۱۳۸۷	۳۶/۲
۱۳۷۷	۵۴۷/۳۶	۱۳۸۸	۲۴/۵
۱۳۷۸	۴۳۹/۹	۱۳۸۹	۱۷/۷
۱۳۷۹	۴۴۸/۵	۱۳۹۰	۱۳/۹
۱۳۸۰	۵۶۴/۷	۱۳۹۱	۱۰/۹
۱۳۸۱	۴۴۸/۲		

تکثیر مصنوعی

تولید بچه ماهیان خاویاری در ایران از سال ۱۳۵۱ با تأسیس کارگاه تکثیر مصنوعی تاسماهیان شهید بهشتی سدسنگر آغاز شده و سپس از سال ۱۳۶۸، کارگاه شادروان دکتر یوسف پور (سیاهکل)، کارگاه شهید رجایی (ساری)، کارگاه شهید مرجانی (سد وشمگیر (گرگان) نیز برای تکثیر ماهیان خاویاری اختصاص یافتند. طبق آمار موجود، از زمان احداث اولین مرکز تکثیر ماهیان خاویاری در جوار سد سنگر رشت، تاسماهی ایرانی بعنوان یکی از گونه های اصلی در تکثیر مصنوعی تاسماهیان بوده و بیشترین آمار رهاکرد بچه ماهی را بخود اختصاص داده و این روند هم اکنون هم تداوم دارد.

در سالهای ۱۳۶۵-۱۳۶۰ حداقل ۱/۰۲ میلیون و حداکثر ۲/۳۸ میلیون عدد بچه ماهی خاویاری رهاسازی شد که به ترتیب ۰/۸۲ و ۱/۹ میلیون عدد آن متعلق به تاسماهی ایرانی بود. در دوره ۱۳۶۵-۱۳۷۷ بعلاوه اختصاص تعداد بیشتری از مراکز دولتی تکثیر کپور ماهیان به تولید بچه ماهی خاویاری میزان تولید، روند افزایشی بخود گرفت و از ۲/۳۸ میلیون عدد در سال (۱۳۶۵) به ۲۴/۵۵ میلیون در سال ۱۳۷۷ رسیده که بیشترین تعداد بچه ماهی خاویاری رهاسازی شده از بدو فعالیت بازسازی ذخایر تاسماهیان می باشد. در این دوره باز هم بیشترین تعداد با ۲۲/۵۸ میلیون عدد بچه ماهی متعلق به تاسماهی ایرانی بوده و ۹۱/۹۷٪ کل بچه ماهیان خاویاری را شامل می شد.

در سالهای ۱۳۷۷-۱۳۸۶ بنا به دلایل مختلف از جمله کمبود مولدین نوساناتی در تولید بچه ماهی خاویاری مشاهده می گردد که کمترین مقدار در سال ۱۳۸۴ به ۱۰/۵ میلیون عدد و سپس با اندکی افزایش به ۱۲/۵۵ میلیون عدد در سال ۱۳۸۶ رسید، که در سالهای فوق باز هم ۹۴/۶۸٪، ۸۵/۹۷٪ متعلق به تاسماهی ایرانی بود. میزان رها کر تاسماهی ایرانی در سالهای ۹۰ و ۹۱ به ترتیب ۴۵۸۲۱۳۵ و ۳۸۴۱۹۹۰ عدد بود که ۹۵/۷ درصد و ۸۶/۹ درصد از کل بچه ماهیان تولیدی به تاسماهی ایرانی تعلق داشت (جدول ۲).

جدول ۲- آمار رهاسازی بچه ماهیان خاویاری ایران طی سالهای ۱۳۹۱-۱۳۶۰

سال	فیلماهی	شیپ	تاسماهی روسی	تاسماهی ایرانی	ازون برون	کل
۱۳۶۰				۱۶۴۴۰۱۳	۴۰۰۰۰۰	۲۰۴۴۰۱۳
۱۳۶۱				۸۱۶۳۷۶	۳۰۰۰۰۰	۱۱۱۶۳۷۶
۱۳۶۲				۸۲۸۹۶۹	۲۰۰۰۰۰	۱۰۲۸۹۶۹
۱۳۶۳				۸۸۴۷۵۰	۲۲۰۰۰۰	۱۱۰۴۷۵۰
۱۳۶۴				۹۶۰۱۰۰	۳۳۶۰۰۰	۱۲۹۶۱۰
۱۳۶۵				۱۹۲۷۶۷۸	۴۵۶۰۰۰	۲۳۸۳۶۷۸
۱۳۶۶				۲۱۲۱۰۰۰	۹۱۹۰۰۰	۳۰۴۰۰۰۰
۱۳۶۷				۲۵۳۰۰۰۰	۶۳۰۰۰۰	۳۱۶۰۰۰۰
۱۳۶۸				۳۰۳۰۰۰۰	۶۲۰۰۰۰	۳۶۵۰۰۰۰
۱۳۶۹	۱۴۲۳۶۵			۴۰۵۵۳۸۲	۳۵۶۵۲۳	۴۵۵۴۲۷۰
۱۳۷۰	۱۷۱۸۰۰		۴۰۰۰۰	۵۹۱۹۹۷۶	۴۶۷۰۰۰	۶۵۹۸۱۷۷۶
۱۳۷۱	۴۵۴۷۱۰			۲۹۳۳۱۸۵	۶۸۸۰۰	۳۴۵۶۶۹۵
۱۳۷۲	۳۰۱۰۰۰			۳۵۶۹۹۹۰	۳۰۰۱۰۸	۴۱۷۱۰۹۸
۱۳۷۳	۴۹۱۳۰۰		۳۰۰۰۰۰	۴۶۶۲۴۱۹	۵۹۱۰۳۷۴	۱۱۳۶۴۰۹۳
۱۳۷۴	۲۸۶۰۰۰		۵۲۱۶۳۰	۸۰۴۹۷۸۱	۲۶۸۰۰۰	۹۱۲۵۴۱۱
۱۳۷۵	۳۴۴۸۰۰	۱۰۲۰۰۰	۶۷۳۹۸۱	۱۱۰۱۸۹۳۸	۳۱۶۲۱۴	۱۲۴۵۵۹۳۳
۱۳۷۶	۱۴۳۶۹۸۱	۲۳۰۷۷۰	۹۱۹۵۰۰	۱۸۷۵۱۱۲۱	۲۸۸۲۸۱	۲۱۶۲۶۶۵۳
۱۳۷۷	۶۸۷۴۰۰	۶۷۸۶۰۰	۴۱۸۱۷۰	۲۲۵۸۶۴۱۷	۱۸۱۴۶۱	۲۴۵۵۲۰۴۸
۱۳۷۸	۴۰۶۱۰۰	۳۰۳۷۷۸	۹۶۰۳۰۰	۱۷۲۹۹۷۳۲	۱۳۱۸۶۱	۱۹۱۰۱۷۷۱
۱۳۷۹	۱۹۰۰۹۱۹	۱۱۱۳۸۲۶	۱۳۲۷۴۸۰	۱۳۷۱۱۱۹۹	۲۲۶۳۷۳	۱۸۲۷۹۷۹۷
۱۳۸۰	۶۵۱۰۶۹	۵۰۳۶۰۵	۱۷۸۳۰۲۱	۱۶۲۷۸۵۹۵	۸۲۵۷۳۶	۲۰۰۴۲۰۲۶
۱۳۸۱	۲۴۰۳۷۹۴	۱۸۱۹۶۸۴	۱۸۱۶۵۸۵	۱۲۳۰۱۲۱۴	۱۳۰۰۹۸۲	۱۹۶۴۲۲۵۹
۱۳۸۲	۲۵۵۰۰	۵۳۶۹۳۷	-	۱۳۰۰۶۸۹۳	۱۲۱۷۷۰	۱۳۶۹۱۱۰۰

۱۵۰۰۱۲۹۵	۱۷۶۱۹۵	۱۲۵۸۷۵۲۱	۴۰۵۱۰۹	۲۵۷۷۷۰	۱۵۷۴۷۰۰	۱۳۸۳
۱۰۵۰۲۷۵۶	۴۰۸۸۰	۹۹۴۲۰۶۱	۱۷۷۶۶۰	۳۳۷۵۶۰	۴۵۹۵	۱۳۸۴
۱۳۸۹۵۰۰۰	۱۲۳۰۰۰	۱۲۲۰۹۰۰۰	۹۰۰۰۰	۸۰۳۰۰۰	۶۷۰۰۰۰	۱۳۸۵
۱۲۵۵۴۹۷۲	۱۱۶۶۹۸	۱۰۷۹۴۸۶۳	۱۶۵۸۰۰	۳۱۸۱۶۰	۱۱۵۹۰۵۱	۱۳۸۶
۷۴۰۷۳۴۰	۲۲۱۹۷۵	۶۱۴۰۸۰۰	۶۷۹۹۵	۲۸۰۰۷۰	۶۹۶۵۰۰	۱۳۸۷
۵۰۱۳۲۳۵	۱۷۱۲۵۰	۴۵۰۲۸۳۵	۵۲۱۰۰	۱۳۲۰۰	۲۷۳۸۵۰	۱۳۸۸
۳۷۴۱۴۴۵	۱۷۶۵۰	۳۵۴۲۶۰۰	۰	۱۸۱۱۹۵	۰	۱۳۸۹
۴۷۰۰۴۸۵	۳۱۵۵۰	۴۵۸۲۱۳۵	۰	۸۶۸۰۰	۰	۱۳۹۰
۴۴۲۸۹۵۳	۴۴۴۲۰۰	۳۸۴۱۹۹۰	۰	۶۰۲۵۰	۸۲۱۵۳	۱۳۹۱

۲-۲- تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833)

کلیات

رده بندی و جایگاه تاکسونومی تاسماهی روسی (چالباش)

Super class	Pisces
Class:	Osteichthyes
Sub class	Actionpterygii
Infra class	Chondrostei
Order:	Acipenseriformes
Family:	Acipenseridae
Genus:	Acipenser
Species:	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>



تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833)

i

مورفولوژی :

تاسماهی روسی دارای بدنی دراز و مخروطی شکل است، ارتفاع بدن ۱۲٪ تا ۱۴٪ طول کل و طول سر ۱۷٪ تا ۱۹٪ طول کل می باشد. پوزه کوتاه، کند و تا حدودی گرد است طول آن متغیر می باشد. سیلیکها ۴ عدد و در انتهای پوزه، حساس و فاقد کرک بوده و در حالت خوابیده به دهان نمی رسد ولی به ابتدای نوک پوزه می رسند. دهان عرضی و قابل بیرون زدگی و در مقایسه با ماهیان دیگر کوچک تر است. لب پائینی در ناحیه میانی

دارای بریدگی است. کاسه سر به سمت پوزه دارای شیب مختصر است. رنگ ماهی متغیر است. رنگ آن در سطح پشتی متمایل به خاکستری، سبز تیره است. معمولاً سطح جانبی قهوه ای متمایل به خاکستری و سطح شکمی، خاکستری یا به ندرت به رنگ زرد لیمویی دیده می شود. سطح پشتی ماهیان جوان، آبی و سطح شکمی سفید است (Balyaev, 1932; Banarescu, 1964; Berg, 1948; Chugunov & Chugunova, 1964; Balon, 1968; Mageramov, 1972; Artyukhin, 1979). تعداد شعاعهای غیر منشعب باله پشتی، ۲۷ تا ۵۱ عدد، باله مخرجی، ۱۸ تا ۳۳ عدد، صفحات استخوانی پشتی، ۱۸-۸ عدد، صفحات استخوانی جانبی ۲۴ تا ۵۰ عدد، صفحات استخوانی شکمی، ۶ تا ۱۳ عدد می باشد (Balyaev, 1932; Mageramov, 1972; Artyukhin, 1979; Peseridi, 1986). این ماهی در دریای خزر دارای حداکثر طول ۲۳۵ سانتیمتر و وزن ۸۵-۱۰۰ کیلوگرم (Berg, 1948; Kazanchev, 1981) و در دریای سیاه به طول ۲۳۶ سانتیمتر و وزن ۱۱۵ کیلوگرم می رسد ولی میانگین وزن آن ۱۲ تا ۱۴ کیلوگرم می باشد.

پراکنش

محدوده انتشار تاسماهی روسی در دریای سیاه، آزوف، خزر و رودخانه های منتهی به آن می باشند. تاسماهی روسی علاوه بر اشکال و فرم های مهاجر اصلی، یک شکل آب شیرین هم وجود دارد که به سمت پائین رود مهاجرت نمی کند، همچنین اشکالی از رودخانه های مختلف گزارش شده است. تاسماهی روسی در تمام دریای خزر پراکنش دارد اما فراوانی آن در خزر شمالی و غربی بیشتر از سایر مناطق است (Manea, 1966; Tsepkin & Sokolov, 1979). بچه ماهیان در بخش غربی دریا دارای ذخایر زیادی می باشند ولی بخش شمالی دریای خزر محل اصلی تغذیه ماهیان جوان حاصل از تکثیر مصنوعی و طبیعی در تابستان است.

زیستگاه

تاسماهی روسی در خلال دوره زندگی در دریا، در آبهای کم عمق در ناحیه لایه قاره ای زیست می کند و اساساً در آب شور جایی که تراکم بی مهرگان (عمدتاً نرمتنان) یا ماهیان کفزی کوچک (عمدتاً گاوماهیان) زیاد است، به سر می برند (Legeza, 1972). این ماهی بسته به فصل در اعماق مختلف آب مشاهده می شوند که عمده‌تاً با رژیم غذایی و توزیع موجودات زنده غذایی در ارتباط است. در خلال دوره تغذیه تابستانه تاسماهی روسی اغلب در اعماق ۱۰ تا ۲۵ متری باقی می ماند و به اعماق زیر ۶۰ تا ۷۰ متر نمی رود و در پائین و زمستان در اعماق ۸۰ تا ۱۰۰ متری بیشتر به سر می برند. این لایه های آبی غلیظ تر و شورتر بوده و دمای آنها نسبتاً ثابت است.

مهاجرت

معمولاً مهاجرت تخم‌ریزی این ماهی به رودها در اوایل بهار شروع می‌شود، در اواسط یا اواخر تابستان به اوج خود می‌رسد و در اواخر پائیز متوقف می‌شود. با افزایش جریان آب شیرین به دریا و با گرم شدن آب شیرین و آب دریا، افزایش فزاینده‌ای در مهاجرت تخم‌ریزی ایجاد می‌شود.

مهاجرت توده‌ای تاسماهی روسی در ولگا، در خلال دوره پائین آمدن سطح آب و در بالاترین دمای آب مشاهده می‌شود و پس از آن با کاهش مجدد دمای آب مهاجرت به تدریج کاهش می‌یابد و در اواخر پائیز و اوایل زمستان عملاً متوقف می‌شود. ماهی چالباش در رودخانه ولگا که مهمترین و دیرمحصول‌ترین مناطق تخم‌ریزی آن در این رود قرار دارد با سرعت متوسط ۱۸/۱ تا ۲۲/۶ کیلومتر در روز مهاجرت می‌کند (Batychkov, 1963؛ Pavlov and Elizarov, 1969) اکثریت جمعیتی که در حال حاضر برای تخم‌ریزی وارد رود ولگا می‌شوند، ماهیان چالباش زمستانه‌ای هستند که از بلوغ کمتری برخوردارند. معمولاً این ماهیان در همان سالی که وارد رود می‌شوند تخم‌ریزی نکرده و ترجیح می‌دهند که در خلال زمستان در قسمتهای مختلف رود منتشر شوند و در بهار سال بعد تولیدمثل کنند.

ماهیان پس از تخم‌ریزی، جهت تغذیه به دریا مهاجرت می‌کنند. این مهاجرت از مصب رودخانه ولگا، به سمت حوضه شمالی دریای خزر که غنی از مواد غذایی و کفزیان است صورت می‌گیرد. همچنین برای تغذیه مسیر مهاجرت خود را در امتداد ساحل غربی حوضه میانی و جنوب دریا امتداد می‌دهند. اما گروه زیادی از این ماهیان تحت تأثیر جریان‌ات حوضه جنوبی خزر، مسیر مهاجرت خود را در امتداد سواحل غربی حوضه جنوبی ادامه داد و به سواحل ایران نزدیک می‌شوند و در این بخش از غرب به شرق مهاجرت می‌کنند.

بعضی از ماهیان چالباش که به خوبی رشد کرده‌اند، در فصل پائیز به رودها یا آبهای نزدیک دهانه رود حرکت می‌کنند و زمستان خود را در آنجا در آب عمیق می‌گذرانند. بچه ماهیان و ماهیانی که سالهای بین دو تخم‌ریزی را سپری می‌کنند در طی زمستان، در اثر سرمای آب حوضه شمالی در حوضه میانی و به خصوص حوضه جنوبی تجمع می‌نمایند. آبهای ایران به دلیل داشتن شرایط حرارتی مناسب، مهمترین مراکز تجمع ماهیان خاویاری در فصل زمستان هستند. در این فصل کلیه ماهیان خاویاری از ماهیان زیر سن بلوغ و ماهیانی که سالهای بین دو تخم‌ریزی را سپری می‌کنند مشاهده می‌شوند که در سواحل جنوب دریای خزر (آبهای ایران) و در اعماق ۵۰ تا ۲۰۰ متری زمستان را می‌گذرانند و با گرم شدن هوا در فصل بهار مجدداً مسیر مهاجرت را در جمعیت جریان عمومی دریای خزر ادامه می‌دهند تا به مرحله بلوغ برسند (Pourkazemi et al., 1999).

مسیر مهاجرت ماهیان خاویاری مولد که تخم آنها در مرحله ۴ رسیدگی جنسی است با ماهیان زیر سن بلوغ و ماهیانی که سالهای بین دو تخم‌ریزی را سپری می‌نمایند، متفاوت است. به طوریکه پس از زمستان‌گذرانی در آبهای عمیق به هنگام بهار با گرم شدن آب در سطح دریای خزر و انجام چرخه‌های بهاری، ماهیانی که تخمدان آنها در مرحله ۴ رسیدگی جنسی است، رفته رفته برای یافتن رودخانه مناسب به ساحل نزدیک می‌شوند.

بلوغ، جفت گیری و تولیدمثل

تاسماهی روسی از نظر زمان رسیدگی به بلوغ جنسی، در بین ماهیان خاویاری مقام سوم را دارد و پس از استرلیاد و ازون برون قرار می گیرد. بلوغ در حوضه های رودخانه ای متفاوت و نیز در رودخانه مختلف موجود در هر حوضه، در سنین متفاوتی حاصل می شود. با این وجود بلوغ اکثریت نرها در سن ۱۱ تا ۱۶ سالگی است (Peresidi, 1986). بلوغ جنسی تاسماهی روسی در رودخانه ولگا ۱۳-۱۰ سالگی و رودخانه کورا ۱۴-۱۲ است. ذخایر دریای آزوف زودتر بالغ می شوند به طوریکه جنس نر در ۸ تا ۹ سالگی و جنس ماده در ۱۰ تا ۱۴ سالگی به بلوغ می رسد.

تاسماهی روسی همچون تاسماهی ایرانی هرساله تخمیزی نمی کند، بعنوان مثال تاسماهی روسی نر در ولگا برای رسیدن مجدد جنسی پس از تخمیزی به ۲ تا ۳ سال و ماهی ماده به ۴ تا ۵ سال زمان نیاز دارد (Krasikov, 1981).

ماهی ماده جمعیت دانوب پس از ۵ تا ۶ سال مجدداً آماده تخمیزی می شود. تعداد تخمهای ماهی چالباش متغیر بوده و اساساً به اندازه ماهی بستگی دارد. رنگ عمومی تخم ها، خاکستری متمایل به قهوه ای است. محدوده دمایی تخمیزی ماهیان چالباش نسبتاً وسیع است. تخمیزی عموماً در ساعات اولیه صبح اتفاق می افتد (Vlasenko, 1979).

بیشتر فعالیت تولیدمثل بر روی بستر کانال اصلی رود اتفاق می افتد در حالیکه تعداد کمی از ماهیان تخمهای خود را در نواحی سیلابی مسیر رود می ریزند. قبل از اینکه وسعت مکانهای تخمیزی به سبب احداث سدها کاهش یابد، تخمهای ماهی خاویاری ماده در یک ناحیه به سمت ۳۵۰ مترمربع گسترش پیدا می کرد اما امروزه به صورت دستجات خوشه ای شکل متراکم ریخته می شود.

ماهیان خاویاری ترجیح می دهند که بر روی بستری با رسوبات سنگریزه ای یا در امتداد رود با شن زمخت و در اعماق ۴ تا ۷ متری و با سرعت جریان ۱ تا ۱/۵ متر بر ثانیه تخمیزی کنند (Peresidi, 1988).

طی سالهای ۱۹۵۰ و ۱۹۵۱ در محل تخمیزی این ماهیان یک گروه بیولوژیک تشخیص داده شد که از لحاظ بیولوژی تکثیر با سایرین متفاوت داشت. بعدها در رودخانه های کورا و اورال به ترتیب ۴ و ۳ گروه بیولوژیک به عنوان گروه اوایل بهاره، اواخر بهاره، گروه پائیز که در تابستان وارد رودخانه می شوند و گروه پائیز که در پائیز وارد رودخانه می شوند، از یکدیگر تفکیک شدند و در این مورد از نظر تفاوت های جنسی و رسیدگی گنادها به تأیید نیز رسیده است (Baranikova, 1991). مطالعات (Luk'yanenko et al., 1972) نیز نشان داد که این تفاوت ها نه تنها در گروههای مختلف خزر وجود دارد بلکه در جمعیت های رودخانه های مختلف (از جمله رودخانه های سیبری، دریای سیاه و آرال) نیز چنین تفاوت هایی دیده می شود. این تفاوت ها از نظر مورفولوژیک قابل تشخیص نبوده بلکه فقط از نظر زمان تخمیزی (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۶)، محل تخمیزی در رودخانه و میزان تجمع و مصرف مواد انرژی را با یکدیگر اختلاف دارند.

مطالعات (Baranikova 1991) نشان می دهد که تاسماهی روسی در دریای خزر از ۲ جمعیت اورال و جمعیت ولگا مشتق می شود که هر یک از آنها دارای دو نژاد بهاره و پائیزه هستند که با شرایط متفاوت رسیدگی گنادها به رودخانه مهاجرت می کنند.

تغذیه

ماهی چالباش براساس عادات غذایی خود یک ماهی کفزی است که از نرمتان تغذیه می کند. این ماهی در اعماق ۲/۵ تا ۷ متری تغذیه می کند و در محیط های غذایی خود در دریا در طول ساعات بدون وقفه ی قابل ملاحظه غذای می خورد، اما در تغذیه آنها در اوج مشاهده می شود که در خلال ساعات غروب آفتاب و طول آن می باشد (اقتباس از Holcik, 1989) ترکیب غذایی تاسماهی روسی را گاوماهی، خرچنگ گرد، صدف دو کفه ای، کیلکا و کفال تشکیل می دهد.

براساس بررسی های انجام شده تنوع غذایی تاسماهی روسی در سواحل جنوبی دریای خزر بیشتر از سایر مناطق است. نتایج حاصل از بررسی رژیم غذایی تاسماهی روسی در سواحل جنوبی دریای خزر در فصل های مختلف نشان می دهد که این ماهی در بهار از خرچنگ و گاو ماهی بعنوان طعمه اصلی و صدف دو کفه ای و کیلکا به عنوان طعمه ثانویه و کفال، کپور، میگو، بالانوس و نریس به عنوان طعمه اتفاقی تغذیه می کند. در زمستان عمدتاً از خرچنگ، گاوماهی، صدف بعنوان غذای اصلی، از شگ ماهی و صدف دو کفه ای بعنوان طعمه ثانویه و از کفال و میگو و کپور به عنوان طعمه اتفاقی تغذیه می کند.

صید و بازسازی ذخایر تاسماهی روسی

اگر مجموع صید تاسماهیان ۵ کشور ساحلی دریای خزر را با همدیگر مقایسه نمائیم تاسماهی روسی از لحاظ میزان صید مقام اول را در بین تاسماهیان دریای خزر را دارد و میزان بسیار کمتری در حوضه های آبی دریای سیاه و آزوف صید می شود.

در دریای خزر صید تاسماهی روسی عمدتاً^۱ در خزر شمالی این دریا (در محدوده آبی روسیه و قزاقستان) تمرکز داشته و در حوضه جنوبی دریای خزر کمتر یافت می شود. طی ۱۵ سال اخیر ذخایر تاسماهیان روسی در آبهای ایران شدیداً کاهش یافته و میزان صید آن از ۳۶۳ تن در سال ۱۳۷۱ به ۰/۴۲۳ تن در سال ۱۳۹۱ تقلیل یافته و بعلت توجه اندک به بازسازی و احیاء ذخایر این گونه روند نزولی خود را در سالهای آتی طی خواهد کرد (جدول ۳). این امر بیانگر وابسته بودن ذخایر تاسماهی روسی خزر جنوبی دریای خزر به ذخایر در بخش شمالی خزر می باشد.

جدول ۳: میزان صید تاسماهی روسی (۱۳۷۷-۱۳۹۱) در آبهای ایران ارقام به تن

۱۳۷۷	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷	۱۳۸۸	۱۳۸۹	۱۳۹۰	۱۳۹۱
۷۵۳	۵۶۷	۴۶۶	۳۱۴	۳۴/۲	۲۰/۷	۹۷	۵/۸	۴/۴	۴۳۷	۱۸۴	۱۳۳۳	۰۹۳۱	۰۸۱۶	۰۴۳۳

از لحاظ بازسازی ذخایر و تکثیر مصنوعی این گونه در ایران وضعیت بسیار نامطلوبی دارد زیرا از یک طرف میزان تکثیر طبیعی آن در آبهای ایران به صفر رسیده و از طرف دیگر بعلت عدم مدیریت و برنامه ریزی جدی میزان رهاسازی بچه ماهی از طریق تکثیر مصنوعی روند نامطلوبی دارد. در بعضی از سالها (سالهای ۱۳۷۰، ۱۳۷۲، ۱۳۸۲) میزان رهاکرد این گونه صفر و در سایر سالها بین ۹۰ تا ۱۳۳۷ هزار عدد بچه ماهی متغیر بوده است (جدول ۴).

در سالهای گذشته عمده جمع آوری مولدین این گونه در ماههای پائیز صورت می گرفت و امروزه گرچه تعداد مولدین بالغ این گونه کاهش یافته ولی تعداد آن در حدی که بتوان ذخایر شدیداً در حال انقراض را از نابودی و انقراض کامل نجات داد صید می گردد (۱۰ الی ۲۰ عدد در سال) ولی متأسفانه همین تعداد اندک تکثیر نمیشود.

جدول ۴- آمار رهاسازی بچه تاسماهی روسی طی سال ۱۳۷۶ لغایت ۱۳۹۱ (میلیون عدد)

۱۳۷	۱۳۷	۱۳۷	۱۳۷	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۹
۶	۷	۸	۹	۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
۰/۹۱۹	۰/۴۱۸	۰/۹۶	۱/۳۳۷	۰/۸۸۳	۰/۸۱۷	۰	۰/۴۰۵	۰/۱۷۸	۰/۰۹	۰/۱۶۵	۰/۶۷۹	۰/۰۵۲	۰

گرچه تاسماهی روسی بعنوان یکی از گونه های مهم تجاری و اقتصادی دریای خزر به شمار می رود ولی متأسفانه مطالعات بسیار اندکی در خصوص ساختار ژنتیکی این گونه صورت گرفته است. در گذشته ساختار جمعیت تاسماهی روسی با استفاده از پروتئین های آنزیمی و غیر آنزیمی مطالعه شده است. Keyvanfar در سال ۱۹۸۸ با مطالعه نمونه های خون ۲۰۸۰ از ۴ گونه از ماهیان خاویاری بالغ جنوب دریای خزر را جمع آوری و آنتی ژنهای گلبولهای سفید خون را مورد مطالعه قرار داد. وی در مطالعات خود تفاوتی در آنتی ژن گلبولهای خون ۴ گونه از تاسماهیان خزر جنوبی مشاهده نکرد. Chikhachev در سال ۱۹۸۳ ساختار جمعیت تاسماهی روسی ازون برون و فیلماهی دریای آزوف و خزر شمالی را با استفاده از روش آلوزایم مورد مطالعه قرار داد. وی ۱۰ آنزیم مختلف LDHa، LDhb، Aat، Est، PGM، MDH، TF، Alb، Myo، Chry را در ۴۴ لوسای مورد بررسی قرار داد که ۲۵٪ لوسای پلی مورفیک بودند و میزان متوسط هتروزایگوسیتی ۶/۶٪ بود. وی در مطالعه خود دریافت که فراوانی الل بین ماهیان بالغ ماده و نر نژادهای زمستانه و تابستانه تاسماهی روسی اختلاف وجود دارد. متوسط تعداد الل در هر لوکوس ۳/۳ عدد بود که بیشتر از فیلماهی و ازون برون بوده است.

Ivanenkov & Kamshilin (1991) با مطالعه بر روی آلبومین تاسماهی روسی و فیلهای پیشنهاد نمودند که از این پروتئین بعنوان یک مارکر مولکولی در مطالعه ساختار جمعیت تاسماهیان می توان استفاده نمود. گرچه مقدار و جایگاه نسبی باندهای آلبومین به کیفیت سرم پروتئین تهیه شده بر روی ژل بستگی دارد. از طرفی سایر محققین (Lukyanenko et al., 1975; Kamshikin, 1983) بر این باورند که متغیر بودن میزان آلبومین عمدتاً به وضعیت و حالت فیزیولوژیکی موجود (گونه ماهی) بستگی دارد. Slyn'ko (1976) با مطالعات آنزیم LDH بر روی تاسماهی روسی دریافت که این آنزیم ساختار تترامری در اینگونه دارد و حداقل ۵ ژنوتیپ (در بافت ماهیچه) و ۱۵ ژنوتیپ (در بافت قلب) گزارش نمود. بیشتر مطالعات انجام شده بر روی ساختار ژنتیک تاسماهی روسی دریای خزر، استفاده از روش های بیوشیمیایی (پروتئین های آنزیمی و غیر آنزیمی) بوده است. Pourkazemi (1996) اولین کسی بود که ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی روسی در حوضه جنوبی دریای خزر را با روش مولکولی مبتنی بر مولکول DNA مورد بررسی قرار داد. در بررسی فوق تعداد ۱۴۵ نمونه از ماهیان بالغ تاسماهی روسی سواحل ایرانی دریای خزر جمع آوری و ناحیه D-Loop مولکول mtDNA با استفاده از روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفت. هفت هاپلو تیپ AAAAAA، AAAAAB، AAAAAF، AABAA، AAABB، ABBBBF و BBBBBF شناسایی شد و میزان تنوع نوکلئوتیدی 0.01 ± 0.51 بود ولی بین هاپلو تیپ های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ($P \leq 0.05$). دو ژنوتیپ A و B در جمعیت تاسماهی روسی سواحل ایرانی جنوب دریای خزر شناسایی شد که می تواند بعنوان مارکر ژنتیکی برای گروه های مختلف تاسماهی روسی دریای خزر معرفی گردد که بعلت عدم وجود موانع، طول عمر بالای تاسماهی روسی و مهاجرت جمعیت ها به مناطق مختلف خزر باعث گردید که تمایز جمعیت ها قابل تفکیک نباشد (Pourkazemi et al., 1999).

در مطالعه دیگری (Rezvani Gilkolaei, 1997)، با استفاده از ژن ND5/6 مولکول میتوکندری ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی روسی سواحل ایرانی جنوب دریای خزر را مورد بررسی قرار داد و در بین مناطق شرق و غرب سواحل جنوب دریای خزر اختلاف معنی داری در فراوانی هاپلو تیپ های این گونه گزارش نمود. متأسفانه تاکنون گزارشی از سوی محققین روسی در خصوص ساختار ژنتیک جمعیت این گونه در دریای خزر را ارائه نشده است.

مروری بر منابع

به رغم اهمیت جایگاه تاکسونومی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، مطالعات معدودی در این خصوص انجام گرفته و منابع اندکی یافت میشود که در ذیل به سابقه آن اشاره میگردد:

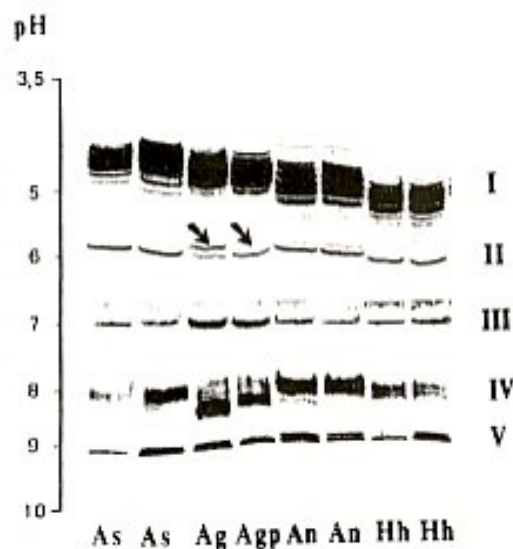
الف- مطالعات انجام شده جهت تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی:

(نصری چاری، ۱۳۷۲) با بررسی مقایسه ای در مورد ۲۶ شاخص مورفومتریک بین تاس ماهی روسی و تاس ماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر از عدم وجود اختلاف معنی دار در ۴ شاخص (تعداد شعاع باله مخرجی، تعداد

برجستگیهای استخوانی شکمی، ارتفاع سر در انتها، نسبت ارتفاع سر در مرکز چشم به طول کلی) و وجود تفاوت معنی دار در مورد ۲۲ شاخص (سن، طول کل، طول فورک، طول سر، طول پوزه، تعداد شعاع باله پشتی، تعداد برجستگیهای استخوانی پشتی، تعداد برجستگیهای استخوانی پهلوئی، تعداد خارهای آبششی، وزن شکم پر، عرض پوزه در محل سیلیک، عرض پوزه، ارتفاع سر در مرکز چشم، فاصله نوک پوزه تا سیلیک، فاصله سیلیک تا دهان، نسبت عرض پوزه در محل سیلیک به طول کلی، فاصله نوک پوزه تا سیلیک به طول سر، فاصله نوک پوزه تا دهان به طول سر، نسبت طول سر به طول کلی، نسبت طول پوزه به طول کلی، نسبت ارتفاع سر در انتها به طول کلی، نسبت عرض پوزه به طول کلی) می باشد.

(نصری چاری، ۱۳۷۲) با مطالعات خود گرچه توانست براساس شاخص های مورفومتریک و مرستیکی تفاوت معنی داری در بعضی از صفات بین دو گونه مشاهده نماید که برای شناسایی ظاهری دو گونه از همدیگر مفید است ولی برای تفکیک خاویار ۲ گونه و یا تجارت بین المللی خاویار کاربردی نداشت.

اولین تحقیق در خصوص شناسایی و تفکیک انواع خاویار درای خزر توسط (Keyvanfar et. al., 1998) انجام گرفت که در بررسی خود موفق شد انواع خاویار را با روش "الکتروفوکوسینگ" در گونه های فیلماهی، ازون برون و شیپ تفکیک نماید. دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی تمایزی در حد یک باند نشان داد ولی توانست پرایمر یا آغازگری برای مطالعات تکمیلی ابداع نماید. در هر حال دستاورد فوق آغازی برای دستیابی به تفاوت های مولکولی دو گونه بود. (تصویر ۱).



شکل ۲. ایزوالکتروفوکوسینگ پروتئینهای موجود در خاویار پنج گونه ماهی خاویاری (ازون برون: As، تاسماهی روسی: Ag، تاسماهی ایرانی: Ap، تاسماهی شیپ: An، فیلماهی: Hh)، فلشها نشان دهنده رسوب دو باند پروتئینی از تاسماهی روسی و یک باند پروتئینی از تاسماهی ایرانی در محدوده pH بین ۵/۷ تا ۶ می باشد.

(Pourkazemi, 1996) با بررسی نواحی D-Loop و ND5 از میتوکندری در دو گونه تاس ماهی ایرانی و روسی نشان داد که این دو گونه فقط در ۵ باز آلی با یکدیگر تفاوت دارند.

(Pourkazemi et al., 2000) با استفاده از توالی یابی mtDNA نشان دادند که تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی از نظر تکاملی به هم نزدیک هستند و ۲/۲٪ انشعاب توالی در ژن ND5 بیانگر آن است که این دو گونه تقریباً یک میلیون سال پیش از یکدیگر تمایز یافته اند.

(Rezvani Gilkolaei, 2002) با روش SCAR موفق شد خاویار گونه‌های فیل ماهی، ازون‌برون و شیپ را از خاویار گونه‌های تاسماهی ایرانی (قره برون) و تاسماهی روسی (چالباش) از همدیگر تفکیک نماید ولی روش فوق قادر نبود خاویار دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی از یکدیگر تفکیک نماید و مارکر مولکولی برای این منظور معرفی نگردید.

(قربانی و همکاران، ۱۳۸۰) با مقایسه فاکتورهای مورفومتریکی و مریستیک در تاس ماهیان نوس ایرانی و روسی، توانستند بین این دو گونه اختلاف پیدا کنند و بیان داشتند با افزایش رشد این اختلاف‌ها بیشتر می‌شود. قرائی و همکاران (۱۳۸۴) با استفاده از روش RAPD و بکارگیری ۵۳ پرایمر توانست تفاوت‌هایی از لحاظ باند DNA در گونه شناسایی نماید ولی اولاً باندهای اضافی متعددی در محصول PCR مشاهده گردید و ثانیاً با تکرار آزمایشات و با استفاده از پرایمرهای شناسایی و معرفی شده محصول PCR مشابه قبلی بدست نیامد. ثالثاً مارکرهای معرفی شده، کلون نگردیدند و پرایمرهای اختصاصی طراحی نگردید.

(خوش خلق، ۱۳۸۵) با بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاس ماهی ایرانی و روسی با استفاده از مارکر میکروستلایت در سواحل مختلف دریای خزر مشاهده شد که تنوع ژنتیکی در تاس ماهی ایرانی بیشتر از تاس ماهی روسی است و مارکر مولکولی جهت تمایز خاویار دو گونه فوق یافت نشد.

ب- مطالعات انجام شده برای شناسایی جمعیت‌های تاسماهی ایرانی و روسی در خارج از کشور:

مطالعات متعددی توسط محققین و اندیشمندان ژنتیک برای تمایز گونه‌های تاسماهیان و معرفی مارکر مولکولی خاویار در دنیا انجام شده است که عبارتند از:

- نخستین بار (Borodin, 1897) با ارزیابی و بررسی‌های مورفومتریکی و بیولوژیک تاس ماهیان رودخانه‌های کورا و اورال، توانست گونه تاس ماهی ایرانی را در رودخانه اورال شناسایی و به عنوان یک گونه مستقل با نام علمی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) معرفی نمود.
- بعدها (Berg, 1948) با بررسی‌های مقایسه‌ای چندین شاخص مورفومتریکی و مریستیک دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاسماهی روسی اعلام نمود تاسماهی ایرانی زیرگونه‌ای از تاس ماهی روسی تحت عنوان *Acipenser*

gueldenstaedtii persicus Borodin, 1897 است و محل اصلی پراکنش آن رودخانه های کورا و سفیدرود می باشد (Holcik, 1989).

- (Artyukhin, 1974) با بررسی ۴ پارامتر مریستیک و ۸ پارامتر مورفولوژیک و تحقیقات هیستولوژیک اعلام نمود تاسماهیانی که در اواخر بهار به ولگا مهاجرت می کنند *Acipenser gueldenstaedtii persicus* و مهاجرین تابستانه به رودخانه مذکور همان تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* می باشند (Artyukhin, 1979)، تاسماهیانی را که در اواخر بهار به اورال مهاجرت می کند تاسماهی ایرانی معرفی نمود.
- طبق نظر (Lukyanenko, 1973) و (Artyukhin, 1979) در رودخانه ولگا تاسماهی ایرانی عمدتاً در اواخر بهار و اوایل تابستان ولی تاسماهی روسی در اواخر زمستان و اوایل بهار تخمیزی می کند و این موضوع نشان می دهد این دو ماهی از نظر ژنتیکی با هم فرق می کنند گرچه بعدها (Mitrofanov et al., 1986) اعلام نمودند در رودخانه اورال این دو ماهی در یک زمان و در یک مکان تخمیزی می کنند.
- پژوهشهای مقایسه ای انجام شده در مورد تاس ماهی روسی و تاس ماهی ایرانی رودخانه ولگا نشان داد این دو گونه از نظر ۵ شاخص مریستیک و ۳۵ پارامتر مورفومتریکی و برخی از شاخصهای بیولوژیک تفاوتی را نشان می دهند (Putilina, 1983).
- (Mitrofanov et al., 1986) اظهار داشتند تفاوتهای ژنتیکی و اکولوژیک کافی که نشان دهد تاسماهی ایرانی بعنوان یک گونه مستقل است وجود ندارد. همچنین تفاوت موجود در زمان تخمیزی این دو ماهی یک اختلاف ژنتیکی نیست و اختلافات مریستیک و مورفومتریکی آنها نیز نشان دهنده این است که تاسماهی ایرانی زیرگونه ای از تاسماهی روسی است.
- بررسی ترکیبات آنتی ژنی پروتئینهای سرم خون تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی نیز تفاوت اساسی را نشان داد. تاس ماهی ایرانی دارای سه ترکیب آنتی ژنی اختصاصی در سرم خون خود می باشد در حالیکه این آنتی ژنها در تاس ماهی روسی وجود ندارد (Lukyanenko and Lukyanenko et al 1974; Sedov., 1967 بر گرفته از Holcik, 1989).
- (Birstein et al., 1998) با توالی یابی چند منطقه میتوکندری تاس ماهیان (Cyt b, 12S, 16S) نشان دادند که از نظر فیلوژنی تاس ماهی ایرانی شباهت زیادی به تاسماهی سبیری *Acipenser baerii* دارد.
- (Birstein et al., 1999) با مقایسه توالی های سیتوکروم b نتوانستند تفاوتی بین خاویار تاس ماهیان روسی، ایرانی، ایتالیایی و سبیری پیدا کنند.
- (Birstein et al., 2000) با استفاده از روش Species-specific PCR نیز در اثر همپوشانی پروفایل میتوکندری گونه های نزدیک به هم نتوانستند گونه های تاس ماهی ایرانی و روسی را از هم تفکیک نمایند.
- (Debus et al., 2002) بررسی های مورفولوژیکی روی اووسیت های تاس ماهیان (هم خاویار و هم اووسیت های فرآوری نشده) را ادامه دادند و نتوانستند با تصاویر میکروسکوپ الکترونی دو جنس فیل ماهی

و تاس ماهی را به خوبی تشخیص دهند ولی در مورد گونه های تاسماهی ایرانی و روسی بدلیل فرآوری امکان شناسایی میسر نبود.

- (Ludwig et al., 2002b) با استفاده از روش توالی یابی کل cyt b و روش RFLP میتوکندری توانستند تمامی تاس ماهیان را تفکیک دهند ولی موفق به تفکیک دو گونه تاس ماهی ایرانی و روسی نشدند. هیچ اندونوکلئازی که بتواند برای افتراق تمام گونه های خاویاری علی الخصوص این دو گونه به صورت واحد بکار رود وجود ندارد و هر کدام از گونه ها در چند اندونوکلئاز با یکدیگر مشترک هستند.

- (Congiu et al., 2002) با استفاده از مارکر AFLP توانست بسیاری از تاس ماهیان را شناسایی کند ولی در گونه های نزدیک به هم نظیر تاس ماهی ایرانی و روسی قابلیت تفکیک بالایی را نداشت.

- (Ludwig et al., 2003) با مقایسه تاس ماهی روسی و آدریاتیک اعلام گردید که توزیع مارکرهای DNA هسته ارتباط قوی با توزیع جغرافیایی دارد و ارتباط نزدیک آنها یا در اثر مهاجرت در عصر یخبندان بوده و یا در اثر یک پلی مورفیسم اجدادی است.

- (Doukakis, 2005) با بررسی سه توالی میتوکندری (Cyt b, NADH5, control region) از تاس ماهی روسی دو دودمان در میتوکندری این ماهی مشاهده کرد، یک شاخه مربوط به *Acipenser persicus* و *Acipenser naccari* و شاخه دیگر مربوط به *Acipenser baerii* بود. اما نتوانست اختلاف معنی داری بین این دو گونه شناسایی کند.

- (Krieger et al., 2008) در آزمایشی مشابه با بررسی چندتوالی میتوکندری و تعمیم آنها با نتایج Birstein نیز همان نتایج را تکرار کردند.

- (Ruban et al., 2008) با استفاده از داده های مورفولوژیک و مولکولی (cyt b) و مقایسه نتایج با هم بیان کردند که نمی توان تاسماهی ایرانی را یک گونه مستقل محسوب کرد.

- (Rehbi et al., 2008) با استفاده از روش SCCP نتایجی شبیه PCR-RFLP و توالی یابی سیتوکروم b بدست آوردند با این تفاوت که توانستند تفاوت جزعی را بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و روسی مشاهده کنند و پیشنهاد کردند که برای بدست آوردن جوابی دقیق تر جمع آوری نمونه ها با دقت بیشتری انجام شود.

- (Zhang et al., 2008) روابط فیلوژنتیکی ۱۲ گونه از راسته تاس ماهی شکلان را بررسی نمودند و نشان داده شد که مولکول mtDNA مارکر مناسبی برای مطالعات فیلوژنتیکی تاس ماهیان می باشد و همچنین با استفاده از توالی یابی این مولکول عنوان نمودند که جنس *Huso* می تواند به جنس *Acipenser* نسبت داده شود.

- (Rastorguev et al., 2008) تنوع کل ژنوم میتوکندریایی را در ۱۱ گونه از تاس ماهی مورد بررسی قرار دادند، که در این مطالعه قسمتهای مختلف از ژنوم میتوکندریایی را بر اساس سودمند بودنشان برای مطالعات مختلف ژنتیکی تاس ماهیان اولویت بندی نمودند و با توالی یابی کل میتوکندری تاس ماهیان Ponto-Caspian

نشان دادند که تاس ماهی ایرانی بیشترین شباهت را به تاس ماهی روسی دارد ولی شاخص اطمینان آن (۵۵٪ bootstrap) پایین بود.

• (Mugue et al., 2008) با بررسی منطقه کنترل (D-loop) میتوکندری بیش از ۱۴۰۰ نمونه از تاس ماهیان بیان کردند که برای تمایز دادن تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی می بایست از پلی مورفیسم مارکرهای هسته استفاده شود.

• (Vasileva, 2009) با استفاده از شاخصهای مورفولوژی و مریستیک جمجمه تاس ماهی ایرانی و روسی مشاهده کرد که داده هایی که از بررسی شاخصهای جمجمه شناسی این دو گونه بدست آمده است، همپوشانی دیده می شود.

• تحقیقات مقایسه ای انجام شده توسط (Birstein and Desalle., 1998) ، (Birstein et al., 2000) و (Birstein and Doukakis., 2001) در مورد ژنهای DNA میتوکندریایی (mtDNA): cytb (650bp)، 12S (150bp)، 16S (350bp)، ND5 (645bp) و D-loop (846 bp)، همچنین تحقیقات (Mugue et al., 2008) و (Ruban et al., 2011) در مورد نواحی کنترل کننده mtDNA (D-loop) تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی اختلافی را بین این دو گونه نشان نداد لذا این محققین عنوان داشتند تاسماهی ایرانی را نمی توان گونه ای مستقل از تاسماهی روسی در نظر گرفت.

• به رغم وجود دیدگاههای بسیار متفاوت در بین محققین مختلف در خصوص استقلال گونه تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی، در حال حاضر این گونه توسط کنوانسیون CITES و همچنین در گروه تخصصی ماهیان خاویاری در IUCN و همچنین انجمن جهانی حفاظت از ماهیان خاویاری (WSCS) به عنوان یک گونه مستقل در نظر گرفته شده است.

در داخل کشور:

• اولین مطالعات ژنتیک جمعیت تاسماهی روسی با استفاده از روش RFLP بر روی ناحیه D-Loop میتوکندری توسط (Pourkazemi 1996, 1999) انجام شد و موفق شد دو ژنوتیپ متفاوت از این گونه را در آبهای ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر گزارش نماید.

• (Rezvani Gillkolaei 1997) با استفاده از ژن ND 5/6 میتوکندری بررسی ساختار جمعیت تاسماهی روسی در نواحی شرقی و غربی جنوب دریای خزر انجام داد و موفق شد اختلاف معنی داری از تمایز جمعیت های جنوب شرقی و غربی دریای خزر (آبهای ایرانی) گزارش نماید.

• عطایی و همکاران (۱۳۸۲) بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت های تاسماهی ایرانی در رودخانه سفیدرود و جنوب شرقی دریای خزر تحقیقی را با استفاده از ژن ناحیه D-Loop میتوکندری انجام داد و نتایج بررسی و تمایز جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود از نواحی جنوب شرقی دریای خزر را نشان داد.

- پورکاظمی (۱۳۸۳) با استفاده از روش مایکروستلایت و با استفاده از ۴ جفت پرایمر جدا سازی شده از گونه تاسماهی سفید (*A. transmontanus*) مورد تحقیق قرار داد و نتیجه گیری نمود که روش مایکروستلایت از قابلیت بالایی برای آشکار ساختن میزان تنوع ژنی دارد و براساس درخت فیلوژنی UPGMA سه گروه از تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر با منشاء ژنتیکی متفاوتی وجود دارد که شامل تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود با منشاء ژنتیکی مستقل و از لحاظ تست هتروژنی اختلاف معنی داری با سایر مناطق دارد.
- پورکاظمی (۱۳۸۶) با استفاده از پرایمر مایکروستلایت مطالعات جامع ساختار ژنتیکی تاسماهی ایرانی در کل دریای خزر انجام داد و موفق به تمایز جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود از سایر مناطق جنوبی دریای خزر گردید. ولی شناسایی دو گونه خاویار تاسماهی ایرانی و روسی به روش مایکروستلایت میسر نشده است.
- خوش خلق (۱۳۸۵) مطالعات ساختار جمعیت تاسماهی روسی در شمال خزر (ولگا و اورال) و جنوب خزر و همچنین ساختار جمعیت تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی خزر را با استفاده از جفت پرایمر انجام داد و نتایج آن مبین است که در مورد تاسماهی روسی اختلاف معنی داری بین نمونه‌های ولگا و اورال بدست نیامد ($P \geq 0/01$)، اما اختلاف معنی داری بین نمونه‌های خزر جنوبی با نمونه‌های ولگا و اورال وجود دارد ($P \leq 0/01$) و از لحاظ درخت فیلوژنی نمونه‌های ولگا در یک کلاستر و سایر نمونه‌ها در کلاستر مجزا قرار دارند. با توجه به نتایج حاصله، سه جمعیت مستقل تاسماهی روسی در دریای خزر شامل: جمعیت خزر شمالی (رودخانه ولگا)، جمعیت رودخانه اورال، جمعیت خزر جنوبی شناسایی شد.
- براساس معیارهای ژنتیکی مشخص گردید که نمونه‌های تاسماهی ایرانی جمع آوری شده از سفیدرود در یک کلاستر و سایر نمونه‌ها در کلاستر مجزا قرار دارند و براساس سایر معیارها، نمونه‌های ترکمنستان در یک کلاستر و سایر نمونه‌ها در کلاستر مجزا قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اعلام نمود که در دریای خزر سه جمعیت مستقل تاسماهی ایرانی شامل: جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود، جمعیت تاسماهی ایرانی منطقه ترکمنستان، جمعیت تاسماهی ایرانی ناحیه ۳ شیلاتی (که نیازمند مطالعه آتی در مورد منشاء ژنتیکی آن می‌باشد) وجود دارد.
- علاوه بر دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی مطالعات ژنتیک مولکولی در خصوص شناسایی جمعیت‌های ماهی شیب به روش PCR-RFLP توسط قاسمی و همکاران (۱۳۸۴) و روش مایکروستلایت (صفری ۱۳۸۵)، ازون‌برون شمال و جنوب خزر با استفاده از مقایسه نرماتیوهای تکثیر و همچنین ژنهای ND5/6 و D-loop (شعبانی و همکاران ۱۳۸۴)، ساختار ژنتیکی ماهی ازون‌برون دریای خزر با استفاده از مایکروستلایت توسط (نوروزی ۱۳۸۶) انجام شده و نتایج آن حاکی از جمعیت مختلف و متمایز رودخانه‌های سفیدرود، ولگا، اورال می‌باشد.

• مطالعاتی دیگر برای تمایز جنسیت‌ها از جمله در گونه فیله‌ماهی با استفاده از ۱۱۰ پرایمر به روش RAPD (Keyvanshokoh et al., 2007) انجام گرفت که مارکری برای تمایز جنسیت شناسایی نشد. پورسیفی (۱۳۸۵) با استفاده از روش AFLP موفق شد که با سه ترکیب پرایمری ۷ بانده پلیمورف که اختلاف بین جنس نر و ماده را نشان دهند گزارش نماید که میتواند بعنوان مارکر جنسیت شناسایی نر و ماده در گونه ازون برون معرفی گردد.

اهداف

اهداف این تحقیق عبارتند از:

- شناسایی نشانگر مولکولی (DNA) اختصاصی جهت شناسایی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی
- اثبات مولکولی تمایز گونه تاسماهی ایرانی بعنوان یک گونه مستقل از تاسماهی روسی

ضرورت و اهمیت تحقیق

طبق مستندات علمی موجود محققین روسی اولین کسانی بودند که در دهه ۱۹۷۰ موفق به شناسایی تاسماهی ایرانی بعنوان یک گونه مستقل از تاسماهی روسی شدند. با کاهش ذخایر تاسماهیان دریای خزر در سالهای ۱۹۹۰-۱۹۹۵ و الحاق تمامی گونه‌ها به ضمایم کنوانسیون سایتس (۱۹۹۸) و سهمیه بندی توافقی کشورهای بهره برداری کننده از ذخایر مشترک دریای خزر (۲۰۰۰) از یکطرف و برخورداری از انحصار صید، صادرات و تجارت خاویار تاسماهی ایرانی توسط جمهوری اسلامی ایران از طرف دیگر سبب شد تا موضوع علم سیستماتیک در خصوص این دو گونه یک امر سیاسی تلقی شود و محققین روسی با چاپ مقالات از طرق مختلف صراحتاً زیر گونه بودن تاسماهی ایرانی را اعلام میکنند. لذا ضرورت دارد بدور از فشارهای سیاسی استقلال یا عدم استقلال گونه ای تاسماهی ایرانی با روش‌های علمی و قابل قبول مجامع بین‌المللی مورد بررسی قرار گیرد. علیرغم مطالعات متعدد انجام شده، متأسفانه تاکنون مارکر مولکولی (مبتنی بر DNA) جهت تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی در عرصه ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی شناسایی و معرفی نشده است.

براساس تبلیغات سوء انجام شده از سوی رئیس قبلی گروه تخصصی ماهیان خاویاری مبنی بر اینکه تاکنون هیچ مارکر مولکولی برای تفکیک دو گونه مزبور یافت نشده و ضمن ارسال دیدگاه‌های خود به مجامع بین‌المللی اعلام نموده که تاسماهی ایرانی بعنوان یک گونه مستقل نمی‌باشد بلکه زیرگونه تاسماهی روسی است. لذا کنوانسیون CITES نباید سهمیه صید و صادرات اختصاصی گونه تاسماهی ایرانی را به ایران بدهد. با توجه به موارد فوق در صورت عدم دستیابی به مارکر مولکولی فوق، احتمال می‌رود صادرات خاویار تاسماهی ایرانی در آینده با بحران مواجه شود.

از بین ۲۷ گونه انواع تاسماهیان تنها یک گونه به نام ایران و پرشیا (*Acipenser persicus*) است و حفظ استقلال این گونه که نام کشور عزیزمان را در نام علمی خود به همراه دارد میتواند نشان از اهمیت ماهیان خاویاری در تاریخ، فرهنگ و جغرافیای این مرز و بوم باشد و ضرورت دارد با بهره گیری از روشهای علمی نوین استقلال تاکسونومی این گونه اثبات گردد.

۳- مواد و روش کار

در این تحقیق روش مربوط به جمع آوری نمونه ها، استخراج DNA، الکتروفورز و رنگ آمیزی DNA و محصول PCR که در تمام آزمایشات یکسان بود فقط یکبار (برای پرهیز از تکرار مطالب) ارائه میشود ولی سایر روشها بصورت اختصاصی توضیح داده خواهد شد.

۳-۱- روش نمونه برداری

تعداد ۲۰ نمونه باله دمی از تاسماهی ایرانی بالغ (منشاء رودخانه سفید رود) و ۲۰ نمونه باله دمی از تاسماهی روسی (منشاء از رودخانه ولگا) جمع آوری و بر حسب تعداد مورد نیاز در هر آزمایش از آنها استفاده گردید. جهت استخراج DNA، حدود ۲ گرم از بافت نرم باله از بخش انتهایی باله دمی را جدا و در الکل ۹۶٪ فیکس گردید و جهت انجام آزمایشات بعدی به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان منتقل گردید.

استخراج DNA کل

در این تحقیق از دور روش برای استخراج DNA استفاده گردید:

الف: استخراج DNA بروش فنل و کلروفورم: برای استخراج DNA از روش فنل کلروفورم (Hillis & Moritz, 1990) که توسط (Pourkazemi, 1996) جهت ماهیان خاویاری تعدیل گردیده استفاده شد (ضمیمه شماره ۱).

مراحل استخراج:

۵۰۰-۱۰۰ میلی گرم بافت باله در یک ویال ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده شد.

۶۰۰ میکرولیتر بافر STE، ۲۰-۳۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪، ۱۰-۵ میکرولیتر پروتیناز K (۲۰ mg/ml) به نمونه بافت داخل ویال اضافه گردید و بافت با استفاده از قیچی به صورت قطعات کوچک خرد گردید.

فعالیت اپتیمم پروتیناز K قلیایی و در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد می باشد بدین منظور ویال ها را در ترمومیکسر با دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و شیکر ۱۰ دور قرار داده تا بافت به طور کامل لیز شده و به صورت امولسیون غلیظ درآید.

میزان ۳۰۰µl فنل و ۳۰۰µl کلروفورم به نمونه اضافه کرده و یک دقیقه شیکر کرده و سپس در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید.

به آرامی فاز بالایی را جدا کرده و در ویال جدیدی ریخته محلول فنل، کلروفورم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ اضافه گردید دوباره مراحل شیکر، سانتریفوژ و جداسازی فاز بالایی طبق مراحل بالا انجام شد.

محلول را جدا کرده و به میزان ۵۰۰µl کلروفرم و ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۲۴ اضافه کرده، مراحل شیکر، سانتریفوژ و جداسازی فاز بالایی تکرار گردید.

محلول روئی را جدا کرده و در این مرحله برای رسوب DNA به اندازه دو برابر حجم داخل ویال الکل اتانول سرد اضافه شد و به آرامی ویال ها سرو ته شده تا کلاف DNA ظاهر شود. جهت رسوب دادن DNA و جداسازی آن از الکل از سانتریفوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه استفاده شد.

فاز بالایی به آرامی تخلیه شده، مجدداً رسوب با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و مطابق بالا سانتریفوژ شد. فاز بالایی را تخلیه کرده و به منظور خشک شدن علامت DNA ویال ها به مدت یک ساعت وارونه به روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار داده شد.

پس از خشک شدن DNA مقدار ۱۰۰µl آب مقطر دو بار تقطیر به DNA اضافه گردید. جهت حل شدن به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت به دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل شد تا به طور کامل حل شود پس از آن جهت نگهداری طولانی مدت نمونه ها به فریزر -۲۰ منتقل گردید.

ب: استخراج DNA به روش استات آمونیوم

روش کار بر اساس متد salting out که طبق مراحل ذیل انجام گردید:

۱- مقدار ۱۰۰ - ۵۰ میلی گرم از قسمت نرم باله دمی را برداشته و پس از تمیز نمودن روی کاغذ صافی داخل ویال های ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده شد.

۲- مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافر STE به همراه ۳۰ - ۲۰ میکرولیتر محلول SDS ۲۰٪ اضافه گردید.

۳- پس از خرد کردن باله توسط قیچی نوک تیز مقدار ۱۰ - ۳ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) اضافه شد. مقدار پروتئیناز K بر اساس بافت مورد نظر را می توان افزایش یا کاهش داد. این ماده باعث هضم پروتئین ها می گردد.

۴- ویال ها داخل دستگاه ترمومیکسرها درجه حرارت ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ - ۳ ساعت یا یک شبانه روز قرار داده شد تا بافت بطور کامل هضم گردد و بصورت امولسیون غلیظ درآید.

۵- ۶۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۷/۵ مولار اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۶- فاز بالایی به دقت جدا شده و وارد تیوپ ۱/۵ ml استریل دیگر گردید.

۸- در این مرحله جهت رسوب DNA به میزان دو برابر حجم مایع داخل تیوپ، ایزوپروپانول سرد یا اتانول مطلق سرد اضافه شد و به آرامی تیوپ ها چندین بار سر و ته گردید تا کلاف DNA ظاهر گشت (در پاره ای اوقات این کلاف دیده نمی شود که این امر مبنی بر عدم وجود DNA نمی باشد).

۹- سپس ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۱۰ - محلول رویی دور ریخته شد و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه گردید. این کار سبب شستشوی پلت DNA شده و باعث می گردد تا نمک های موجود در آن جذب آب گردند.

۱۱- ۵-۳ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۱۲- محلول رویی دور ریخته شد و جهت خشک کردن پلت DNA تیوپ ها بصورت وارونه روی کاغذ صافی قرار داده شد.

۲۰- پس از خشک شدن، مقدار ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل جهت حل شدن DNA اضافه شد و مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس جهت نگهداری طولانی مدت تیوپ های حاوی DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

یکی از مراحل بسیار مهم و حساس قبل از انجام آزمایش PCR، شناخت کافی از کمیت و کیفیت DNA استخراج شد می باشد. برای این منظور کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز تعیین گردید. در این بررسی از روشهای فوق استفاده گردید که جزئیات آن در ضمائم ارائه شده است.

در بسیاری از حالت ممکن DNA به مقدار زیادی استخراج گردد و دستگاه اسپکتروفتومتری مقادیر بالایی از آن را نشان دهد ولی ممکن است DNA بنابه دلایل مختلف از جمله روش نمونه برداری، نحوه نگهداری، حمل و ذخیره سازی، تخریب و یا شکسته شده باشد. جهت آگاهی از کیفیت آن ضروری است از طریق الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ دقیقاً بررسی شود.

۲-۳- مواد مورد استفاده در ساخت ژل پلی آکریل آمید :

مواد مورد استفاده در ساخت ژل پلی آکریل آمید به شرح ذیل می باشد (Pourkazemi, 1996):

جهت ساخت ژل پلی آکریل آمید ۴۰٪ مقدار ۹/۵ گرم آکریل آمید و ۰/۵ گرم بیس آکریل آمید با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده می شود و پس از ساخت در دمای ۴۰°C قرار داده شد.

برای تهیه اوره آکریل آمید ۴۴ گرم اوره را با ۲۵ میلی لیتر آکریل آمید ۴۰٪ و ۲۰ میلی لیتر TBE 5X مخلوط کرده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود.

برای تهیه رنگ فراماید (Formamide dye)، ۵۰ میلی لیتر از فراماید را با ۰.۰۵ گرم از بروموفنل بلو و ۰.۰۵ گرم از زایلن سیانل و ۱ میلی لیتر از EDTA نیم مولار pH=8 مخلوط کرده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

نحوه تهیه بافرهای رنگ آمیزی

بافر A (بافر اسید استیک ۵٪ و اتانول ۱۰٪)، بافر B (بافر نیترات نقره): برای ساخت بافر B، مقدار ۳ گرم نیترات نقره در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. برای ساخت بافر C، ابتدا ۱۵ گرم NaOH را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۴ میلی لیتر فرمالدهید به محلول اضافه شد. برای رنگ آمیزی، به مدت ۱۰ دقیقه ژلها را در بافر A قرار داده سپس بافر A را تخلیه کرده و ۵ دقیقه در بافر B قرار داده و سپس ژل را دو بار در آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده، سرانجام ژل در بافر C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا باندها ظاهر شوند. با استفاده از دستگاه اسکنر عکسبرداری از ژلها انجام شده و در کامپیوتر برای اسکریپهای بعدی ذخیره سازی میشود.

در این تحقیق چندین روش مختلف برای تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بکار گرفته شد که در ذیل جزئیات هر روش ارائه میشود:

۱- ژن ستوکروم ب میتوکندری (mtDNA- Cyt. b)

جمع آوری نمونه: در این مطالعه جهت بررسی تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی مقدار ۲ سانتی متر از باله دمی ۱۵ نمونه تاسماهی ایرانی صید شده از رودخانه سفیدرود و ۱۵ عدد تاسماهی روسی صید شده از رودخانه اورال برش کرده و در الکل ۹۶٪ فیکس شده و به آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر انتقال داده شد و DNA آن به روش استات آمونیوم استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز ژل آگارز اندازه گیری شد.

برای تعیین کمیت DNA نمونه ها از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل 1000ND در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. پس از کالیبره کردن دستگاه با آب مقطر، پس از هموژن کردن نمونه ها، ۱/۵ میکرولیتر از DNA ژنومی را روی سل پایین ریخته، سل بالا بروی سل پائین قرار داده شد و غلظت آن ثبت گردید. سپس دوباره سل بالا و پایین را با آب مقطر پاک کرده و این کار را برای اجتناب از خطا ۳ بار تکرار گردید. میانگین اعداد بدست آمده را به عنوان غلظت DNA استخراج شده محاسبه گردید.

در ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ (بر حسب اندازه DNA) الکتروفورز گردید. برای انجام واکنش PCR ژن سیتوکروم b یک جفت پرایمر اختصاصی ناحیه tRNA مجاور ژن سیتوکروم b با استفاده از نرم افزار generunner و Oligo طراحی و سنتز شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده بشرح ذیل بود.

Forward: 5'CTTAGACATCAAAGCACCGG3'
Reverse: 5'CTTAGACATCAAAGCACCGG3'

بمنظور انجام PCR از ویالهای ۰/۲ استریل شده، به همراه سایر مواد مصرفی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در شرایط کاملاً استریل در زیر هود لامینار و روی یخ آماده سازی شد. غلظت و مقدار مواد مصرفی برای هر واکنش PCR در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵. غلظت مواد مصرفی در مرحله PCR

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA	۱۰۰ نانوگرم	≤1 μg
آنزیم تک DNA پلیمرز	۵U/μ	۰/۴ میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۱ میکرولیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	۲ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۵ میکرولیتر
پرایمر ۱	۲۰ پیکومول	۲ میکرولیتر
پرایمر ۲	۲۰ پیکومول	۲ میکرولیتر
اب مقطر	—————	تا ۵۰ میکرولیتر

ویالها را بمدت چند ثانیه سانتیفریوژ کرده تا کاملاً محتویات آن همگن گردد. سپس ویالها را در دستگاه مولد چرخه حرارتی (Thermo cycler) طبق برنامه داده شده به دستگاه انکوبه گردید (جدول ۶).

جدول ۶. چرخه های حرارتی مرحله PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتیگراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشته سازی	۹۴	۰/۵	۳۵
الحاق	۶۵-۵۸	۰/۵	
بسط	۷۲	۱/۵	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

پس از واکنش زنجیره ای پلیمرز، نمونه ها بر روی ژل آگاروز برده شد. نمونه هایی که باندهای قوی داشته و فاقد آلودگی بودند جهت توالی یابی انتخاب شد. نمونه های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی جهت توالی یابی به شرکت فزایژوه فرستاده شدند. پس از اطمینان از محصول PCR بخشی از آن جهت انجام قطع آنزیمی آزمایشات RFLP استفاده شد. برای این منظور ۳ میکرولیتر از محصول PCR با آنزیم های قطع کننده *ACC I*، *Aae*

II که دارای جایگاه برشی برای تفاوت گونه ای بوده و از توالی ژنهای توالی یابی شده تعیین شده بود، استفاده گردید.

Align کردن داده ها و توالی ها با برنامه Clustalw انجام شد. و سپس آنالیز فیلوژنی داده ها با برنامه Mega انجام پذیرفت. جهت ثبت تصاویر ژلها از دستگاه مستند سازی ژل (Gel documentation) ساخت شرکت Vilberlourmant همراه با برنامه نرم افزاری Biocape تهیه گردید.

۳-۳- روش ریزماهواره یا میکروستلایت جمع آوری نمونه

تعداد پنج نمونه از هر یک از گونه های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی موجود در انستیتو انتخاب و مقدار دو سانتیمتر مربع از باله دمی قطع کرده و در الکل % 96 فیکس نموده و به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو انتقال داده شد. DNA کلیه نمونه ها به روش فنل کلروفوم Hillis & Moritz, 1990 که توسط Pourkazemi 1996 برای ماهیان خاویاری تعدیل گردیده استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری (نانودراپ مدل 1000) و الکترو فورز تعیین گردید.

تهیه پرایمرهای میکروستلایت

پس از بررسی مطالعات انجام شده بر روی گونه های تاسماهیان با روش میکروستلایت و مشاهده الگوی باندهای آنها در مطالعات مختلف تعداد ۳۰ جفت پرایمر میکروستلایت انتخاب و اقدام به سفارش خرید گردید. توالی و شماره دستیابی آنها در جدول ۷ ارائه شده است.

جدول ۷- لوکوس، شماره دستیابی در بانک ژن، موتیف تکراری، توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه توالی در آزمایش PCR. اقتباس از (Welsh et al., 2003) Afug (McQuown et al., 2000) Spl

No	Locus	Gene bank accession number	Repeat motif	Primer sequence(5'-3')	Sequenced clone size (bp)
۱	AfuG-9	AF529447	(GATA)14(GA)2G ATA(GA)2(GATA) 6	F: CATAATGTAAAGCAAAAGT R: ACCTGAAATGTATGTTATG	152
۲	AfuG-56	AF529472	(AAAC)9	F: ACTAAACCCAGCACAGAAAATCA G R: GAAGCCCATCCCACAGGTT	266
۳	AfuG-63	AF529475	(AAAC)8	F: ACTAAACCCAGCACAGAAAATCA G R: CTTTTAAATGGGGGACAGACTAT	139
۴	AfuG-66	AF529478	(AAAC)7	F: GGCAGCAACTTTACCAA R: GAGATATCTGCGTTCGTT	306
۵	AfuG-67	AF529479	(AAAC)7	F: CAAAGCTAGAACAAGTAAAGAGA A R: GGGGTGTCTATAATAAAAGTGC	288
۶	AfuG-68	AF529480	(AAAC)6	F: AATGGCTTATCTTTTATCTTGACT R: AGCTTTTCTGGACTGTGTATGTT	210
۷	AfuG-74	AF529483	(AAAC)6	F: CTACAAAGACGGGTTACG R: AGCGACTGTCTGGTTTTTC	226
۸	AfuG-95	AF529491	(CATC)6	F: CAGCAGAGTCTCCAGCCTTCAC R: CACAACCGTAACCTAGCAACACTG	229
۹	AfuG-110	AF529498	(GATA)21	F: ACCCGATGCTAACTTTGTAAT R: CACTTTTTGGCTGTAGACTTTTT	319
۱۰	AfuG-112	AF529499	(GATA)12GACA(GATA)6	F: TATTGTTCCCTTTATGGTTATG R: TATTTCACTGTCTGTTGTATGTA	260
۱۱	AfuG-119	AF529501	(AGAT)14	F-TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R-AGCCCAACACAGACAATATC	160
۱۲	AfuG-122	AF529503	(GATA)13	F: AACACGACAACAACTTATTCA R: TGTGTTTCTATGTCTGTCTGTCTA	175
۱۳	AfuG-135	AF529514	(GATA)7	F: GCCAATTCCTGAAATATACCAG R: CGAAACCGCTTCAGACCTT	183
۱۴	AfuG-160	AF529526	(AAAC)8	F: CCGCAGCATTAGGTCAAA R: CCCAGTGGAATAATAATGTA	135
۱۵	AfuG-175	AF529536	(AAAC)5	F: CCATAATTCAAAGAACAGATTAA R: TGGGCAATACTTTTGTC	199
۱۶	AfuG-195	AF529548	(AAAC)7	F: ATTCTCCAGCCGTATTATTA R: AAGCAGTTAGTTTATGTGGTTGTG	165
۱۷	AfuG-204	AF529551	(AAAC)5	F: TGACCAGGCACCGTAACTTTG R: TAATGTGCGCCGGCTCTGGTCTA	141
۱۸	AfuG-229	AF529559	(CA)14	F: AGAGAATGCGGAGAATGAGGAC R:	320

				GCACAGATACACGCAGACAAACA	
۱۹	AfuG-241	AF529566	(CA)13	F: CAGAACATGCCGGGTGAGTA R: ATCCAGGGCTTGTCTTGTATTTTA	243
۲۰	Aox-27	Ao529483	(ATTT)5(ATTC)(ATTT)3	F: AATAACAATAACGGCAGAACCT R: TGTGTTGCTCAAGACAGTATGA	130-138
۲۱	Ls-68	U72739	(GATA)13	F-TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R-AGCCCAACACAGACAATATC	140-170
۲۲	Ls-62	U72738	(GACA)7	F-ATCTGAATTGANTTCGTG R-TTCGATACTGTGTCCAAC	80-100
۲۳	Spl-104	AF276173	(TCTR)12	F-TTATATGGGTGGGGTGGATG R-TCCTCTTTGGCATTGTTC	270
۲۴	Spl-105	AF276174	(TAGA)12	F-GCGATTTGATTGGCTCTTGT R-GGCACCTGAATAAATGGACCG	136
۲۵	Spl-113	AF276182	(AGAT)14	F-TCCCACATGGCTTGTATTGA R-ACCACACCATGCGTCATAAG	284
۲۶	Spl-120	AF276189	(TATC)15	F-ATTCCATGAGCAACACCACA R-TGATGGTCTGATGAGATCGG	285
۲۷	Spl-163	AF276205	(GATA)17	F-TGCTTGTAACCTGCCCACT R-CCACATGCAGTTTGAGCTGC	208
۲۸	Spl-168	AF276210	(TATC)18	F-CACTGATTCGCTACAACCGT R-AGAAGGACTTGCAGTCCGAA	149
۲۹	Spl-170	AF276213	(GAT)5 (ATAG)11	F-GGACGCACTAGACAGGCTTT R-CACCAAACACAGCAGATTTCA	188
۳۰	Spl-173	AF276216	(TCTA)10	F-GGCTTTTGTCTGAAACGTCC R-TGGTGTGTCATTTTGAAGGC	219

تست PCR با استفاده از تمامی ۳۰ جفت پرایمر بر روی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی انجام شد. پس از تغییر شرایط PCR، بهترین شرایط از نظر غلظت مواد و برنامه دمایی ترمال سایکلر بنحویکه حداقل باند PCR اضافی را دارا باشد تعیین گردید. واکنش زنجیره ای پلیمرز با غلظت ذیل و طبق روش بیان شده در بالا انجام شد:

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۰ میکرولیتری
DNA	۵۰ ng	۵۰ μg
آنزیم تک پلیمرز	u / μ۵	۰/۱۵ میکرولیتر
DNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۴ میکرولیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	۰/۷ میکرولیتر
PCR buffer	10X	۲ میکرو لیتر
پرایمر ۱	۱۰ پیکو مول متغیر	میکرو لیتر ۱
پرایمر ۲	۱۰ پیکو مول متغیر	میکرو لیتر ۱
آب مقطر	-----	تا ۲۰ میکرو لیتر

برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید. در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف اسمیر غلظت $MgCl_2$ بهینه سازی گردید. از مقادیر ۱ تا ۲/۵ میلی لیتر تغییر داده شد تا باندهای ایجاد شده بدون اسمیر گردد و برای وضوح بهتر باندها مقدار پرایمر تغییر داده شد (جدول ۸). پس از اتمام کار نمونه ها به یخچال منتقل گردید.

جدول ۸- برنامه اجرا شده PCR در این تحقیق

مراحل	درجه حرارت (سانتیگراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳	۱
واسرشته سازی	۹۴	۰/۵	۲۰-۳۵
الحاق	۵۷-۶۴	۰/۵	
بسط	۷۲	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

تهیه ژل پلی اکریلامید و ساخت بافر های مربوطه، نحوه رنگ آمیزی آن طبق روش های اشاره شده قبلی اجرا گردید.

تهیه پرایمر سیتو کروم b

با استفاده از توالی سیتو کروم b تاسماهی روسی ثبت شده (بشماره AJ563385 در بانک ژن NCBI) با استفاده از نرم افزار GeneRuner و نرم افزار oligo، پرایمرها طراحی و سنتز شد، با سفارش و خرید این پرایمر، بر روی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی PCR انجام شد.

ژن	توالی	Oligo Number
Cyt b Forward	5`-AAACATCCGCAAAACACACCCACTA-3`	71205G1G01
Cyt b Reverse	5`-CAGAGGGGAGGGCGATTAGG-3`	71205E4C08

پس از واکنش زنجیره ای پلیمراز، نمونه ها بر روی ژل آگاروز برده شد. نمونه هایی جهت توالی یابی انتخاب شد که باندهای قوی داشتند و فاقد آلودگی بودند. داده ها را در ncbi، Blast کرده تا از صحت توالی های مورد نظر اطمینان حاصل شود. با انجام توالی یابی، داده های بدست آمده بصورت خام هستند. Align کردن داده ها با برنامه Clustalw انجام شد و در پایان آنالیز فیلوژنی داده ها با برنامه Mega انجام شد.

با استفاده از دستگاه مستند سازی ژل (Gel documentation) ساخت شرکت Vilber lourmant همراه با برنامه نرم-افزاری Biocape تصویر ژل های تهیه گردید. پس از اندازه گیری باندها با استفاده از نرم افزار Biogen الگوی باندهای هر نمونه، در مقایسه با مارکر بر روی کاغذ شطرنجی رسم و اندازه باندها به طور دقیق ثبت گردید. سپس باندهای حاصل در کل نمونه ها از اندازه کوچک به بزرگ شماره دهی شد. بدین ترتیب آلل های حاصل کدگذاری گردیدند. فراوانی اللی (Allele frequency)، تعدادالها و تعدادالهای موثر (Effective allele) در جایگاههای میکروساتلایتی، ماتریس شباهت (Genetic identity) و فاصله ژنتیکی (Genetic identity) براساس Nei, 1972 و تنوع ژنتیکی بر اساس تست AMOVA¹ در سطح احتمال ۰/۰۱ با استفاده از نرم افزار GeneAlex محاسبه گردید. آنالیز فیلوژنی شامل اختلاف تکاملی، درجه خویشاوندی و روابط فیلوژنی، درخت فیلوژنی با استفاده از روشهای UPGMA, Maximum parsimony و Neighbor-Joining با نرم افزار Mega ترسیم شد. در آنالیز داده ها از فیلمهای (*Huso huso*) به عنوان outgroup انتخاب گردید. تمامی آنالیزها با 1000 بار تکرار انجام شد.

۴-۳- روش AFLP

جمع آوری نمونه

در این مطالعه برای بررسی تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی مقدار ۲ سانتی متر مربع از باله دمی ۵ نمونه از هر کدام از دو گونه مذکور جمع آوری و در الکل ۹۶٪ فیکس و سپس به آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزرانتقال داده شد. DNA بروش استات آمونیوم استخراج و کمیت و کیفیت آن طبق روشهای ذکر شده در بالا مورد ارزیابی قرار گرفت.

آغازگرها

در این مطالعه دو جفت آنزیم برشی *EcoRI/MseI* و *TaqI/PstI* مورد استفاده قرار گرفت که متناسب با آنزیم های برشی آداپتورها و پرایمرهای AFLP مورد نیاز تهیه گردید.

توالی آداپتور PstI

Forward: 5' AGACGTGACGGCCGTCATGCA 3'

Reverse: 3' GCACTGCCGGCAGT5'

توالی آداپتور TaqI

Forward: 5' GACGATGAGTCCTGAG3'

Reverse: 3' TACTCAGGACTCCG5'

پرایمرهای PstI/TaqI

*PstI*0: 5' GACGGCCGTCATGCAG 3'

*TaqI*0: 5' GATGAGTCCTGAGCGA 3'

PstI +2 (AC, TC, TA, CT, GA)

PstI +3 (ACG)

TaqI +2 (AC, TA, TG, CT, CG, AG)

TaqI+3 (ACA, GTC)

توالی آداپتور MseI

Forward: 5'GACGATGAGTCCTGAG 3'

Reverse: 5' TACTCAGGACTCAT 3'

توالی آداپتور EcoRI

Forward: 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'

Reverse: 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'

توالی پرایمرهای EcoRI/MseI

EcoRI +1: 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'

MseI +1: 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'

EcoRI +3: (ACA, ATT, ACC, AAC, ACG, ATC, AAG)

MseI +4: (CACA, CGAT, CCTT, CATA, CATT, CGTC, CTGC, CCGT)

تعداد ۴۸ جفت پرایمر EcoRI/MseI و ۵۶ جفت پرایمر TaqI/PstI در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

جفت پرایمرهای TaqI/PstI مورد استفاده در این تحقیق

GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCAAC	۱
GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCATC	۲
GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCATA	۳
GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCACT	۴
GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCAGA	۵
GATGAGTCCTGAGCGAAC	GACGGCCGTCATGCAACG	۶
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCAAC	۷
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCATC	۸
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCATA	۹
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCACT	۱۰
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCAGA	۱۱
GATGAGTCCTGAGCGATA	GACGGCCGTCATGCAACG	۱۲
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCAAC	۱۳
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCATC	۱۴
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCATA	۱۵
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCACT	۱۶
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCAGA	۱۷
GATGAGTCCTGAGCGATG	GACGGCCGTCATGCAACG	۱۸

GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCAAC	۱۹
GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCATC	۲۰
GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCATA	۲۱
GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCACT	۲۲
GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCAGA	۲۳
GATGAGTCCTGAGCGACT	GACGGCCGTCATGCAACG	۲۴
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCAAC	۲۵
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCATC	۲۶
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCATA	۲۷
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCACT	۲۸
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCAGA	۲۹
GATGAGTCCTGAGCGACG	GACGGCCGTCATGCAACG	۳۰
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCAAC	۳۱
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCATC	۳۲
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCATA	۳۳
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCACT	۳۴
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCAGA	۳۵
GATGAGTCCTGAGCGAAG	GACGGCCGTCATGCAACG	۳۶
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCAAC	۳۷
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCATC	۳۸
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCATA	۳۹
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCACT	۴۰
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCAGA	۴۱
GATGAGTCCTGAGCGAACA	GACGGCCGTCATGCAACG	۴۲
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCAAC	۴۳
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCATC	۴۴
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCATA	۴۵
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCACT	۴۶
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCAGA	۴۷
GATGAGTCCTGAGCGAGTC	GACGGCCGTCATGCAACG	۴۸

جفت پرایمر EcoRI/MseI مورد استفاده

GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۱
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۲
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۳
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۴
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۵
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۶
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACTGC	۷
GACTGCGTACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۸
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۹
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۱۰
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۱۱
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۱۲
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۱۳
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۱۴
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACTGC	۱۵
GACTGCGTACCAATTCATT	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۱۶
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۱۷
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۱۸
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۱۹
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۲۰
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۲۱
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۲۲
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACTGC	۲۳
GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۲۴
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۲۵
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۲۶
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۲۷
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۲۸
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۲۹
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۳۰
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACTGC	۳۱
GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۳۲

GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۳۳
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۳۴
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۳۵
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۳۶
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۳۷
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۳۸
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAAGTGC	۳۹
GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۴۰
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACACA	۴۱
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACGAT	۴۲
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACCTT	۴۳
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACATA	۴۴
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACATT	۴۵
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACGTC	۴۶
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAAGTGC	۴۷
GACTGCGTACCAATTCATC	GATGAGTCCTGAGTAACCGT	۴۸
GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCCTGAGTAAGTGCCTGC	۴۹
GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCCTGAGTAACCGTCCGT	۵۰

آماده سازی آداپتورها

بمقدار EcoRI adaptor: 5mM Mse adaptor 50 mM TaqI adaptor 5mM PstI adaptor (50mM) برای آماده سازی

آداپتورها، نمونه ها طبق برنامه زیر انکوبه گردیدند:

65°C 5min
37°C 10min
25°C 10min

سپس به فریزر -۲۰ منتقل گردید.

هضم DNA با آنزیم های برشی

هضم DNA کل با دو جفت آنزیم برشی EcoRI/MseI و PstI/TaqI طبق پروتکل ذیل انجام شد.

DNA (100ng)	5 µl
آنزیم برشی (10 U/µl)	0.25 µl
Tango buffer (10X)	2 µl
آب	Up to 20 µl

مخلوط حاصل در دمای 37°C به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید و به فریزر ۲۰- منتقل شد.

اتصال آداپتورها به DNA هضم شده

EcoRI/MseI	
EcoRI adaptor (5mM)/ Pst adaptor (5mM)	0.5 µl
MseI adaptor (50mM)/ TaqI adaptor (50mM)	0.5µl
ATP (100mM)	1µl
Buffer T4 ligase	0.5 µl
T ₄ ligase	1µl
H ₂ O	Up to 5µl

سپس 5µl از مخلوط اتصال به DNA هضم شده اضافه کرده و ۳ ساعت در 37°C انکوبه گردید و سپس به فریزر ۲۰- منتقل گردید.

واکنش پیش تکثیر (Pre-amplification)

واکنش پیش تکثیر با پرایمرهای Taq0/PstII و EcoRI+1/MseI+1 طبق برنامه زیر گذاشته شد:

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۱۵ میکرولیتری
محصول هضم-اتصال	۵۰۰ نانو گرم (غلظت اولیه)	۵ میکرو لیتر
پلمیر از TaqDNATآنزیم	۵ ^U /µL	۰/۲ میکرو لیتر
dNTPs	میلی مولار 2/5	۱/۵ میکرو لیتر
Mgcl _۲	۵۰ میلی مولار	۱ میکرو لیتر
PCR Buffer	X ۱۰	۱/۵ میکرو لیتر
پرایمر	۱۰ پیکول	۰/۵ میکرو لیتر
آب مقطر	-	Up to 15µl

محتویات ویال با دستگاه Vortex خوب هم زده شد و بالها به مدت ۴ ثانیه با دور پایین (۴۰۰۰ rpm) سانتریفیوژ شده تا مواد داخل آن ته نشین گردد. نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در این بررسی برنامه حرارتی دستگاه PCR طبق جدول صفحه بعد تنظیم و استفاده گردید.

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳	۱
واسرشته سازی پهلوگیری پرایمرها	۹۴	۰/۵	۳۵
بسط ^۲	۶۰	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

واکنش تخصصی PCR

PCR اختصاصی با استفاده از محصول مرحله پیش تکثیر به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت محصول PCR مرحله قبل به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق سازی شد و به عنوان الگو طبق برنامه زیر مورد استفاده قرار گرفت.

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۱۵ میکرولیتری
Pre-amplification 1/10 dilution		۲ میکرو لیتر
پلمیر از Taq DNA آنزیم	$5 \mu\text{g} / \mu\text{L}$	۰/۲ میکرو لیتر
dNTPs	میلی مولار 2	۱/۵ میکرو لیتر
Mgcl ₂	۵۰ میلی مولار	۱ میکرو لیتر
PCR Buffer	X ۱۰	۱/۵ میکرو لیتر
پرایمر	۱۰ پیکول	۰/۵ میکرو لیتر
آب مقطر	-	Up to 15μl

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳	۱
واسرشته سازی پهلو گیری پرایمرها بسط	۹۴ Towchdown (۶۵) ۷۲	۰/۵ (-)۰/۷ ۰/۵	۱۳
واسرشته سازی پهلو گیری پرایمرها بسط	۹۴ ۵۶ ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۱	۳۰
بسط نهایی	۷۲	۵	

محصول PCR با ژل پلی آکرلامید الکتروفورز شد و سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد.

۱- روش ND5

از آنجائیکه کل ژنوم میتوکندری تاسماهی ایرانی و روسی توسط Rastorguev et al., 2008 توالی یابی شد و طبق بررسیهای انجام شده، ژن ND5 در تاسماهیان بیشترین تنوع ژنتیکی را دارا بوده و حتی بر خلاف سایر گونه ها میزان تنوع ژنتیکی آن از منطقه D-loop بیشتر است. بعبارت دیگر بعنوان ژن مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز دو گونه توسط نگارندگان معرفی گردید، لذا تصمیم گرفته شد تا این ژن در دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی از طریق آزمایشات RFLP و توالی یابی مورد مقایسه قرار گیرد. جهت آزمایشات RFLP، ابتدا توالی ژن ND5 بصورت اختصاصی بشرح ذیل تهیه گردید و طبق شرایط زیربا استفاده از دستگاه PCR تکثیر شد.

Forward: 5'- GCTCAACCCTCCTAATCATTT-3'
Reverse: 5'-AGTGTGATGGGAGGATTGA-3'

- DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم به میزان ۱ میکرولیتر، هریک از پرایمرها ۱ میکرولیتر

– dNTP با غلظت ۱۰ mM به میزان ۰/۵ میکرولیتر، MgCl₂ (با غلظت ۵۰ mM) به میزان یک میکرولیتر، بافر PCR (۱۰ X) به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq به میزان ۰/۲ میکرولیتر و در نهایت با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.
برنامه PCR برای تکثیر ژن ND5 به شرح ذیل اجرا گردید.

۹۴	oC		۵ min
۹۴	oC	۳۰ sec	× ۳۵ cycle
۵۱	oC	۳۰ sec	
۷۲	oC	۱/۵ min	
۷۲	oC		۱۰ min

طبق روشهای متداول و ذکر شده در بالا، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، کیفیت محصول و وضعیت باندها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت هضم آنزیمی ۳ میکرولیتر از محصول PCR با آنزیم های برشی Vsp I و Sfe I برش داده شد و سپس بر روی ژل پلی آکریلامید ۶٪ الکتروفورز و با نیترا نقره رنگ آمیزی گردید. جهت توالی یابی محصول PCR متعلق به ۵ نمونه تاسماهی ایرانی و ۵ نمونه تاسماهی روسی به خارج از کشور ارسال گردید. جهت آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی های محصول PCR از دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی از آنالیز و دندروگرام Maximimum Parsimony با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

۲- روش 16sDNA

بمنظور اطمینان کامل از کیفیت DNA، مجدداً از ۵ عدد تاسماهی ایرانی و ۵ عدد تاسماهی روسی نمونه برداری گردید و DNA آنها به روش فنل- کلروفرم استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. میزان جذب DNA در ۲۶۰nm تعیین شد. نمونه هایی که مناسب بودند برای واکنش PCR انتخاب شدند. توالی پرایمرها یونیورسال جهت واکنش زنجیرهای پلیمرز به شرح زیر انجام شد.

Forward 1: 5'-AGC GGA GGA AAA GAA ACT A 3'
Forward 2: 5' ACA AGT ACC DTR AGG GAA AGT TG 3'

Reveres 1: 5' TAC TAG AAG GTT CGA TTA GTC 3'
Reveres 2: 5' ACG ATC GAT TTG CAC GTC AG 3'
Reveres 3: 5' GTT AGA CTY CTT GGT CCG TG 3'

واکنش PCR با غلظت مواد و همچنین شرایط دمایی ذیل انجام شد.

DNA (100 ng)	2 µl	PCR buffer (10 x)	2.5 µl
Forward (10 pmol)	1 µl	Taq	1 unit
Reveres (10 pmol)	1 µl	H ₂ O	Up to 25 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl		
dNTP (10 mM)	0.5 µl		

94 °C	4 min	× 33 cycle
94 °C	30 s	
64 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	

جداسازی باند DNA از روی ژل

پس از انجام PCR، محصول آن بر روی ژل پلی آکریلامید ۶٪ الکتروفورز شد و سپس باند مورد نیاز با تیغک از روی ژل بریده و DNA آن جداسازی گردید. سپس برای گرفتن باند DNA قوی تر مجدداً PCR با استفاده DNA جداسازی شده از روی ژل صورت گرفت. محصول PCR مجدداً الکتروفورز شد. محصول PCR روی ژل آگارز برده شد و نمونه‌های خالص و بدون آلودگی برای توالی یابی به خارج از کشور ارسال شد. بعد از توالی یابی نمونه‌ها، نحوه چیدمان بازهای آلی در توالی بدست آمده با برنامه‌های Mega 4 و Clustalw2 مورد بررسی قرار گرفت سپس هضم آنزیمی با ۹ آنزیم *HpaII, SduI, NcoI, Sall, HinfI, BclI, HhaI, RsaI* و *Cfr13I* صورت گرفت و باندهای حاصله در دو گونه مورد مقایسه قرار گرفتند.

۳- روش RAPD

جمع آوری نمونه

۵۰ نمونه از تاسماهی ایرانی از ماهیان صید شده سال ۸۴ (ناحیه ۲)، ۸۷ و ۸۸ رودخانه سفید رود و ۵۰ نمونه از تاسماهی روسی به ترتیب شامل نمونه های روسی منطقه ولگا و گشت ارزیابی ذخایر انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و با همکاری کشتی های تحقیقاتی ایرانی (شناور سی سرا ۲ و کشتی گیلان) در منطقه ترکمنستان در سالهای ۸۱ و ۸۴ که در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان موجود بود استفاده گردید. مقدار ۲ سانتی متر مربع از باله دمی قطع کرده و در الکل ۹۶٪ فیکس شده و به آزمایشگاه

ژنتیک انستیتو انتقال و بروش فنل کلروفورم استخراج گردید (Pourkazemi, 1996). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز ژل آگارز اندازه گیری شد.

آغازگرها

بی تردید آغازگرها یکی از اساسی ترین عامل در موفقیت یا شکست یک واکنش PCR هستند. با استفاده از نرم افزار کامپیوتری Gneruner و Oligo طراحی آغازگرها انجام پذیرفت. تعداد ۱۰۱ پرایمر رپید انتخاب و اقدام به سفارش آنها گردید که توالی آنها به شرح زیر می باشد (جدول ۹). برنامه PCR هر ۱۰۱ پرایمر بر روی دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی انجام شد. پس از تغییر شرایط PCR بهترین شرایط بدست آمده از نظر غلظت مواد و شرایط برنامه ترمال سایکلر بدست آمد.

جدول ۹- توالی ۱۰۱ پرایمر مورد استفاده و درصد (C+G) هر یک از آنها

C+G(%)	توالی پرایمر (5'-3')	شماره پرایمرها	ردیف
60%	5'-AGC CGA AAG G-3'	1	1
80%	5'-CCC GGG TAC C-3'	2	2
60%	5'-CGC GCG ATA T-3'	3	3
50%	5'-TCG ATC GAT C-3'	4	4
60%	5'-AAA GGG TCC C-3'	5	5
40%	5'-TTT AAA GGC C-3'	6	6
50%	5'-CCA AGC TAC T-3'	7	7
50%	5'-CTG ACT GCT A-3'	8	8
40%	5'-CGT TGC TTA A-3'	9	9
60%	5'-AGG TCA GGT C-3'	10	10
60%	5'-CGA CTC GAT C-3'	11	11
30%	5'-CAA AGT TTC A-3'	12	12
40%	5'-CTT TCA TCT C-3'	13	13
60%	5'-TGC AAC GTG G-3'	14	14
60%	5'-GCC TTA AGG C-3'	15	15
60%	5'-AGA GAG CAG C-3'	16	16
100%	5'-CGC GCG CGC G-3'	17	17
60%	5'-CGA AGC AGC T-3'	18	18
50%	5'-GGC TGA AGA A-3'	19	19
60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	20	20
20%	5'-ACT AAG TTT T-3'	21	21
50%	5'-GTA CGC ATG T-3'	22	22
40%	5'-ATT CCG GAA T-3'	23	23
60%	5'-CTA GGT CGG A-3'	24	24
70%	5'-GCC CCT ATG C-3'	25	25
50%	5'-AAC TGG ACT G-3'	26	26
60%	5'-CAA TGC CGG A-3'	27	27
60%	5'-CTC TGG AGA C-3'	28	28
60%	5'-GGG ATA TCG G-3'	29	29
60%	5'-GGA GTA CTG G-3'	30	30
70%	5'-TGC GGC TGA G-3'	31	31
60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	32	32
60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	33	33
60%	5'-TCT GGT GAG G-3'	34	34
60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	35	35
60%	5'-GGT CTA CAC C-3'	36	36
60%	5'-TTA TGG CCC C-3'	37	37
60%	5'-TGC GGC TGA G-3'	38	38
60%	5'-ACG CAC AAC C-3'	39	39
40%	5'-GTC TAT GTC T-3'	40	40
50%	5'-TAG GCA GGT T-3'	41	41
60%	5'-ACG ACA CGA C-3'	42	42
50%	5'-GGT CAA TCG A-3'	44	43

C+G(%)	توالی پرایمر (5'-3')	شماره پرایمرها	ردیف
60%	5'-ACG ACC GAC A-3'	45	44
40%	5'-ATG AAC CAT G-3'	46	45
70%	5'-GAG GGG GAC T-3'	48	46
50%	5'-TAC CAT TCG G-3'	49	47
50%	5'-ATG TGT ACC C-3'	50	48
50%	5'-TGG TGA AGC T-3'	52	49
50%	5'-GTA CCT ACC T-3'	55	50
70%	5'-CAT CCC CCT G-3'	B-03	51
70%	5'-TGC TCT GCC C-3'	B-06	52
70%	5'-GGT GAC GCA G-3'	B-07	53
60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	A-10	54
70%	5'-GGA AGT CGC C-3'	H-04	55
70%	5'-AGT CGT CCC C-3'	H-05	56
60%	5'-CTG CAT CGT G-3'	H-07	57
70%	5'-CCC AAG GTC C-3'	E-01	58
60%	5'-AGA TGC AGC C-3'	E-07	59
60%	5'-GAA CCC AAC C-3'	D-02	60
70%	5'-GTC GCC GTC A-3'	D-03	61
70%	5'-TTG GCA CGG G-3'	D-07	62
70%	5'-GGG GGA TGA G-3'	M-03	63
60%	5'-GTC CAC TGT G-3'	M-11	64
70%	5'-GGG ACG TTG G-3'	M-12	65
60%	5'-CTC ACG TTG G-3'	N-01	66
60%	5'-ACA ACT GGG G-3'	N-10	67
60%	5'-CAT TGG GGA G-3'	N-17	68
60%	5'-GTC CGT ACT G-3'	N-19	69
60%	5'-AGC GAG CAA G-3'	K-07	70
60%	5'-GAA ACG GGT G-3'	KEYVA N-30	71
60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	KEYVA N-31	72
70%	5'-TCC GCT CTG G-3'	KEYVA N-33	73
70%	5'-CCC GAT TCG G-3'	KEYVA N-36	74
60%	5'-CTG ACG TCA C-3'	KEYVA N-37	75
60%	5'-CTC TCC GCC A-3'	KEYVA N-38	76
70%	5'-GTC ACC AGC C-3'	KEYVA N-39	77
70%	5'-CGC GCG ATA C-3'	CINAGE N-1	78
50%	5'-CTG ACT GCT A-3'	CINAGE N-2	79
60%	5'-AGG TCA GGT C-3'	CINAGE N-3	80
60%	5'-CGA CTC GAT C-3'	CINAGE N-4	81
30%	5'-CAA AGT TTC A-3'	CINAGE N-5	82
40%	5'-GTT TCA TCT C-3'	CINAGE N-6	83

C+G(%)	توالی پرایمر (5'-3')	شماره پرایمرها	ردیف
60%	5'-GCC TTA AGG C-3'	CINAGE N-7	84
60%	5'-AGA GAG CAG C-3'	CINAGE N-8	85
60%	5'-GGA GTA CTG G-3'	CINAGE N-9	86
60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	CINAGE N-10	87
50%	5'-TGG TGA AGC T-3'	CINAGE N-11	88
100%	5'-GCC CGC CCG G-3'	CINAGE N-12	89
54%	5'-GGA GTA CTG GA-3'	11bp-7	90
54%	5'-GGA GTA CTG GT-3'	11bp-8	91
63%	5'-GGA GTA CTG GC-3'	11bp-9	92
63%	5'-GGA GTA CTG GG-3'	11bp-10	93
54%	5'-AGC CGA AAG GA-3'	11bp-12	94
54%	5'-AGC CGA AAG GT-3'	11bp-13	95
63%	5'-AGC CGA AAG GC-3'	11bp-14	96
63%	5'-AGC CGA AAG GG-3'	11bp-15	97
54%	5'-GCC TTA AGG CA-3'	11bp-17	98
54%	5'-GCC TTA AGG CT-3'	11bp-18	99
63%	5'-GCC TTA AGG CC-3'	11bp-19	100
63%	5'-GCC TTA AGG CG-3'	11bp-20	101

واکنش زنجیره ای پلیمر از (PCR):

به منظور تکثیر دی ان ای از آنزیم Taq DNA پلیمراز (سیناژن)، ۵۰ mM Mgcl_۲ (سیناژن)، PCR Buffer در غلظت ۱۰x (سیناژن)، ۱۰ mM dNTP Mix (Fermentase)، آب مقطر دوبار تقطیر، DNA استخراج شده و پرایمرهای RAPD (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- مواد و غلظت مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز RAPD را نشان می دهد.

مواد	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA ژنومی	۵۰ نانو گرم	۳ میکرو لیتر
آنزیم Taq DNA پلمیراز	۵ μ /μL	۰/۲ میکرو لیتر
DNTP	۱۰ میلی مولار	۰/۷ میکرو لیتر
Mgcl _۲	۵۰ میلی مولار	۱ میکرو لیتر
PCR Buffer	۱۰ X	۲/۵ میکرو لیتر
پرایمر	۲۰ پیکول	۱/۵ میکرو لیتر
آب مقطر	-	۱۶/۱ میکرو لیتر
جمع		۲۵ میکرو لیتر

در هر واکنش PCR از یک کنترل منفی استفاده گردید. کنترل منفی نمونه ای بود که در آن همه مواد به غیر از DNA ژنومی افزوده شد. محتویات ویال با دستگاه Vortex خوب هم زده شد ویالها به مدت ۴ ثانیه با دور پایین (۴۰۰۰ rpm) سانتریفیوژ شده تا مواد داخل آن ته نشین گردد. نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در این بررسی برنامه حرارتی دستگاه PCR طبق جدول (۱۱) تنظیم و استفاده گردید.

جدول ۱۱- چرخه های حرارتی PCR جهت تکثیر DNA هسته ای با استفاده از واکنش RAPD

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشته سازی	۹۴	۰/۵	۴۰
پهلویی گیری پرایمرها	۳۱	۰/۵	
بسط	۷۲	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

جداسازی باند DNA مورد نظر از روی ژل پلی اکریل آمید:

باند DNA هدف با استفاده از اسکالپر و پنس و در شرایط کاملاً استریل از روی ژل پلی اکریل آمید بریده شد و جداسازی گردید. سپس درون تیوپ ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار گرفت و میزان ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به درون تیوپ اضافه شد و داخل یخچال 4°C به مدت ۱۵ ساعت قرار داده شد.

تکثیر مجدد باند DNA مورد نظر جداسازی شده از روی ژل پلی اکریل آمید:

ابتدا میکروتیوب حاوی باند DNA مورد نظر در 4000 rpm به صورت کوتاه مدت (۴ ثانیه) سانتریفوژ گردید. برای تکثیر باند DNA مورد نظر چهار میکرولیتر از محلول حاوی باند DNA فوق را داخل تیوب به عنوان الگو (DNA template) و ۲۱ میکرولیتر مخلوط PCR اولیه که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR Buffer (10 x) و ۲ میکرولیتر پرایمر رپید فوق را که باند DNA فوق در آن مشاهده گردید (Primer RAPD 10 pmol) ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت 2mM MgCl_2 ، ۰/۵ میکرولیتری دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت 1M dNTP ۲۰۰، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلی مراز با غلظت ۱ واحد آنزیمی بر میکرولیتر و در نهایت به وسیله آب مقطر استریل دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده و مخلوط شدند. تکثیر با استفاده از برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

جدول ۱۲- برنامه تکثیر قطعات جداسازی شده محصول PCR

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (ثانیه)	حرارت (درجه سانتیگراد)	مراحل
۱	۳۰۰	۹۴	واسرشته سازی اولیه
۴۰	۳۰	۹۴	واسرشته سازی
	۳۰	۳۰	پهلوی گیری پرایمرها
	۴۵	۷۲	بسط
۱	۱۵۰۰ (۲۵min)	۷۲	بسط نهایی

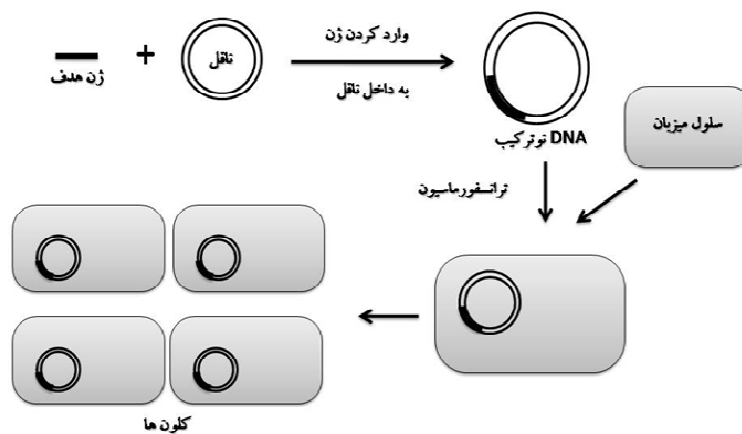
دمای بسط نهایی (Final Extention) به این علت ۲۵ دقیقه در نظر گرفته شد که با توجه به خاصیت آنزیم تگ DNA پلی مراز که می تواند در این زمان به صورت اشتباه در دو سمت محصول PCR نوکلئوتید آدنین (A) اضافه کند تا ایجاد حالت انتهای چسبنده برای فرایند الحاق DNA به پلاسمید صورت گیرد (Sambrook et al., 1989).

پنج میکرولیتر از محصول تکثیر شده با ۱ میکرولیتر محلول بارگذاری Loading Dye با غلظت $6 \times$ مخلوط شد و در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. اندازه باند DNA حاصله می بایستی با اندازه باند DNA جداسازی شده یکسان باشد.

در صورت یکسان بودن اندازه باند DNA بوسیله Kit (Kit Roche) ، استخراج از روی ژل آگارز صورت گرفت و در انتها بوسیله دستگاه ناندراپ ضریب جذب و غلظت DNA استخراج شده بوسیله Kit ذکر شده اندازه گیری شد.

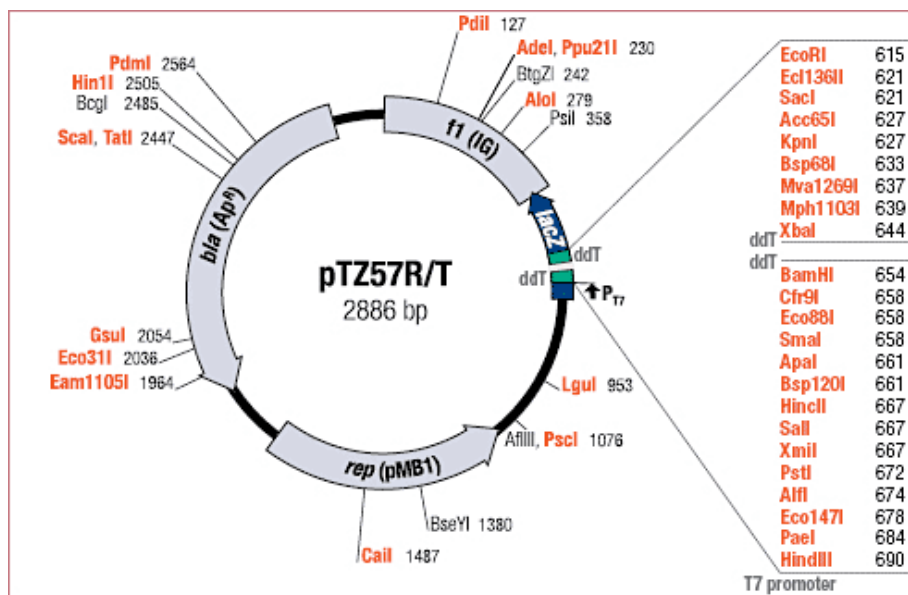
همسانه سازی باند DNA مورد نظر جداسازی شده:

برای همسانه سازی از باکتری E.coli سویه GM107 استفاده گردید. وکتور مورد استفاده در این آزمایش پلاسمید PTZ57R بود. اندازه طول توالی آن ۲۸۸۶ bp نوکلئوتید است که شامل جایگاه شروع همانند سازی، ژن β گالاکتوزیداز، یک پروموتور برای بیان ژن مذکور ، جایگاه برش چندگانه (MCS) درون ژن β گالاکتوزیداز و یک ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد. این پلاسمید از ناحیه توالی جایگاه برشی چندگانه به صورت باز و خطی از شرکت Fermentase خریداری شد.



تصویر ۲- شمای کلی انجام همسانه سازی در باکتری E.coli

هنگامیکه DNA خارجی وارد این ناحیه پلاسمید شود و همچنین پلاسمید به داخل باکتری وارد شود باکتری توانایی رشد درون محیط کشت حاوی آمپی سیلین (Amp+) را دارد. در صورتیکه قطعه DNA خارجی درون ناحیه جایگاه برشی چندگانه پلاسمید وارد نشود باکتری توانایی رشد درون محیط کشت حاوی آمپی سیلین را ندارد بدلیل اینکه در این حالت ژن بتاگالاکتوز بر ژن آمپی سیلین غالب خواهد بود و باعث از بین رفتن باکتری می شود. ژن مقاومت به آمپی سیلین سبب می شود که باکتری بتواند آمپی- سیلین با غلظت ۵۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر را تحمل کند در صورتیکه باکتری معمولی E. coli فاقد پلاسمید به هیچ عنوان قادر به رشد در چنین محیط کشتی نخواهد بود.



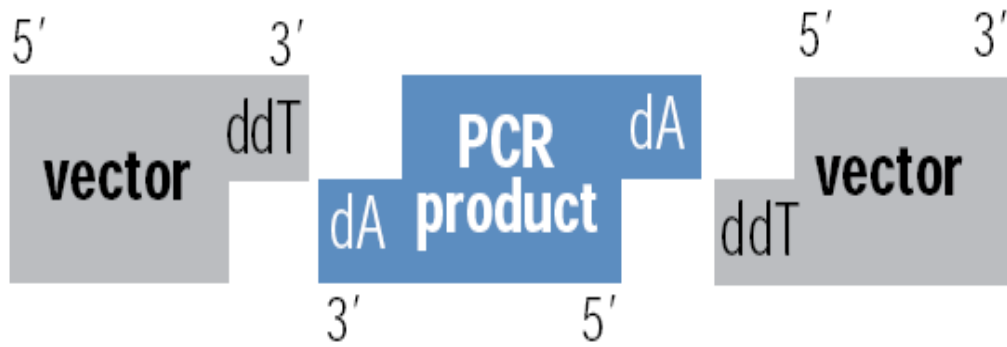
تصویر ۳- نقشه توالی و محل الحاق DNA خارجی به حامل PTZ 57 R

جدول ۱۳- اجزا و بخش های ژنتیکی در ناقل pTZ57R

جفت باز	عملکرد	قسمت
۱۱۲۲-۱۷۳۶	منشأ همانند سازی پلاسمید	rep (pMB1)
۱۸۹۶-۲۷۵۶	ژن بتالاکتاماز ، ایجاد مقاومت به آمپی سیلین	bla (ApR)
۲-۴۵۷	توالی های مورد نیاز برای شروع و خاتمه همانند سازی DNA فاز	f1 (IG)
۴۴۹-۷۳	ناحیه ای از اپرون lac باکتری <i>E. coli</i>	LacZ
۶۱۵-۶۹۵	نقشه یابی، غربالگری و برش قطعه	MCS
۶۹۷-۷۱۶	نسخه برداری in vitro از قطعه بوسیله RNA پلیمراز T7	T7 Promotor

الحاق DNA به پلاسمید :

مواد مختلف طبق جدول زیر در تیوب با یکدیگر مخلوط شدند و در دمای ۴°C به صورت شبانه روز (overnight) انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) گردید. تصویر ۴ نشان دهنده ورود DNA هدف به داخل پلاسمید ، جایگاه برش چندگانه (MCS) است.



تصویر ۴-شمای لیگاسیون در TA Cloning

جدول ۲-۶- مواد مخلوط شده برای الحاق DNA به پلاسمید

حجم	ماده شیمیایی
۳ میکرولیتر	محصول PCR باند DNA مورد نظر با دم پلی A
۳ میکرولیتر	پلاسمید PTZ 57 R
۱ میکرولیتر	بافر الحاق (۱۰X) ligation buffer
۱ میکرولیتر	آنزیم تی - 4 DNA لیگاز
تا به حجم ۱۰ میکرولیتر	آب عاری از نوکلئاز (Nuclease) H ₂ O

تهیه سلول صلاحیت دار (پذیرنده) برای انتقال پلاسمید:

در این مرحله باکتری پذیرای پلاسمید خواهد بود. برای این منظور از باکتری E. coli سویه GM107 استفاده شد. پس از خریداری باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت LB که یک محیط کشت غنی از مواد می باشد کشت داده شد و باکتری بایستی حتماً به صورت جوان و در قسمت میانی از نمودار رشدی خود باشد برای این منظور باکتری را در محیط LB مایع کشت شبانه داده و روز بعد محیط کشت شبانه را ۱ به ۱۰ رقیق کرده و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷°C قرار داده تا OD به اندازه ۰/۵-۰/۶ برسد. انکوباتور شیکردار به این علت مورد استفاده قرار می گیرد که باکتری E.coli برای رشد نیاز به اکسیژن دارد و اینکه دائماً در حالت حرکت دادن باشد تا ته نشینی صورت نگیرد. حال باکتری کاملاً در فاز لگاریتمی قرار دارد.

محتوی داخل ارلن که شامل محیط کشت مایع و باکتری مورد نظر می باشد را به داخل فالکن منتقل و سپس فالکن داخل دستگاه سانتریفوژ یخچال دار (دمای ۴°C) با سرعت ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد که در انتهای فالکن رسوب شیری رنگ باکتری تشکیل گردید به صورت Pellete و لایه رویی فالکن خارج گردید. در چنین شرایطی سلول صلاحیت دار آماده انجام آزمایشات بعدی می باشد که در این تحقیق از روش CaCl₂ استفاده گردید (Sambrook et al., 1989).

روش CaCl_2 برای صلاحیت دار کردن سلول:

به منظور شوک سرمایی فالکن را داخل حمام یخ که حاوی یخ پودر شده می باشد (انکوباسیون یخ) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا دمای فالکن از دمای محیط به دمای صفر درجه برسد و دیواره باکتری آماده متخلخل شدن گردد. فالکن که داخل آن باکتری به صورت رسوب شیری رنگ می باشد به میزان ۰/۵ حجم اولیه آن یعنی cc ۵ (۱M) CaCl_2 سرد واستریل به داخل فالکن اضافه کرده و جهت همگن و مخلوط کردن ورتکس (vortex) نموده به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً داخل انکوباسیون یخ که به صورت پودر می باشد قرار داده پس از آن با سرعت ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در دمای 4°C انجام گردید. پس از آن فاز بالایی فالکن را دور ریخته و به میزان ۰/۲۵ حجم اولیه یعنی cc ۲/۵ (۱ M) CaCl_2 اضافه کرده و به صورت شبانه روز (overnight) در دمای صفر درجه قرار داده شد (Sambrook *et al.*, 1989).

فرایند انتقال پلاسمید به درون سلول های باکتری:

مقدار ۵ میکرولیتر از محلول DNA الحاق شده به پلاسمید (ligation) را به ۲۰۰ میکرولیتر سلولهای آماده پذیرش (competent cell) داخل تیوب به صورت کامل مخلوط گردید. مدت ۳۰ دقیقه روی یخ به صورت انکوباسیون قرار گرفت. سپس این مخلوط به مدت ۱ دقیقه در دمای 42°C درجه سانتیگراد به منظور ایجاد شوک حرارتی در داخل دستگاه بن ماری قرار داده شد و مجدداً به مدت ۲-۱ دقیقه بر روی یخ قرار داده و مقدار ۱ ml محیط کشت LB مایع بدون آمپی سیلین به آن اضافه کرده و در انکوباتور شیکردار در دمای 37°C با سرعت rpm ۲۰۰-۱۵۰ به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. پس از آن محلول مورد نظر را روی پلیت های حاوی محیط کشت جامد که حاوی آمپی سیلین، xgal و IPTG می باشد پخش شد (Sambrook *et al.*, 1989).
 ضرورت دارد تا دقت لازم بعمل آید تا در زمان پخش کردن محلول بنحوی انجام پذیرد که فقط یک لایه باکتری روی محیط کشت پخش شود تا پس از رشد باکتری ها روی محیط کشت به صورت تک کلون مشاهده نمود و مرحله غربالگری یا screen به راحتی انجام پذیرد (جداسازی تک کلون ها از روی محیط کشت به منظور Clony - PCR).

غربالگری Blue-White

برای اطمینان از حصول فرآیند ترانسفورماسیون و ورود ژن مورد نظر به داخل پلاسمید از تست غربالگری Blue-White استفاده شد. بدین منظور از دو ماده X-gal (20mg/ml) و IPTG (0.2 Mm) بروی محیط کشت LB جامد که حاوی آمپی سیلین نیز بود با غلظت های مشخص این دو ماده پخش شدند. حال اگر باکتری پلاسمید را دریافت کرده باشد محیط کشت آمپی سیلین بر روی آن تاثیری ندارد و باکتری رشد می کند و همچنین اگر این پلاسمید درون باکتری ژن مورد نظر را نیز دریافت کرده باشد در حضور دو ماده X-gal و IPTG بصورت

کلنی های سفید رنگ رشد می کند و اگر پلاسمید وارد شده به باکتری ژن مورد نظر داخل آن نباشد بصورت کلنی های آبی رنگ مشخص می شود (Sambrook *et al.*, 1989).



تصویر ۵-رشد باکتری در حضور مواد X-gal و IPTG (کلونی های سفید و آبی رنگ)

کلونی پی سی آر (تکثیر کلونی ها):

به ازاء هر نمونه مواد زیر در تیوب ها اضافه و با یکدیگر مخلوط شدند. ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو M13 با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر (۱۰ PM/ μ L)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پس رو M13 با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR (PCR Buffer 10x)، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت نهایی چهار میلی مولار (MgCl₂ 2 mM)، ۰/۴ میکرولیتر دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم تک DNA پلی مرز با غلظت ۱ واحد آنزیمی بر میکرولیتر و در نهایت بوسیله آب مقطر دوبار تقطیر به حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد و مخلوط شدند و در انتها در هر تیوب کلنی های محیط کشت بوسیله میله دهان گرد استریل (LOOP) به صورت تک کلون برداشت شد و در داخل تیوب حاوی مخلوط PCR تلقیح داده شد. واکنش PCR با استفاده از برنامه جدول (۲-۷) انجام شد.

توالی آغازگرهای کلونی PCR

مورد استفاده قرار گرفت که توالی آن به شرح ذیل می باشد: M13 در این بررسی ۲ آغازگر

۱-M13 Forward sequencing Primer: F: 5'-GTA / AAA / CGA / CGG / CCA / GT- 3' (۱)

۲-M13 Reverse sequencing Primer: R: 5'-CAG / GAA / ACA / GCT / ATG / AA- 3' (۲)

جدول ۱۴- برنامه PCR برای تکثیر کلونی ها

مراحل	حرارت (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳۰۰ (S)	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰	۳۵
پهلوی گیری پرایمرها	۵۱	۳۰	
بسط	۷۲	۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۳۰۰ (S)	۱

پس از اتمام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۱ میکرولیتر محلول بارگذاری رنگ بر موفنل بلو بروی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و پس از اتمام آن، آرایش باندها و محصول PCR مورد بازمینی قرار گرفت. استخراج پلاسمید:

به منظور توالی یابی قطعه همسانه سازی شده لازم است که پلاسمید به صورت خالص و از بقایای باکتری استخراج شود هرچه تخلیص و تعیین کمیت پلاسمید دقیق تر صورت گیرد نتایج توالی یابی از راندمان بالاتری برخوردار خواهد بود. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت {جی-اف-۱ (GF1)} با شماره سریال cat # GF-PL-050 از شرکت وی وانتیس (vivantis) انجام شد.

ابتدا با توجه به نتایج کلونی PCR نمونه هایی که دارای قطعه DNA با اندازه مورد نظر بودند انتخاب شد و با استفاده از میله دهان گرد استریل (Loop) از پتری های حاوی همسانه مورد نظر، برداشت و به فالکنی که حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع LB دارای ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر آمپی سیلین انتقال داده شد. فالکن بروی انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۱۶ ساعت به صورت شبانه روز قرار داده شد. سپس ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته به تیوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. تیوب ها به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از تشکیل رسوب باکتری، محیط کشت رویی حذف شد و سایر مراحل استخراج پلاسمید مطابق با پروتکل کیت مربوطه انجام شد.

توالی یابی قطعات DNA

بر اساس کیفیت و کمیت DNA هدف استخراج شده از پلاسمید باکتری E.coli بوسیله ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفوتومتری مورد بازبینی قرار گرفت، در نهایت به میزان ۱۵ میکرولیتر از محلول حاوی استخراج پلاسمید به همراه آغازگرهای پلاسمید (M13) برای توالی یابی ارسال شد.

BLAST قطعات DNA

پس از دریافت توالی نمونه های ارسالی ضرورت داشت که تمام توالی ها با همدیگر مقایسه شود. برای این منظور از برنامه BLAST استفاده شد.

طراحی پرایمر برای توالی های بدست آمده:

از نرم افزار Mega 4.0.2 برای طراحی قطعه پرایمر مورد نظر از توالی های بدست آمده استفاده گردید، در این برنامه با وارد کردن گونه های مورد نظر از طریق اتصال به اینترنت و سایت NCBI می توان توالی هایی هایی که با هم همخوانی دارند را شناسایی و از آن برای طراحی پرایمر استفاده نمود.

PCR اختصاصی و بهینه کردن آن به منظور تفکیک تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی:

برای اطمینان از تخصصی بودن پرایمر طراحی شده برای تفکیک تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی ضرورت داشت تا مجدداً با استفاده از پرایمر بدست آمده در این تحقیق واکنش PCR انجام شود. برای اینکار بر روی ۵۰ نمونه تاس ماهی ایرانی و ۵۰ نمونه تاس ماهی روسی تست شد که شرایط PCR به شرح ذیل بود.

آنزیم Taq DNA پلیمرز (Fermentase)، $MgCl_2$ ۵۰ mM (سیناژن)، $10\times$ PCR Buffer (سیناژن)، dNTP Mix ۱۰ میلی مولار (Fermentase)، آب مقطر دوبار تقطیر، DNA استخراج شده و پرایمرهای اختصاصی. پرایمرهای مورد استفاده چون به صورت لیو فیلیزه می باشند، باید رقیق شوند و از غلظت استوک 100PM به غلظت کاری 10PM رقیق شود، لذا از آب مقطر برای این منظور استفاده گردید و به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد و در هر واکنش مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱۵- غلظت و مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA ژنومی	۱۰۰ نانوگرم	۴ میکرو لیتر
آنزیم Taq DNA پلیمراز	۵ μ L	۰/۲ میکرو لیتر
DNTP	۱۰ میلی مولار	۰/۶ میکرو لیتر
Mgcl ₂	۵۰ میلی مولار	۱ میکرو لیتر
PCR Buffer	۱۰ X	۲/۵ میکرو لیتر
پرایمر Forward , Reverse	۱۰ پیکول	۲+۲ میکرو لیتر
آب مقطر	-	۱۲/۷ میکرو لیتر
جمع		۲۵ میکرو لیتر

در هر واکنش PCR از یک کنترل منفی استفاده گردید. کنترل منفی نمونه ای بود که در آن همه مواد به غیر از DNA ژنومی افزوده شد. محتویات ویال با دستگاه Vortex خوب هم زده شد و یالها به مدت ۴ ثانیه سانتریفوژ کوتاه مدت با سرعت ۴۰۰۰rpm شده تا مواد داخل آن ته نشین گردد. نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در این بررسی برنامه دمایی دستگاه PCR طبق جدول (۱۶) تنظیم و استفاده گردید. لازم به ذکر است که در برنامه دمایی PCR، ۱۰ سیکل ابتدائی به صورت برنامه Touch down می باشد که در هر سیکل ۰/۳ درجه از دمای ابتدائی Anneling که ۶۰ درجه بود کاسته شد (از دمای ۶۰ درجه به دمای ۵۷ درجه کاهش یافت) (Don et al., 1991).

جدول ۱۶- چرخه های حرارتی PCR جهت تکثیر DNA هسته ای استفاده از واکنش RAPD

مراحل	درجه حرارت (ساتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسر شته سازی اولیه	۹۴	۳	۱
واسر شته سازی پهلو گیری پرایمرها بسط	۹۴ ۵۷-۶۰ (۰/۳) درجه در هر سیکل کاسته شد). ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۰/۵	۱۰
واسر شته سازی پهلو گیری پرایمرها بسط	۹۴ ۵۷ ۷۲	۰/۵ ۰/۵ ۰/۵	۲۰
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

پس از انجام واکنش PCR و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ اگر در ۵۰ نمونه از یک گونه بوسیله پرایمر طراحی شده بانندی تولید شد که در این محدوده بانندی در ۵۰ نمونه از گونه دیگر بانندی تولید نگردید به عنوان نشانگر تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی محسوب می گردد.

۷- هورمون رشد (Growth Hormone Gene)

در این بررسی تعداد ۴ نمونه باله دمی تاسماهی ایرانی (از ماهیان صید شده سال ۸۴ رودخانه سفید رود) و ۴ نمونه باله دمی تاسماهی روسی (جمع آوری شده توسط گروه تحقیقاتی گشت ارزیابی ذخایر انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در منطقه ترکمنستان در طی سالهای ۸۱ و ۸۴) موجود در انستیتو استفاده گردید.

استخراج DNA کلیه نمونه ها بر اساس روش (Hillis et al., 1990) تعدیل شده برای ماهیان خاویاری توسط (Pourkazemi, 1996) انجام گرفت.

به منظور سنجش میزان کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

آغاز گر ها

آغاز گر ها قطعات اولیگونوکلئوتیدی کوتاهی (۲۵-۱۰ باز) هستند که از آن ها برای تکثیر قطعه ژن یا DNA دلخواه استفاده می کنند. به منظور طراحی پرایمر برای ژن هورمون رشد، ابتدا با استفاده از نرم افزار MEGA 4.0.2 توالی ژن های رشد ۳۰ گونه از مهره داران (جدول ۱۷) ثبت شده در بانک جهانی ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) با یکدیگر بلاست شده و نواحی که بیشترین همولوژی را نشان دادند به عنوان نواحی مناسب برای طراحی پرایمر استفاده گردیدند (تصویر ۶).

جدول ۱۷- منبع، شماره دسترسی در NCBI و اسم علمی گونه ها که توالی ژن رشد آنها شناسایی و ثبت شده است.

	گونه	شماره دسترسی	منبع
1	<i>Onchorinchus masou</i>	X59762	Shoji et al, 1991
2	<i>Danio rerio</i>	AY286447	Falcon et al, 2003
3	<i>Cyprinus carpio</i>	M27000	Koren et al, 1989
4	<i>Spaurus aurata</i>	U01301	Martinez Barbera, 1993
5	<i>Tricogaster trichopterus</i>	AF157633	Doron et al, 1999
6	<i>Anguilla japonica</i>	M24066	Saito et al, 1988
7	<i>Anguilla anguilla</i>	AY148493	Goldberg et al, 2003
8	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	X60475	Chang et al, 1991
9	<i>Carassius aurata</i>	DQ350437	Chen et al, 2006
10	<i>Calta calta</i>	AY053361	Ravinder and Majumdar, 2001
11	<i>Clarias gariepinus</i>	AF416488	Nasaruddin and Majumdar, 2001
13	<i>Salmo salar</i>	M21573	Johansen et al, 1989
14	<i>Onchorinchus mykiss</i>	M24683	Rentier-Delrue et al, 1989
15	<i>Carassius cuvieri</i>	AF389237	Hao et al, 2001
16	<i>Heteropneustes fossilis</i>	AF147792	Anathy et al, 2001
17	<i>Paramisgurus dabryanus</i>	DQ350432	Chen et al, 2006
18	<i>Rattus norvegicus</i>	V01237	Seeburg et al, 1977
19	<i>Ovis aries</i>	S50877	Guron et al, 1992
20	<i>Sus scrofa</i>	NM213869	Nieves-Martinez et al, 2009
21	<i>Homo sapiens</i>	V00520	Adelman et al, 1981
22	<i>Silurus meridionalis</i>	AF530481	Ping et al, 2002
23	<i>Silurus asotus</i>	AY157496	Song, P, 2002
24	<i>Rhamdia quelen</i>	EF101341	Vaz et al, 2010
25	<i>Pimephales promelas</i>	AY643399	Filby and Tyler, 2007
26	<i>Cirrhinus mrigala</i>	AF140281	Thayanithy et al, 2001
27	<i>Gymnocypris przewalskii</i>	AY707317	Cao et al, 2009
28	<i>Ictiobus bubalus</i>	AY375301	Clements et al, 2003
29	<i>Labeo rohita</i>	AF416490	Rajesh and Majumdar, 2001
30	<i>Morulus calbasu</i>	AY691181	Rajesh and Majumdar, 2004

سپس با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی پرایمر از روی نواحی شناسایی شده صورت گرفت و این نواحی از نظر دایمر پرایمر و طول قطعه مورد ارزیابی قرار گرفت.



تصویر ۶- مقایسه توالی ها به منظور طراحی آغاز گر با استفاده از نرم افزار MEGA

توالی پرایمر های طراحی شده به شرح ذیل می باشد:

جدول ۱۸- توالی آغاز گر های مورد استفاده در PCR

شماره پرایمر	اسامی پرایمر ها	توالی پرایمر
۱	F1	5'-ATGGCATCAGGTCTGCTTCT-3'
۲	F645	5'-TGCTACTCTGAGACCATCC-3'
۳	R647	5'-AGTGGGAGCAGGGATGG-3'
۴	R1620	5'-TCAGGGACTGCAGGGGAA-3'
۵	R2393	5'-CTACAGAGTACAGTTGCTC-3'
۶	F1710	5'-TGAAGGTA AAAATGGGTAA-3'
۷	F1641	5'-CTGGTGTT CAGCACCTCC-3'
۸	F UTR	5'-ACACCTTGAAAGCTCTG-3'
۹	R UTR	5'-AACCGTATGACTATGAA-3'
۱۰	R g	5'-GCATGACTACTACA ACTTCC-3'
۱۱	R h	5'-TGCTCCAA ACCACCCC-3'
۱۲	REV	5'-ACATGACATACTTTATTG-3'
۱۳	REV cloning	5'-AAAGAATTCTACAGAGTACAGTTGCTCTC-3'
۱۴	UTR F2	5'-CAAAA ACTGAGAAGATGGC-3'
۱۵	D UTR F1	5'-ACMCYTTBAAASCTCHGG-3'
۱۶	DUTR F3	5'-BCCAACCGGAATCDATGGC-3'

۱۷	D FLANK F3-1	5'-TCAVANTRTCCCACCGGTT-3'
۱۸	FLANK R2	5'-CAGAAGAGGAGTCAACAC-3'
۱۹	FLANK R1-1	5'-GTGTTTTTGGTGGGTA-3'
۲۰	D FLANK F2-1	5'-GVGAMAGGCACAAACCT-3'
۲۱	D FLANK F2-2	5'-GVGACATTTTTGGHCAG-3'
۲۲	D UTR R2	5'-ATGSTTCCAACAGATCRGG-3'
۲۳	FLANK R1-2	5'-BAACCCTATAGACC-3'
۲۴	F81	5'-CGGTACCACAATTAATCATG-3'
۲۵	D FLANK F1	5'-AGGYTNRAGCCCCRBCTAG-3'
۲۶	D UTR R1	5'-YCTKCTTTGCADCTTCG-3'
۲۷	D FLANK F3-2	5'-TAAVTNTGTCTGGTGGGAT-3'
۲۸	FLANK R2-2	5'-CAGGTATGAVTTCACGAT-3'

* کد های مربوط به باز های مخلوط در آغاز گر های دجنره به صورت زیر ترجمه می شوند :

R(a, g); Y(c, t); M(a, c); K(g, t); S(g, c); W(a, t); V(a, c, g); H(a, t, c); B(g, t, c); D(g, a, t); N(a, c, g, t)

سنتز آغاز گر ها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت و از آن جاییکه پرایمر ها به صورت لیوفیلز شده بودند ابتدا با آب مقطر به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر آنها را رقیق کرده و سپس به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شدند تا غلظت پرایمر ها برای استفاده از ۱۰۰ پیکو مول استوک به ۱۰ پیکو مول برسد.

۲-۵- واکنش زنجیره ای پلیمرز

در این تحقیق به منظور تکثیر ژن سنتز کننده هورمون رشد از دستگاه PCR ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده گردید (تصویر ۲-۶).



تصویر ۷- دستگاه ترموسایکر

مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR به منظور تکثیر ژن هورمون رشد به شرح زیر می باشد:

DNA استخراج شده، یک جفت آغاز گر، آنزیم Taq DNA پلیمرز (سیناژن)، 50 mM MgCl_2 (سیناژن)، PCR Buffer در غلظت $10 \times$ (سیناژن)، 10 mM dNTP Mix (Fermentase)، آب مقطر دو بار تقطیر.

برای هر واکنش PCR یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. کنترل مثبت به منظور صحت عمل آغاز گر و مواد مورد استفاده در PCR به کار گرفته شد و شامل DNA ای غیر از DNA های مورد آزمایش مربوط به تاس ماهی ایرانی و روسی می باشد. کنترل منفی هم شامل تمامی مواد مورد استفاده در PCR به جز DNA بود و معادل مقدار آن آب دو بار تقطیر شده استفاده گردید تا از عدم آلودگی DNA در حین کار اطمینان حاصل گردد (جدول ۱۹).

جدول ۱۹- مقدار و غلظت مواد به کار رفته در PCR

ماده	غلظت	مقدار مورد نیاز برای یک واکنش به حجم ۵۰ میکرولیتر
DNA	۵۰ نانو گرم	۶ میکرو لیتر
آغاز گر	۲۰ پیکو مول	۳ میکرو لیتر
DNTP	۱۰ میلی مولار	۱/۴ میکرو لیتر
Mgcl2	۵۰ میلی مولار	۲ میکرو لیتر
PCR Buffer	X1۰	۵ میکرو لیتر
DNA Polymerase	U/μl۵	۰/۴ میکرو لیتر
آب مقطر	-	۳۲/۲ میکرو لیتر
جمع	-	۵۰ میکرو لیتر

پس از اضافه نمودن تمامی مواد در میکروتیوب ها، آن ها را به مدت ۳-۲ ثانیه ورتکس و سپس به همین مدت سانتریفوژ کوتاهی نموده و در درون دستگاه PCR قرار داده شد. برنامه دستگاه PCR به منظور تکثیر ژن هورمون رشد در جدول ۲۰ نشان داده شده است.

جدول ۲۰- برنامه دستگاه PCR برای تکثیر ژن هورمون رشد

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۵	۱
واسرشته سازی	۹۴	۰/۵	۳۵
پهلو گیری پرایمرها	۵۸	۰/۵	
	۷۲	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز

پس از ساخت ژل آگارز ۱ درصد مشابه مراحل که در قسمت ۲-۳-۲ بیان شد، محصول PCR به دست آمده را که همان ژن هورمون رشد مربوط به تاس ماهی ایرانی و روسی می باشد ابتدا به میزان ۵ میکرو لیتر با ۳ میکرو لیتر بافر سنگین کننده مخلوط نموده و سپس به درون چاهک های ژل آگارز ریخته شد و ولتاژ بر روی ۹۰ ولت و ۵۵ میلی آمپر تنظیم گردید. بعد از گذشت ۴۵-۴۰ دقیقه زمانیکه بافر سنگین کننده به انتهای ژل رسید دستگاه مولد برق خاموش شد.

باند های تکثیر شده با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل (ساخت شرکت Vilber Lourmant) همراه با برنامه نرم افزاری Biocape مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از قرار دادن ژل آگارز در درون دستگاه و روشن کردن آن، اشعه UV بر روی ژل تابانیده و موجب نمایان شدن باند های تکثیر یافته روی ژل آگارز گردید. رویت باند های DNA به دلیل اتیدیوم برومایدی است که به رشته DNA متصل شده و باعث می شود باند ها روی ژل آگارز به صورت یک نوار نورانی دیده شوند.

تکثیر ژن هورمون رشد از طریق کلونینگ یا همسانه سازی

برای تکثیر ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی از طریق همسانه سازی در باکتری، ابتدا ۶-۵ میکرولیتر از محلول حاوی ژن رشد تکثیر یافته را داخل میکروتیوب به عنوان الگو (DNA template) ریخته شد و ۲۱ میکرولیتر مخلوط مواد مورد نیاز در PCR به نسبت ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR Buffer (10 x)، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲mM MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۲۰۰ μM، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلی مرز (1 U/μl) و در نهایت به وسیله آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

در این مرحله دمای بسط نهایی ۳۰ دقیقه در نظر گرفته می شود، زیرا آنزیم DNA پلی مرز دارای خاصیت Error Prone می باشد و می تواند در دو انتهای ژن تکثیر شده نوکلئید های تک رشته ای آدنین ایجاد کند. با استفاده از این عمل DNA پلی مرز می توان انتهاهای چسبنده ای ایجاد نمود که از آن برای الحاق ژن رشد به پلاسمید استفاده می شود (جدول ۲۱).

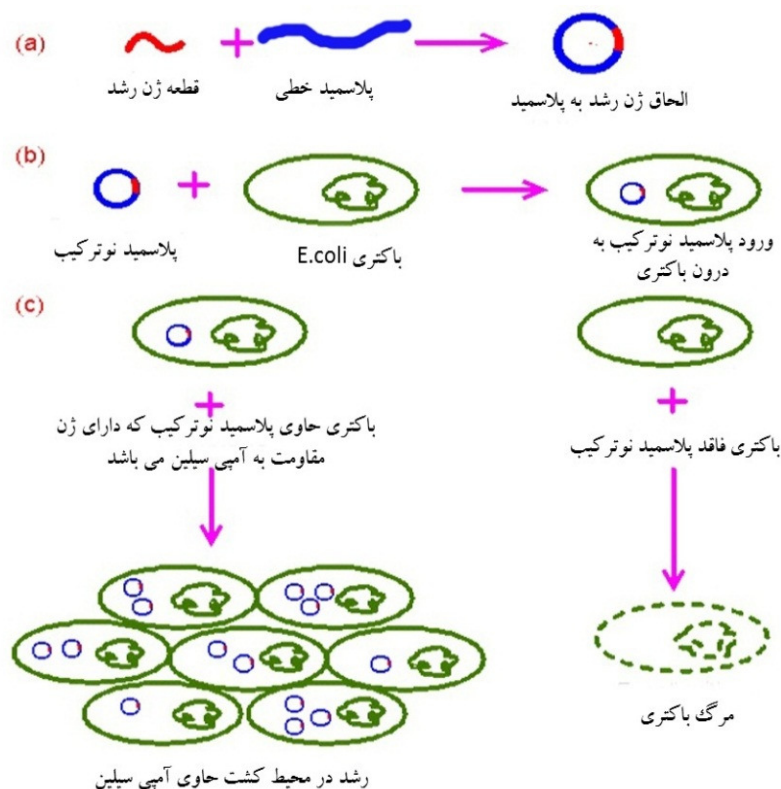
جدول ۲۱- PCR به منظور ایجاد انتهاهای چسبنده در ژن رشد

تعداد سیکل	زمان (ثانیه)	حرارت (درجه سانتیگراد)	مراحل
۱	ثانیه ۳۰۰	۹۴	واسرشته سازی اولیه
۴۰	ثانیه ۳۰	۹۴	واسرشته سازی
	ثانیه ۳۰	۵۸	پهلوی گیری پرایمرها
۱	ثانیه ۴۵	۷۲	بسط
	(۳۰ دقیقه) ۱۸۰۰	۷۲	بسط نهایی

همسانه سازی ژن هورمون رشد

همسانه سازی با استفاده از باکتری E.coli سویه Top10 ساخت شرکت Invitrogene انجام شد. از پلاسمید PTZ57R/T به عنوان وکتور با طول ۲۸۸۶ bp استفاده گردید. این وکتور خطی بوده و دارای جایگاه شروع همانند سازی، ژن β گالاکتوزیداز، یک پروموتور برای بیان ژن مذکور، جایگاه برش چندگانه (MCS) درون ژن β گالاکتوزیداز و یک ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد.

از آن جایی که اگر محیط کشت حاوی آمپی سیلین باشد باکتری در حالت عادی قادر به رشد نیست. به همین منظور از پلاسمید حاوی ژن مقاوم به آمپی سیلین استفاده می شود در نتیجه تنها باکتری هایی قادر به رشد در محیط کشت حاوی آمپی سیلین می باشند که پلاسمید را دریافت کرده باشند. باکتری در این شرایط قادر است ۵۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین را در محیط کشت تحمل کند. نواحی اتصال در میان ژن بتاگالاکتوزیداز قرار دارد بنابراین اگر پلاسمید بدون اتصال به ژن رشد وارد باکتری شود این ژن بیان شده و کلونی های آبی رنگ را ایجاد می کند که نشان دهنده عدم الحاق ژن رشد به پلاسمید می باشد (تصویر ۸).



تصویر ۸- فرایند الحاق ژن رشد به پلاسمید و انتقال آن به درون باکتری

الحاق ژن رشد به پلاسمید

الحاق ژن رشد با استفاده از آنزیم DNA T4 ligase به پلاسمید صورت گرفت. این آنزیم موجب تسریع در اتصال پیوند های هیدروژنی بین بازهای آدنین در دو انتهای ژن رشد با باز های تیمین در دو انتهای پلاسمید خطی می شود.

مواد مختلف در الحاق شامل PCR Product ژن رشد با غلظت ۵ میکرولیتر، آنزیم DNA T4 Ligase با غلظت ۲ میکرولیتر، پلاسمید PTZ57R/T با غلظت ۳ میکرولیتر و بافر الحاق با غلظت ۱ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند و در دمای ۴°C به مدت یک شبانه روز (overnight) انکوباسیون گردید.

آماده سازی سلول صلاحیت دار

در این مرحله از باکتری E.coli سویه Top10 برای تکثیر توالی کامل ژن هورمون رشد استفاده گردید. محیط کشت LB مایع یک محیط کشت باکتریایی بوده که غنی از مواد مغذی برای رشد باکتری می باشد. به منظور استفاده از باکتری ها ابتدا به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در محیط کشت LB مایع در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. این عمل باعث می شود تا غلظت بالایی از باکتری هایی جوان و پذیرای وکتور به دست آید. سپس به نسبت ۱ به ۱۰ آن ها را رقیق کرده و در درون انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم تا OD آن به ۰/۷-۰/۵ برسد. این مرحله زمانی است که باکتری به فاز میانی رشد خود رسیده و بهترین زمان برای انتقال پلاسمید به درون باکتری می باشد.

صلاحیت دار کردن سلول به روش CaCl₂

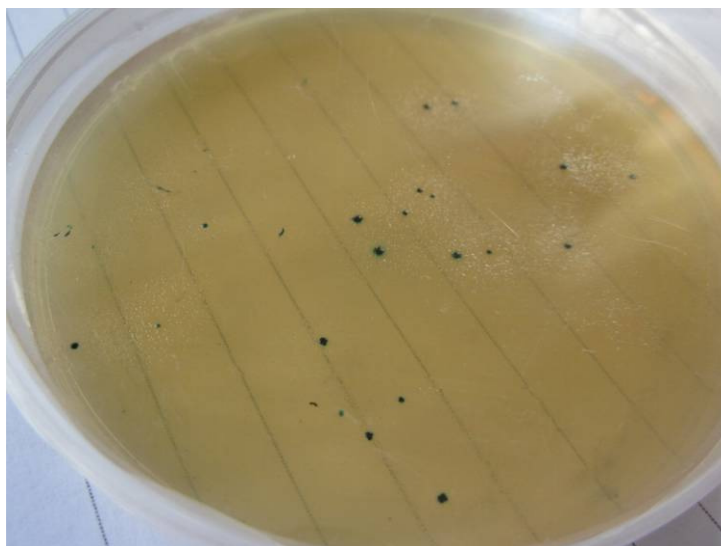
۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی باکتری و محیط کشت را داخل یک فالکن ریخته و با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷-۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی را دور ریخته و به پلت باکتریایی به میزان ۴ میلی لیتر CaCl₂ ۰/۱ مولار اضافه گردید. دوباره فالکن به مدت ۸ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ و محلول رویی جدا گردید. اینبار به میزان ۴۰۰ μl CaCl₂ ۰/۱ مولار به فالکن اضافه شد و با پیست کردن به آرامی محلولی یکدست از باکتری به دست آمد. در این زمان سلول های باکتریایی منفذ دار شده و آماده پذیرش پلاسمید می باشند.

۲-۹-۳- فرایند انتقال پلاسمید به درون سلول های باکتری:

به میزان ۵ میکرولیتر از محلول الحاق و ۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر سلول صلاحیت دار شده به درون یک میکروتیوب منتقل شد و کاملاً با یکدیگر مخلوط گردید. در ادامه ابتدا به مدت نیم ساعت بر روی یخ قرار داده شد سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا سلول های باکتریایی شوک گرمایی ببینند. این عمل موجب میشود تا میزان ورود پلاسمید به درون باکتری افزایش یابد و در نهایت ۳-۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد و بعد از این مدت ۱ میلی لیتر محیط کشت LB مایع به آن اضافه گردید. بعد از گذشت یک ساعت محلول باکتری حاوی پلاسمید به محیط کشت LB جامد حاوی آمپی سیلین، xgal و IPTG با استفاده از یک پیپت پاستور وارد شده و کشت سفره ای داده شد (Sambrook et al., 1989).

جداسازی تک کلون ها از محیط کشت به روش Blue-White

در این آزمایش علاوه بر روش آمپی سیلین از روش غربالگری Blue-White نیز برای اطمینان از صحت انتقال ژن هورمون رشد به درون باکتری استفاده گردید. غربالگری Blue-White با استفاده از دو ماده IPTG و X-gal در محیط کشت LB جامد انجام می گیرد. در صورتی که ژن رشد به پلاسمید الحاق نشود ژن بتاگالاکتوزیداز در درون باکتری بیان شده و در حضور X-gal موجب تشکیل کلونی هایی به رنگ آبی می گردد در حالی که کلون های حاوی پلاسمیدی که ژن رشد را دارند به رنگ سفید می باشند. IPTG به عنوان القاگر بیان ژن بتا گالاکتوزیداز به محیط کشت اضافه می شود (تصویر ۲-۹).



تصویر ۹- نمونه ای از تشکیل کلون های Blue-White در محیط کشت LB+ حاوی آمپی سیلین جامد

تکثیر کلونی ها به روش Hot Start PCR

چند نمونه از تک کلون های سفید به همراه ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو M13 با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پس رو M13 با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلی مرز (1 U/μl)، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر PCR (PCR Buffer 10x)، ۰/۵ میکرولیتر MgCl₂ 2 mM با غلظت نهایی چهار میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs و آب مقطر دوبار تقطیر در درون میکروتیوب به حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. PCR برای کلون ها به روش Hot start می باشد بدین صورت که به منظور پاره شدن دیواره باکتری و آزاد شدن محتویات DNA آن زمان واسرشت سازی اولیه ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (جدول ۲۱).

توالی آغازگرهای کلونی PCR

M13 Forward sequencing Primer: F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT- 3' (۱)

M13 Reverse sequencing Primer: R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAA- 3' (۲)

در انتها از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت برای مشاهده باندها استفاده گردید.

جدول ۲۲- برنامه PCR برای تکثیر کلونی ها

مراحل	حرارت (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)	تعداد
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۶۰۰	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰	۳۵
پهلوی گیری پرایمرها	۵۸	۳۰	
بسط	۷۲	۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۳۰۰	۱

استخراج پلاسمید

به منظور توالی یابی قطعه همسانه سازی شده لازم است که پلاسمید به صورت خالص و از بقایای باکتری استخراج شود. هرچه تخلیص و تعیین کمیت پلاسمید دقیق تر صورت گیرد نتایج توالی یابی از راندمان بالاتری برخوردار خواهد بود.

به منظور ارسال نمونه ها برای توالی یابی ابتدا باید پلاسمید ها خالص سازی گردند. مراحل استخراج به شرح زیر می باشد:

- ۱- کلون های سفید رنگ با استفاده از میله لوپ برداشته شده و در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB+ حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین در انکوباسیون شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت rpm ۲۰۰ به مدت ۱۶-۱۲ ساعت کشت شدند.
- ۲- مقدار ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت پس از ۱۸ ساعت به میکروتیوب های ۲ میلی لیتری انتقال یافت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه با بالاترین سرعت رسوب داده شد.
- ۳- محیط کشت رویی را به آرامی جدا و به میزان ۱۱۱ μ l محلول A.L 1 کاملاً سرد به میکروتیوب اضافه و ورتکس می کنیم.
- ۴- مقدار ۲۰۰ μ l میکرولیتر A.L 2 که تازه آماده شده را به میکروتیوب اضافه کرده و بدون ورتکس با دست چند بار به سرعت میکروتیوب تکان داده شد.
- ۵- مقدار ۱۵۰ μ l A.L 3 سرد را به میکروتیوب اضافه و با دست چند بار آن را تکان داده و به مدت ۳-۵ دقیقه روی یخ گذاشته شد.
- ۶- میکروتیوب با بالاترین سرعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد.
- ۷- حجم برابری از فنل: کلروفرم را اضافه و فاز ارگانیک و آبی با ورتکس میکس شد و سپس امولسیون را با بالاترین سرعت به مدت دو دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی گراد) سانتریفوژ گردید و فاز بالایی آبی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد.
- ۸- معادل دو حجم اتانول در دمای اتاق اضافه و ورتکس کرده و سپس ۳-۲ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. به مدت ۵ دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی گراد) در حداکثر سرعت سانتریفوژ شد.
- ۹- مایع رویی جدا و میکروتیوب ها به صورت برعکس روی کاغذ گذاشته شدند تا کاملاً خشک شوند.
- ۱۰- معادل ۱ ml اتانول ۷۰ درصد را به پلت اضافه و چند بار با دست اینورت شد سپس با بالاترین سرعت (دمای ۴ درجه سانتی گراد) به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.
- ۱۱- تمام اتانول های موجود روی دیواره میکروتیوب را جدا و تیوب را به صورت در باز به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد تا از هر گونه قطره های اتانول پاک شود.
- ۱۲- پلاسمید های استخراج شده در ۵۰ μ l بافر TE (pH:8) حاوی ۲۰ μ g/ml DNAase-RNAase Free حل گردید سپس ورتکس کوتاهی نموده نمونه های به دست آمده را می توان تا مدت ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

توالی یابی ژن هورمون رشد

توالی یابی ژن سنتز کننده هورمون رشد به روش پایان دهی زنجیره (Chain Termination) انجام شد. این روش نخستین بار توسط سانگر و کالسون از دانشگاه کمبریج مطرح گردید. بدین منظور به میزان ۳۰ میکرولیتر از محلول حاوی DNA استخراج شده از پلاسمید به همراه آغازگرهای پلاسمید (M13) برای توالی یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی فرستاده شد.

تجزیه و تحلیل توالی ها

نرم افزار های متنوعی برای بررسی توالی های DNA وجود دارد که برخی با اتصال رایانه به اینترنت و سایت مورد نظر قابلیت استفاده را دارند و برخی دیگر بدون دسترسی به اینترنت میتوانند به آنالیز توالی ها پردازند. این نرم افزار ها با BLAST یا هم ردیف کردن قطعات مختلف DNA می توانند با دقت و حساسیت بسیار بالایی تشابهات و تفاوت های توالی ها را حتی در سطح یک نوکلئید نشان دهند.

از جمله نرم افزار های معروفی که در این زمینه کاربرد زیادی دارد می توان MEGA 4.0 نام برد که با هم ردیف کردن توالی های مختلف و نشان دار کردن نوکلئید ها، نتایج را مورد آنالیز قرار می دهد. برای شناسایی موقعیت سیگنال پپتید نرم افزار SignalP 4.0 و از نرم افزار NEBcutter V2.0 برای شناسایی جایگاه برش آنزیم های محدود کننده و به منظور تعیین جایگاه گلیکولیزاسیون نرم افزار NetNGlyc 1.0 به کار برده شد. در این آزمایش برای بررسی روابط فیلوژنتیک و آنالیز توالی تاس ماهی ایرانی و روسی با سایر گونه ها از این نرم افزار استفاده شد. همچنین برای رسم دندروگرام با استفاده از نرم افزار MEGA 4.0 براساس روش Neighbor Joining، UPGMA استفاده شد.

۸- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism or SNP)

جمع آوری نمونه ها

در این تحقیق نمونه باله تاسماهی ایرانی و روسی از خزر شمالی و خزر جنوبی طبق جدول ۲۳ جمع آوری گردید.

جدول ۲۳: منشاء و تعداد نمونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی جمع آوری شده

ردیف	گونه	منشاء	ناحیه	تعداد
۱	تاسماهی روسی	دریای خزر	خزر شمالی	۳۰
		دریای خزر	خزر جنوبی	۱۰
		دریای آزوف	-	۳۰
۲	تاسماهی ایرانی	دریای خزر	خزر شمالی	۳۰
		دریای خزر	خزر جنوبی	۲۰

در این تحقیق، مقدار ۳ گرم از شعاعهای نرم باله دمی از هر یک از ماهیان تهیه و در الکل اتانل ۹۶٪ و در اپندروف نگهداری گردید. سپس با اخذ مجوز و گواهی CITES به آزمایشگاه انجمن جانور شناسی سلطنتی / انستیتو ایمنی و حفاظت شهر وندان واقع در شهر ادینبور (اسکاتلند-انگلستان) ارسال شد. پس از استخراج DNA تمامی مراحل پروتکول تهیه نشانگر SNP انجام شد. نمونه DNA هر گونه با هم ادغام شد. تاسماهی ایرانی شمال، جنوب خزر و تاسماهی روسی شمال و جنوب خزر بعنوان دو گروه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی تقسیم شدند تا ژنوم مستقل چندگانه در اختیار باشد و بتوان مارکر SNP را براساس توالی ۱ یا ۲ نمونه بطور عمقی مورد ارزیابی قرار داد و توالی ژنوم براساس روش EAD انجام پذیرفت. جزئیات تمامی روش کار از توالی یابی تا تهیه SNP مارکر در گزارش نهایی پروژه مشترک با عنوان ذیل به نگارش R.Ogden 2011 آمده است.

"SturSNIP: Discovery and Characterization of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers for sturgeon product traceability"

آنالیز ژنتیکی داده‌های SNP :

بمنظور ارزیابی پروسه خصوصیات SNP تعداد از SNP های کاندید بصورت آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور از روش ژنوتایپینگ برای هر مارکر SNP صورت گرفت و با آنالیز نمونه‌های شاهد مبنی بر تعیین تفرق قابل انتظار استفاده گردید. ارزیابی آزمایشی با این روش به نوبه خود مبنایی برای توسعه ابزار کاربردی جهت پاسخ به سئوالات مربوط به شناسایی تاسماهیان بود. آنالیز داده‌های مربوط RAD شامل توالی ۱۰۰ جفت باز در قرائت اول و ادغام آن با قرائت دوم توسط دستگاه باشد که می‌تواند با همدیگر یکی شده یا یک توالی طولانی‌تر حتی تا ۵۰۰ جفت باز برسد. مارکرهای SNP کاندید برای پاسخ به سؤال خاص در قرائت اول شناسایی شدند ولی این خواندن توالی‌ها بندرت طویل هستند تا بتوان از آنها برای ارزیابی ژنوتیپی استفاده نمود. بجای آن ارزیابی به نحوی طراحی شده تا در بخش انتهایی توالی بصورت جفت (زوج) با توالی بعدی قابل قرائت باشد.

در این تحقیق از روش "کاسپار" (K-Bioscience) Kaspar برای ارزیابی ژنوتیپ‌های بدست آمده استفاده گردید. در این روش از رنگ‌های فلورسنت با رنگ‌های مختلف تعیین کننده هر الل (تنوع) که در مارکر SNP هدف وجود دارد استفاده گردید. آنالیز کاسپار بر مبنای تکثیر PCR یک قطعه SNP هدف استوار است که با مشارکت رنگ در محصول PCR انجام می‌شود. در پایان PCR رنگ فلورسنت آشکار شده و ژنوتیپ نمونه مورد بررسی تعیین خواهد شد.

ارزیابی آزمایشی از طریق ژنوتایپینگ با استفاده از SNP نشان داد که تفرق و تمایز بین تاسماهی روسی (*A. gulfenstadii*) و تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) وجود دارد. با توجه به دستیابی به چنین نتایجی ۱۵ مارکر کاندید که تفرق و یا تمایز بین تاسماهی روسی و ایرانی در شمال و جنوب خزر از خود نشان می‌دادند انتخاب

گردید تا برای ارزیابی ژنوتیپی مورد استفاده قرار گیرد. از ۱۵ لوسای انتخاب شده ، پنج لوسای برای این امر مناسب بود تا براساس آن ارزیابی ژنوتیپی کاسپار صورت پذیرد (جدول ۲۴). این ارزیابی ها متعاقباً طراحی شدند و به شرکت K-Bioscience سفارش داده شد و سپس تست گردید.

جدول ۲۴- جزئیات توالی پنج لوسای SNP که تفرق بین تاسماهی روسی و ایرانی را نشان دادند.

Candidate RAD Tag	Paired-end sequence containing target SNP
53644	GAGACAGGCGTTTTACTGCTGAAATAACCTGGGGCAAGT GATTGATGTCACCTTGGAGCTTCAGAGAGAGAGAGAGA GA[S]ACTTTGACTTTTATTCTCATATTTAAAATCCATCAGAA AATCAACAATAAGGTAACCACAAAGAAAGACT
53647	TGTCCACTCTGCGCTTACTGGGCGCCTGGCCAGCAGGGTTCGCTGTAGAGCGA TGGGAAGAGACAGTCTCTCACAGTTTTACCTCCC[Y]AACCCACAGGAGTGGC AGAGCCAATGCAACGCTCCCTTCGGAGTCCCCAGCAAAGACCGGCCTACTTC GCA
53671	TCTGAAATCAGGTAATGGTTGTTAATTGGGAATAGTCACACACAATAAAAAG GAGCTTGAAGCTCCATTAGAGAGAG[R]ACCACCAGGGAcggtttAGCCGTCCCA ACCGTTTAGTTAGTAAAAGCACAAGTTTAGTTAGTACTCCGAGGGGAGTTAA G
53718	GTATTTACATGGTACACATTTTTTTTCATGGTACGGTCACATAATTTTTTGGTA AGGGAAATCATTAATTACACggttgcTACCCTATGTCCTAAGTGTGTCTCCGCTTA ATTTCCA[R]CTGTAGCCTCATCCTGGTTTCTGTGCCGTGTTTAAAGTACTGCAT T
53778	GTTTTTGGGTCTATTAAGCATTCTGTTCTGATGTAAGAGGCTTTTGTACTG[R]G AAAACGCCATGTGCTATGATTATGTAAGGCAGGCATAcagagcTGGCAATGGAA CGTGAACAAGTAATATGATTGGTTCGAGGAAGGTTCCAGCTGTGGAACAGA CAGTTGGAGCCTTGTCACATTCTAAATCACTGCGCTGCCAACAG

۴- نتایج

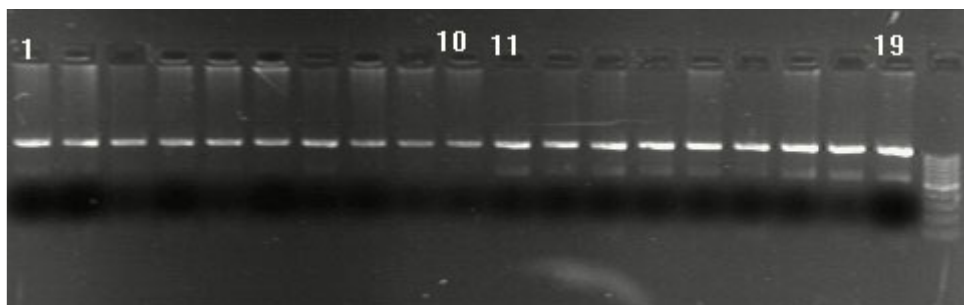
۴-۱- نتایج سیتوکروم ب

نتایج حاصل از استخراج DNA:

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که از لحاظ کیفی، شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۱٪) نشان داد که DNA های استخراج شده از باله ماهی، کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار هستند. از لحاظ ارزیابی کمی میزان جذب DNA در طول موج ۲۶۰nm و طول موج ۲۸۰nm بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ مدل ND1000) محاسبه گردید. نمونه هایی که این نسبت ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و نمونه های نامناسب DNA برای آنها استخراج مجدد صورت گرفت.

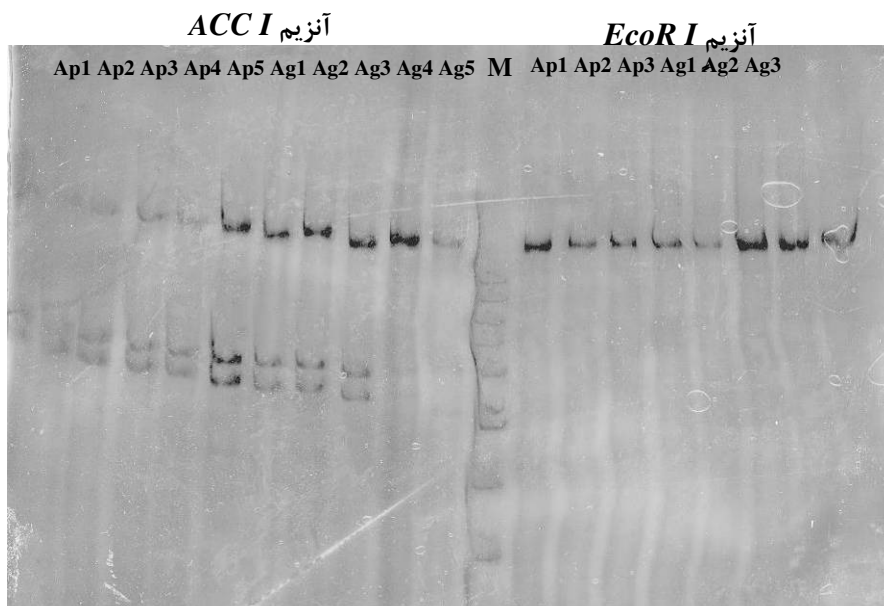
نتایج حاصل از PCR

نتیجه حاصل از PCR نمونه های DNA استخراج شده تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی که با آغازگر سیتوکروم b میتوکندریایی انجام گردید، پس از الکتروفورز ژل آگارز همگی تولید باندهایی در محدوده ۱۴۰۰ جفت باز نمودند (تصویر ۱۰).



تصویر ۱۰- محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز cyt b بر روی ژل آگارز با مارکر ۱۰۰ bp (۱-۱۰ تاسماهی ایرانی، ۱۱-۱۹ تاسماهی روسی)

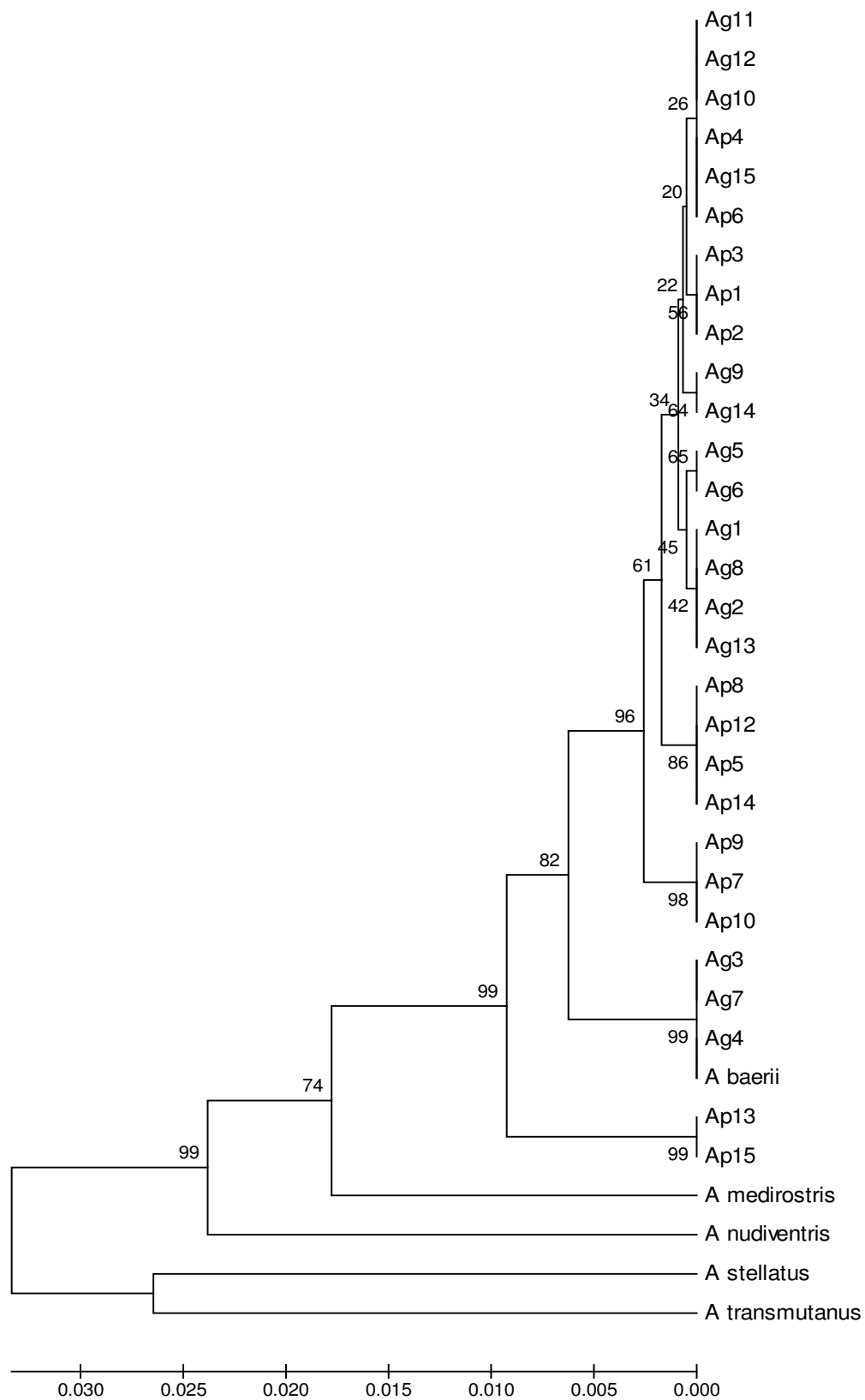
نتایج بررسی نشان داد که بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی اختلاف در محل قطع و برشی آنزیمی ACC I وجود نداشت (تصویر ۶). ولی به منظور غربالگری بیشتر با EcoR I ، Taq I و Pst I هضم گذاشته شد که نتایج مشابه بود و تفاوت در محل برش آنزیم ها نداشتند.



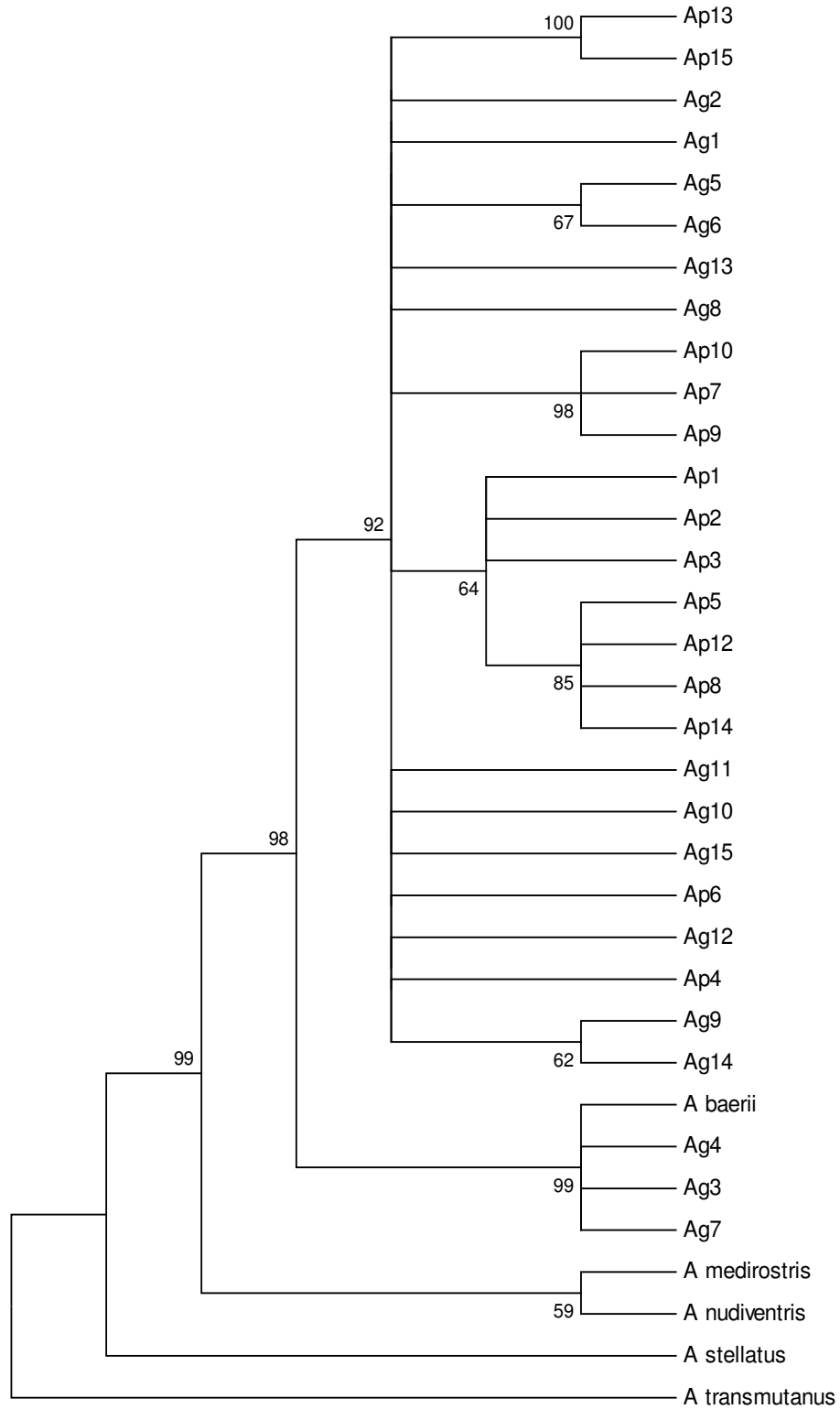
تصویر ۱۱- برش ژن سیتوکروم b با استفاده از آنزیم ACC I و RcoR I
ستونهای Ap مربوط به گونه تاسماهی ایرانی و ستونهای Ag مربوط
به گونه تاسماهی روسی

مقایسه توالی سیتوکروم b دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی

مقایسه فیلوژنی دو گونه تاسماهی ایرانی با استفاده از روش Maximum Parsimony (Nei & Kumar, 2000):
در این روش دندروگرام به نحوی ترسیم می شود که تعداد تغییر حالت خصوصیات به حداقل برسد. هر فرضیه‌ای که به حداقل تغییر در حالت خصوصیات طی سلسله مراتب درختی نیاز داشته باشد معتبرتر است. به اصول حاکم بر این موضوع قانون Parsimony گفته می شود. نتایج بررسیهای فیلوژنیک ژن سیتوکروم b با ۱۵ نمونه ایرانی و ۱۵ نمونه روسی نشان داد که این نمونه ها هیچکدام کلاستر جدا تشکیل نمی دهند اما از نظر حفظ شدگی این ژن بسیار حفظ شده می باشد بطوریکه نمونه *Acipenser baerii* که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته بود بسیار مشابه نمونه های ایرانی و روسی بود و کلاستر جدا تشکیل نداد.



نمودار ۱- دندروگرام Maximum Parsimony بین تاسماهی ایرانی و روسی با ۱۰۰۰ بار تکرار
با استفاده از ژن Cyt b



نمودار ۲- دندروگرام UPGMA بین تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از ژن سیتوکروم

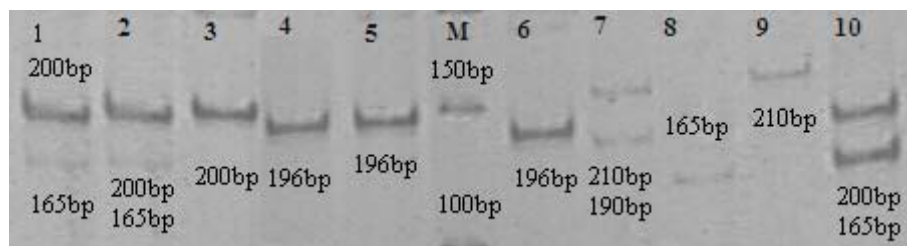
۲-۴- نتایج مایکروستلایت

نتایج مایکروستلایت:

بر اساس ارزیابی انجام شده، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی به دو روش الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و اسپکتوفتومتری (نانودراپ) مشخص گردید که DNA استخراج شده از مطلوبیت کافی برای آزمایشات بعدی برخوردار است. نتایج حاصل از آغازگرهای مایکروستلایت شرح ذیل میباشد:

پرایمر - AfuG9

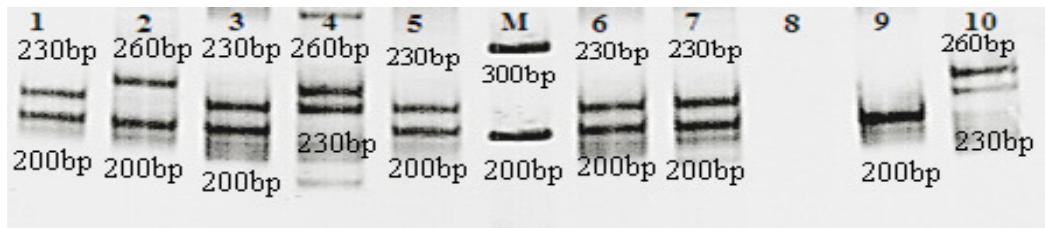
در این بررسی ۶ الی مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۶۵ جفت باز و حداکثر ۲۱۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و ایرانی برابر با ۱۶۵ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۰۰ جفت باز بود و در تاسماهی ایرانی نیز ۲۰۰ جفت باز بود (تصویر ۱۲). نتایج حاصل از این پرایمر نشان داد که تاسماهی ایرانی و روسی از نظر اندازه و تعداد الیها الگوی باندهای مشابه دارند با این تفاوت که یک نمونه از تاسماهی روسی یک باند ۲۱۰ جفت بازی نشان داد (نمونه شماره ۹) که در نمونه های تاسماهی ایرانی مشاهده نشد. الگوی باند ها حالت دیسومیک را نشان می دادند.



تصویر ۱۲- الگوی پرایمر AfuG9 در تاسماهی ایرانی در ستونهای (۵-۱) و در تاسماهی روسی (ستونهای ۱۰-۶)، مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر - AfuG56

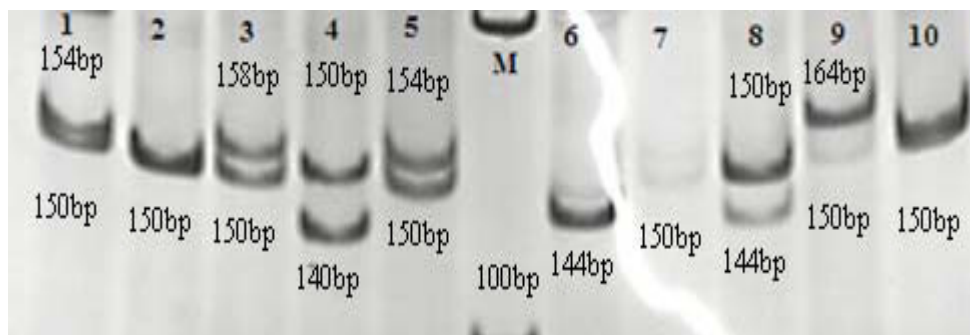
در این بررسی ۴ الی مورد شناسایی که حداقل اندازه آللی ۲۰۰ جفت باز و حداکثر ۲۶۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۱۳). حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و ایرانی برابر با ۲۰۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و ایرانی نیز برابر با ۲۶۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند. تنوع و اندازه الی در هر دو گروه تاسماهی ایرانی و روسی مشابه هم بود.



تصویر ۱۳- الگوی پرایمر AfuG 56 در تاسماهی ایرانی در ستونهای (۵-۱) و در تاسماهی روسی (ستونهای ۱۰-۶)، مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفوز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی بانیترات نقره

پرایمر AfuG63

در این بررسی ۶ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۴۰ جفت باز و حداکثر ۱۶۴ جفت باز بود. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آلهها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و ایرانی برابر با ۱۴۰ جفت باز و تاسماهی روسی ۱۴۴ بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۶۴ جفت باز بود در حالی که در تاسماهی ایرانی ۱۵۸ جفت باز بود (تصویر ۱۴). الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان میدادند. در نمونه های تاسماهی روسی یک باند ۱۶۴ جفت بازی مشاهده شد که در نمونه های تاسماهی ایرانی وجود نداشت. از طرفی در نمونه های تاسماهی ایرانی باندی ۱۴۰ جفت بازی مشاهده شد که در نمونه های روسی دیده نشد.

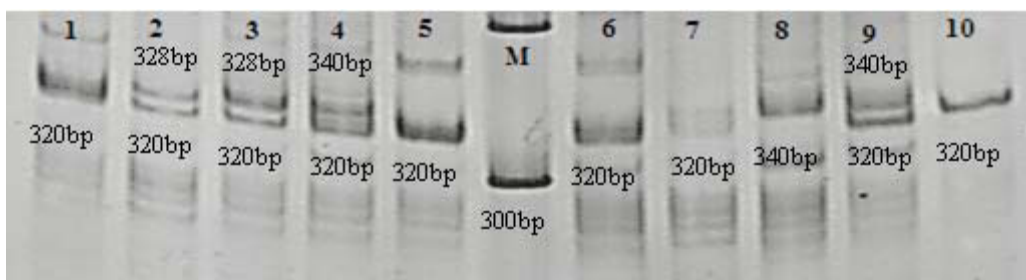


تصویر ۱۴- الگوی پرایمر AfuG 63 در تاسماهی ایرانی در ستونهای (۵-۱) و در تاسماهی روسی (ستونهای ۱۰-۶)، مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفوز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی بانیترات نقره

پرایمر AfuG66

در این بررسی 3 آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۳۲۰ جفت باز و حداکثر ۳۴۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آلهها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۱۵). تعداد وتنوع اللهها در هر دو گروه تاسماهی ایرانی روسی مشابه بود و حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و ایرانی برابر با ۳۲۰ جفت باز بود،

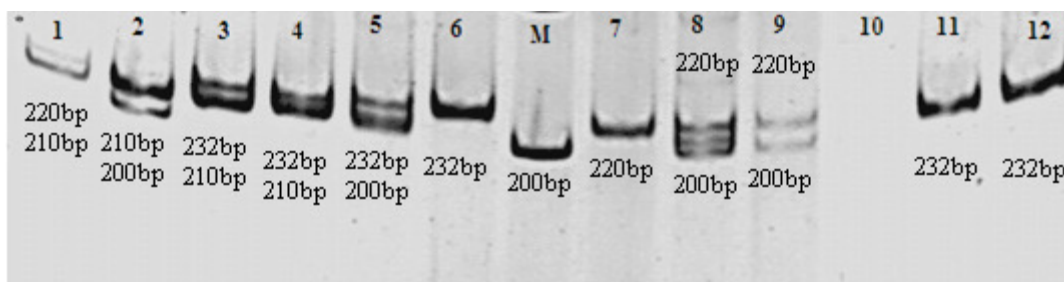
حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۳۴۰ جفت باز و در تاسماهی ایرانی نیز ۳۴۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند.



تصویر ۱۵- الگوی پرایمر AfuG 66 در تاسماهی ایرانی در ستونهای (۵-۱) و در تاسماهی روسی (ستونهای ۱۰-۶)، مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 67

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۰۰ جفت باز و حداکثر ۲۳۰ جفت باز بوده است (تصویر ۱۶). از ۱۲ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۰۰ جفت باز بود و تاسماهی ایرانی ۲۱۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۳۰ جفت باز بود. الگوی باندها در هر دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی از نظر تعداد و اندازه باندها مشابه بود و حالت تتراسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۵).



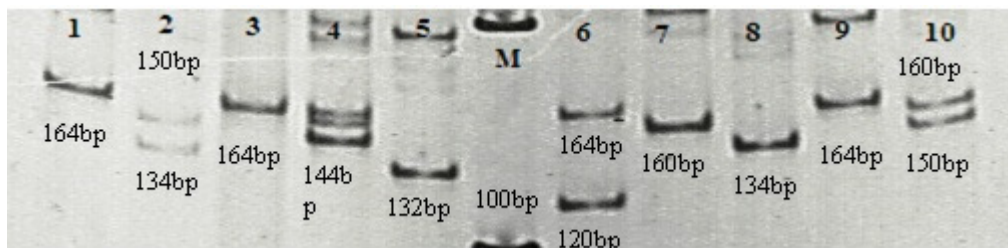
تصویر ۱۶- الگوی پرایمر AfuG 67 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۶) و تاسماهی روسی (ستونهای ۷-۱۲) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

جدول ۲۵، اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

توع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه	
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱	پرایمر	گونه
دیسومیک	۲۰۰	۲۱۰	۱۶۵	۲۱۰	۱۹۰	۱۹۵	۱۹۵	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	AfuG 9	۱
	۱۶۵	۲۱۰	۱۶۵	۱۸۶	۱۹۰	۱۹۵	۱۹۵	۲۰۰	۱۶۵	۱۶۵		
دیسومیک	۲۶۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۳۰	۲۳۰	۲۳۰	۲۶۰	۲۳۰	۲۶۰	۲۳۰	AfuG 56	۲
	۲۳۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۳۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰		
دیسومیک	۱۵۰	۱۶۴	۱۵۰	۱۵۰	۱۴۴	۱۵۴	۱۵۰	۱۵۸	۱۵۰	۱۵۴	AfuG 63	۳
	۱۵۰	۱۵۰	۱۴۴	۱۵۰	۱۴۴	۱۵۰	۱۴۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰		
تتراسومیک	۳۲۰	۳۴۰	۳۴۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۴۰	۳۲۸	۳۲۸	۳۲۰	AfuG 66	۴
	۳۲۰	۳۲۰	۳۴۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰		
تتراسومیک	۲۳۲	۲۳۲	۲۲۰	۲۲۰	۲۲۰	۲۳۲	۲۳۲	۲۳۲	۲۱۰	۲۲۰	AfuG 67	۵
	۲۳۲	۲۳۲	۲۰۰	۲۰۰	۲۲۰	۲۳۲	۲۱۰	۲۱۰	۲۰۰	۲۱۰		

پرایمر AfuG 68

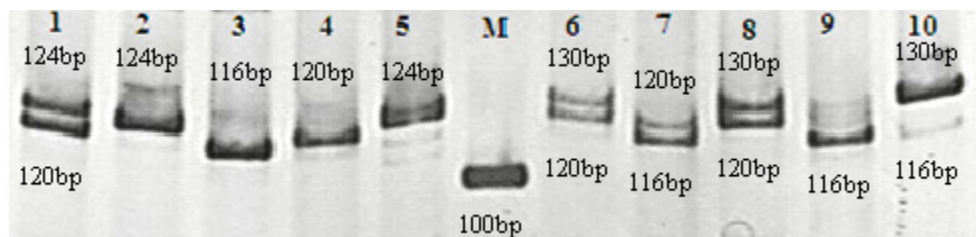
در این بررسی ۷ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۲۰ جفت باز و حداکثر ۱۶۴ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده تمامی آللها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۱۷). حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۲۰ جفت باز بود و تاسماهی ایرانی ۱۴۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۶۴ جفت باز بود. تعداد و اندازه آللها در هر دو گروه تقریباً مشابه بود با این تفاوت که تاسماهی روسی شماره ۶ دارای باندهای ۱۲۰ جفت باز بود که در باقی تاسماهیان دیده نشد. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. (جدول ۲۶).



تصویر ۱۷- الگوی پرایمر AfuG 68 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 74

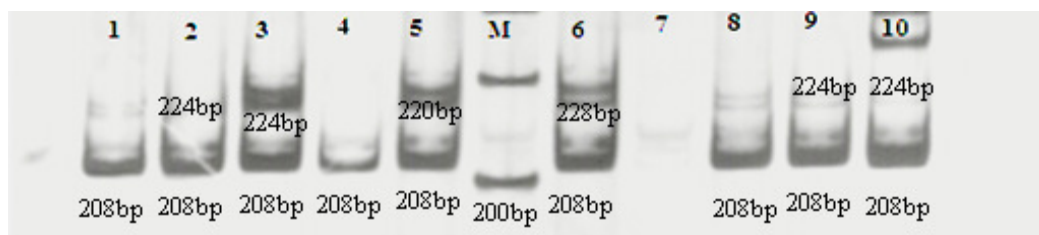
همان طور که در تصویر ۱۵ مشاهده می شود، در این بررسی ۵ آلل شناسایی شد که حداقل اندازه آللی ۱۱۶ جفت باز و حداکثر ۱۳۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۲۰ و تاسماهی ایرانی ۱۱۶ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۳۰ و تاسماهی ایرانی ۱۲۴ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند، از طرفی تعداد اللها در هر دو گروه برابر با ۴ الل بود (جدول ۲۶). با این تفاوت که در تاسماهی روسی الل ۱۳۰ جفت بازی مشاهده شد که در نمونه های ایرانی دیده نشد.



تصویر ۱۸- الگوی باند پرایمر AfuG 74 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 95

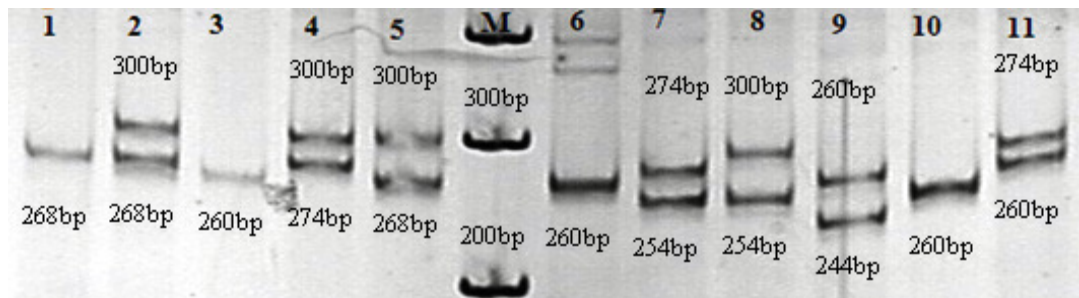
در این بررسی ۴ آلل مشاهده شد که حداقل اندازه آللی ۲۰۸ جفت باز و حداکثر ۲۲۴ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۱۹). حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۰۸ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۲۸ و تاسماهی ایرانی ۲۲۴ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۶).



تصویر ۱۹- الگوی پرایمر AfuG 95 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 112

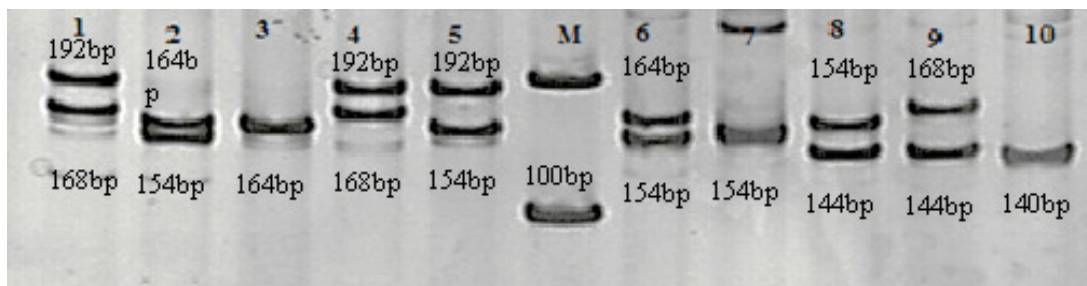
همانطور که در تصویر ۱۷ مشاهده می شود در این بررسی ۵ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۴۴ جفت باز و حداکثر ۳۰۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده تمامی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۴۴ و تاسماهی ایرانی ۲۶۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی تاسماهی ایرانی ۳۰۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند. ۴ الل در تاسماهی ایرانی و ۵ الل در تاسماهی روسی مشاهده شد (جدول ۲۶).



تصویر ۲۰- الگوی پرایمر AfuG 112 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 119

در این بررسی ۶ الل مشاهده شد که حداقل اندازه آللی ۱۴۰ جفت باز و حداکثر ۱۹۲ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۲۱). حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۴۰ و تاسماهی ایرانی ۱۵۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۷۶ و تاسماهی ایرانی ۱۹۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۶).



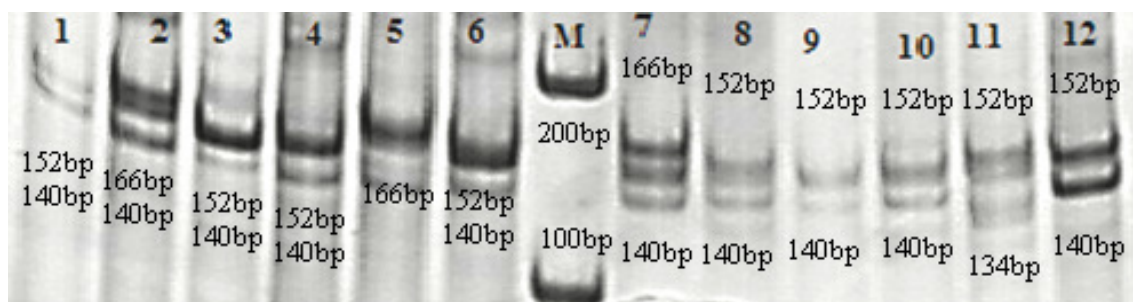
تصویر ۲۱- الگوی پرایمر AfuG 119 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

جدول ۲۶، اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

تووع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه	پرایمر
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱		
تترا سومیک	۱۶۴	۱۶۴	۱۳۴	۱۶۰	۱۶۴	۱۳۲	۱۶۰	۱۶۴	۱۵۰	۱۶۴	AfuG 68	۱
	۱۶۰	۱۶۴	۱۳۴	۱۶۰	۱۲۰	۱۳۲	۱۴۴	۱۶۴	۱۳۴	۱۶۴		
دیسومیک	۱۳۰	۱۱۶	۱۳۰	۱۲۰	۱۳۰	۱۲۴	۱۲۰	۱۱۶	۱۲۴	۱۲۴	AfuG 74	۲
	۱۱۶	۱۱۶	۱۲۰	۱۱۶	۱۲۰	۱۲۴	۱۲۰	۱۱۶	۱۲۴	۱۲۰		
تترا سومیک	۲۲۴	۲۲۴	۲۰۸	۲۰۸	۲۲۸	۲۲۰	۲۰۸	۲۲۴	۲۲۴	۲۰۸	AfuG 95	۳
	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸		
دیسومیک	۲۶۰	۲۶۰	۳۰۰	۲۷۴	۲۶۰	۳۰۰	۳۰۰	۲۶۰	۳۰۰	۲۶۸	AfuG 112	۴
	۲۶۰	۲۴۴	۲۵۴	۲۵۴	۲۶۰	۲۶۸	۲۷۴	۲۶۰	۲۶۸	۲۶۸		
دیسومیک	۱۴۰	۱۶۸	۱۵۴	۱۵۴	۱۶۴	۱۹۲	۱۹۲	۱۶۴	۱۶۴	۱۹۲	AfuG 119	۵
	۱۴۰	۱۴۴	۱۴۴	۱۵۴	۱۵۴	۱۵۴	۱۶۸	۱۶۴	۱۵۴	۱۶۸		

پرایمر AfuG 122

همانطور که در تصویر شماره ۲۲ مشاهده می شود ۴ آلل شناسایی شد که حداقل اندازه آللی ۱۴۰ جفت باز و حداکثر ۱۶۶ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شد. تمامی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۳۴ و تاسماهی ایرانی ۱۴۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۶۶ و تاسماهی ایرانی ۱۶۶ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۷).

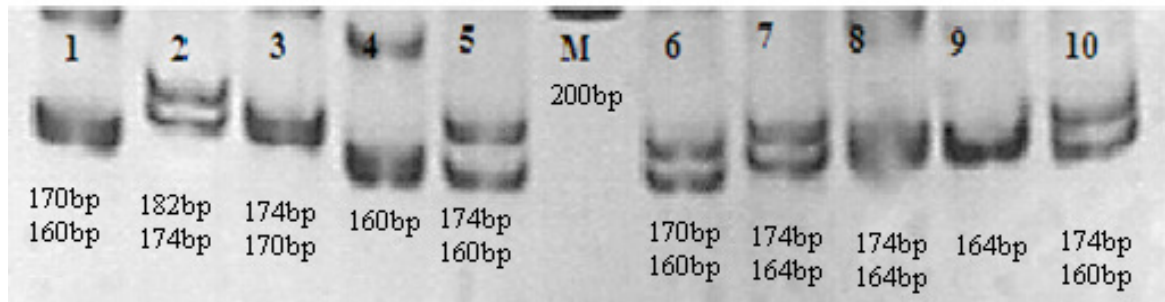


تصویر ۲۲- الگوی پرایمر AfuG 122 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نترات نقره

پرایمر AfuG 160

در این بررسی ۵ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۶۰ جفت باز و حداکثر ۱۸۲ جفت باز بوده است (تصویر ۲۳). از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی

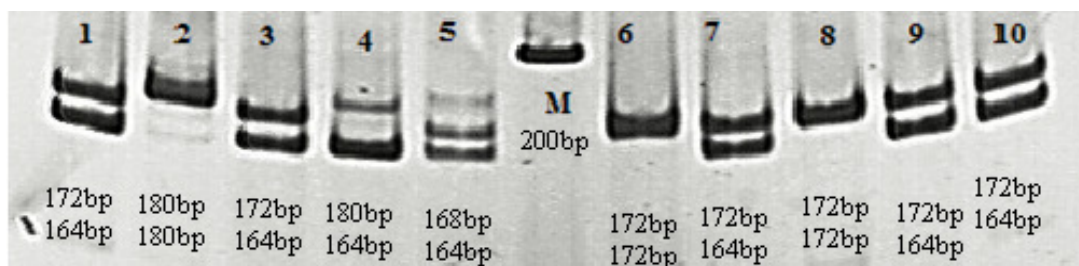
تاسماهی روسی ۱۶۰ و تاسماهی ایرانی ۱۶۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۶۸ و تاسماهی ایرانی ۱۸۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۷).



تصویر ۲۳- الگوی باند پرایمر AfuG ۱۶۰ در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 195

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۶۴ جفت باز و حداکثر ۱۸۰ جفت باز بوده است (تصویر ۲۴). از ۱۰ نمونه تاسماهی ایرانی و روسی بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۶۴ و تاسماهی ایرانی ۱۶۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۷۰ و تاسماهی ایرانی ۱۸۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. تاسماهیان روسی فقط دارای ۲ الل ۱۷۰ و ۱۶۴ جفت بازی بودند، در حالی که در نمونه های تاسماهی ایرانی ۴ الل مشاهده شد (جدول ۲۸).

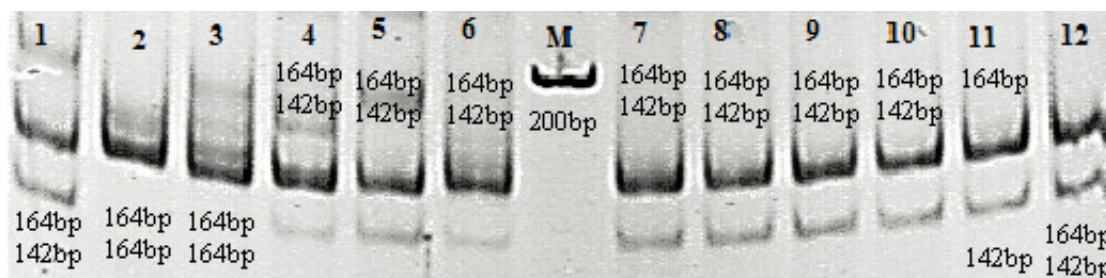


تصویر ۲۴- الگوی پرایمر AfuG ۱۹۵ در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AfuG 204

همانطور که در تصویر ۲۵ مشاهده می شود ۲ آلل مشخص شد که حداقل اندازه آللی ۱۴۲ جفت باز و حداکثر ۱۶۴ جفت باز بوده است. از ۱۲ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۴۲ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی

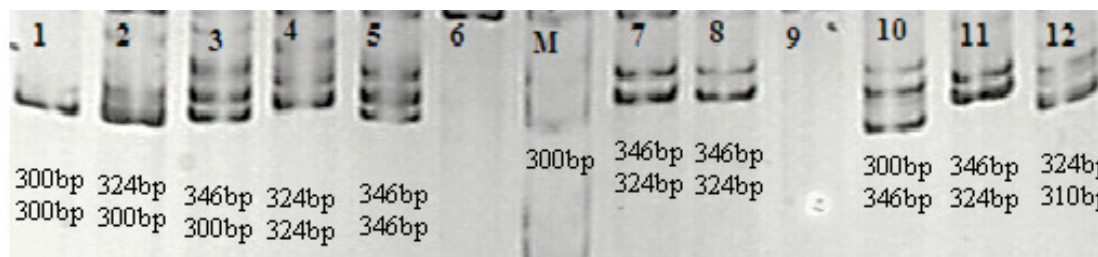
۱۶۴ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند. اندازه الیها در هر دو گروه تاسماهی ایرانی و روسی مشابه هم بودند (جدول ۲۷).



تصویر ۲۵- الگوی پرایمر ۲۰۴ AfuG در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۶) و تاسماهی روسی (ستونهای ۷-۱۲) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفوز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی با نترات نقره

پرایمر AfuG 229

در این بررسی ۵ آلل شناسایی شد که حداقل اندازه آللی ۳۰۰ جفت باز و حداکثر ۳۴۶ جفت باز بوده است (تصویر ۲۶). از ۱۲ نمونه بررسی شده، آلیها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۳۰۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۳۴۶ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. (جدول ۲۷).



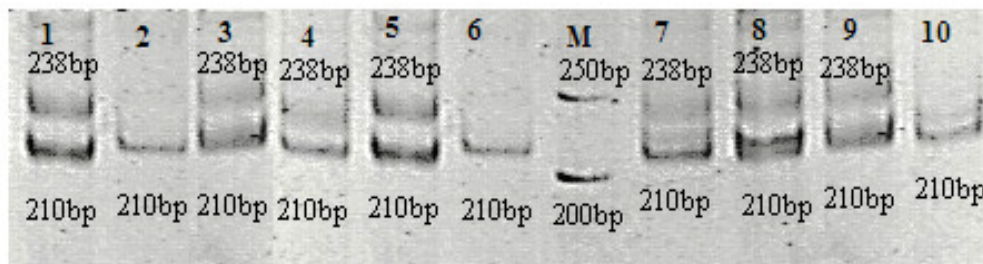
تصویر ۲۶- الگوی پرایمر AfuG 229 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۶) و تاسماهی روسی (ستونهای ۷-۱۲) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفوز بر روی ژل پلی اکریلامید و رنگ آمیزی با نترات نقره

جدول ۲۷، اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

توع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه	پرایمر
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱		
تتراسومیک	۱۵۲	۱۵۲	۱۵۲	۱۵۲	۱۶۶	۱۶۶	۱۵۲	۱۵۲	۱۶۶	۱۵۲	AfuG 122	۱
	۱۴۰	۱۳۴	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۶۶	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰		
دیسومیک	۱۷۴	۱۶۴	۱۷۴	۱۷۴	۱۷۰	۱۷۴	۱۷۴	۱۷۴	۱۸۲	۱۷۰	AfuG 160	۲
	۱۶۰	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۷۰	۱۷۴	۱۶۰		
دیسومیک	۱۷۲	۱۷۲	۱۷۲	۱۷۲	۱۷۲	۱۶۸	۱۸۰	۱۷۲	۱۸۰	۱۷۲	AfuG 195	۳
	۱۶۴	۱۶۴	۱۷۲	۱۶۴	۱۷۲	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۸۰	۱۶۴		
دیسومیک	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	AfuG 204	۴
	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۶۴	۱۶۴	۱۴۲		
تتراسومیک	۳۲۴	۳۴۶	۳۴۶	۳۴۶	۳۴۶	۳۴۶	۳۲۴	۳۴۶	۳۲۴	۳۰۰	AfuG 229	۵
	۳۱۰	۳۲۴	۳۰۰	۳۲۴	۳۲۴	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰		

پرایمر AfuG 241

در این بررسی ۵ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۱۰ جفت باز و حداکثر ۲۳۸ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند (تصویر ۲۷). حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۱۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۳۸ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند (جدول ۲۸).

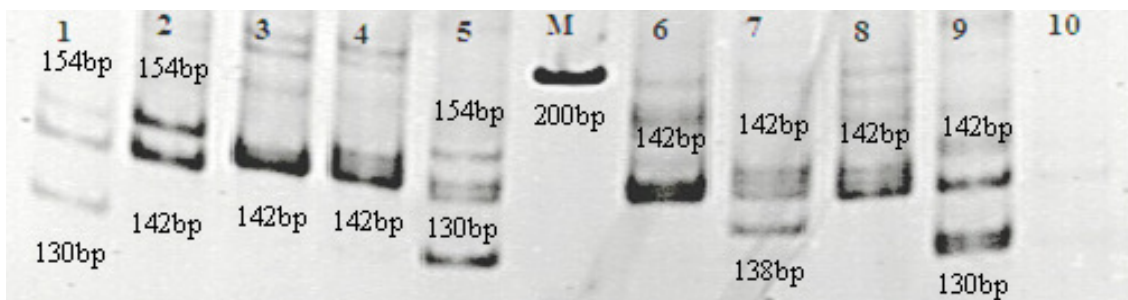


تصویر ۲۷- الگوی پرایمر AfuG 241 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 50 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر AoX 27

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۳۰ جفت باز و حداکثر ۱۵۴ جفت باز بوده است. آرایش آللی ۱۰ نمونه بررسی شده نشان داد که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۳۸ و تاسماهی ایرانی ۱۳۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۴۸

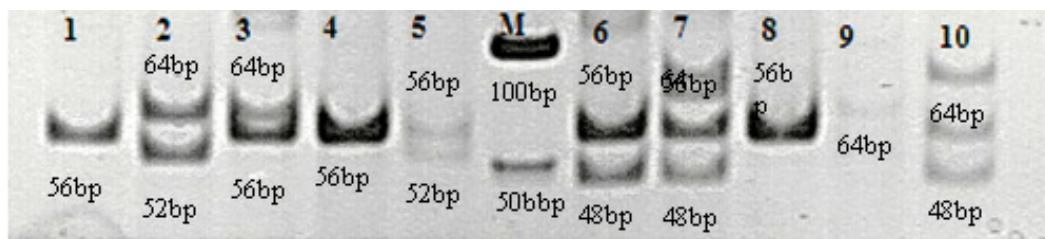
و تاسماهی ایرانی ۱۵۴ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۳ و در تاسماهی روسی ۴ بود (جدول ۲۸).



تصویر ۲۸- الگوی پرایمر AoX 27 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر LS 62

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۴۸ جفت باز و حداکثر ۶۴ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده تمامی آنها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۴۸ و تاسماهی ایرانی ۵۲ جفت باز بود، حداکثر اندازه الی تاسماهی روسی ۶۲ و تاسماهی ایرانی ۶۴ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۳ و در تاسماهی روسی ۴ بود (جدول ۲۸).

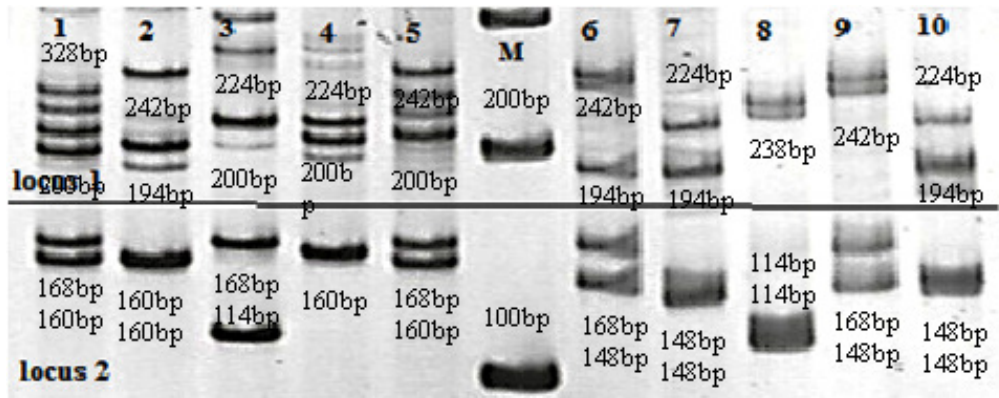


تصویر ۲۹- الگوی پرایمر LS 62 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 50 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر LS ۶۸

در این بررسی ۶ آلل در لوکوس ۱ و ۵ آلل در لوکوس ۲ مورد شناسایی قرار گرفته که از ۱۰ نمونه بررسی شده، در لوکوس ۱ حداقل اندازه آللی ۱۹۴ جفت باز و حداکثر ۲۴۲ جفت باز بوده است. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۹۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۴۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۶ و در تاسماهی روسی ۵ بود. در لوکوس ۲ حداقل اندازه آللی ۱۱۴ جفت باز و حداکثر ۱۶ جفت باز بوده است. از

۱۰ نمونه بررسی شده، حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۱۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۶۸ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۴ و در تاسماهی روسی ۳ بود (جدول ۲۸).



تصویر ۳۰- الگوی پرایمر LS 68 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی بانترات تفره

جدول ۲۸، اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

توع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه	
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱	پرایمر	
دیسومیک	۲۱۰	۲۳۸	۲۳۸	۲۳۸	۲۱۰	۲۱۰	۲۳۸	۲۳۸	۲۱۰	۲۳۸	AfuG241	۱
	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰		
تترا سومیک	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۵۴	۱۵۴	۱۴۲	۱۵۴	۱۵۴	AoX 27	۲
	۱۳۰	۱۳۰	۱۴۲	۱۳۸	۱۴۲	۱۳۰	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۲	۱۳۰		
تترا سومیک	۵۶	۶۴	۵۶	۵۶	۵۶	۵۶	۵۶	۶۴	۶۴	۵۶	LS 62	۳
	۴۸	۶۴	۵۶	۴۸	۴۸	۵۲	۵۶	۵۶	۵۲	۵۶		
تترا سومیک	۲۲۴	۲۴۲	۲۳۸	۲۲۴	۲۴۲	۲۴۲	۲۲۴	۲۲۴	۲۴۲	۲۳۸	LS 68(1)	۴
	۱۹۴	۲۴۲	۲۳۸	۲۰۰	۱۹۴	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۱۹۴	۲۰۰		
تترا سومیک	۱۴۸	۱۶۸	۱۱۴	۱۴۸	۱۶۸	۱۶۸	۱۶۰	۱۶۸	۱۶۰	۱۶۸	LS 68(2)	۵
	۱۴۸	۱۴۸	۱۱۴	۱۴۸	۱۴۸	۱۶۰	۱۶۰	۱۱۴	۱۶۰	۱۶۰		

پرایمر Spl 104

در این بررسی ۶ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۹۴ جفت باز و حداکثر ۲۷۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آلهها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی

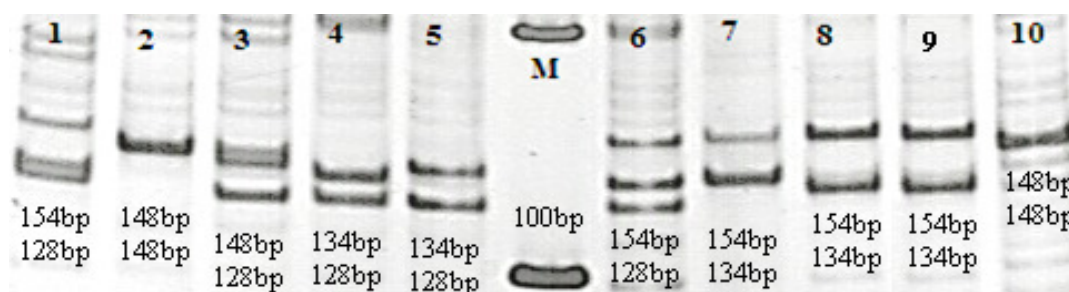
روسی و تاسماهی ایرانی ۱۹۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی نیز ۲۷۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۵ و در تاسماهی روسی ۶ بود (جدول ۲۹).



تصویر ۳۱- الگوی پرایمر Sps1 104 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر Sps1 105

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۳۰ جفت باز و حداکثر ۱۵۲ جفت باز بوده است. آرایش آللی ۱۰ نمونه بررسی شده نشان داد که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۱۳۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی نیز ۱۵۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۴ و در تاسماهی روسی ۴ بود (جدول ۲۹).



تصویر ۳۲- الگوی پرایمر Sps1 105 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر Sps1 113

در این بررسی ۵ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۸۴ جفت باز و حداکثر ۳۱۴ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده آرایش آللی به شرح ذیل بوده است، که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۸۴ و تاسماهی ایرانی ۲۸۴ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی

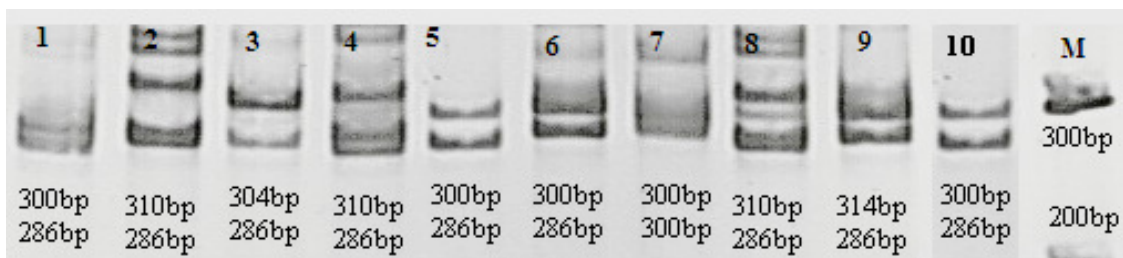
تاسماهی روسی ۳۱۴ و تاسماهی ایرانی ۳۱۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۴ و در تاسماهی روسی ۵ بود (جدول ۲۹).



تصویر ۳۳- الگوی پرایمر Spt 113 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نترات نقره

پرایمر Spt 120

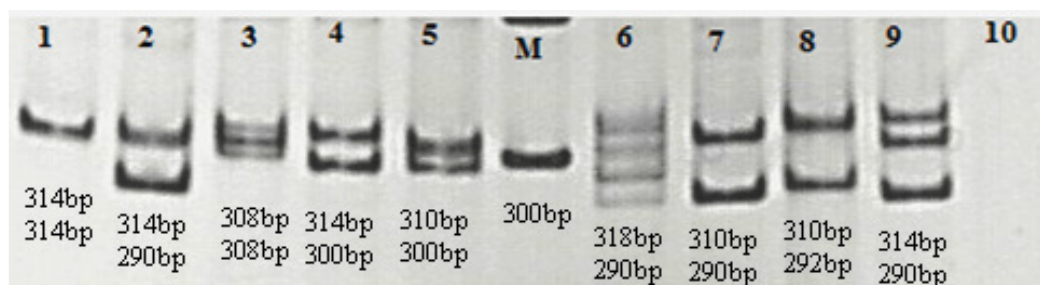
در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۸۶ جفت باز و حداکثر ۳۱۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده آرایش آللی به شرح ذیل بوده است، که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۸۶ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۳۰۰ و تاسماهی ایرانی ۳۱۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۴ و در تاسماهی روسی ۳ بود (جدول ۲۹).



تصویر ۳۴- الگوی باند پرایمر Spt 120 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نترات نقره

پرایمر Spt 163

در این بررسی ۴ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۹۰ جفت باز و حداکثر ۳۱۴ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده آرایش آللی به شرح ذیل بوده است، که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۹۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی روسی ۳۱۴ و تاسماهی ایرانی ۳۱۰ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۳ و در تاسماهی روسی ۴ بود (جدول ۲۹).



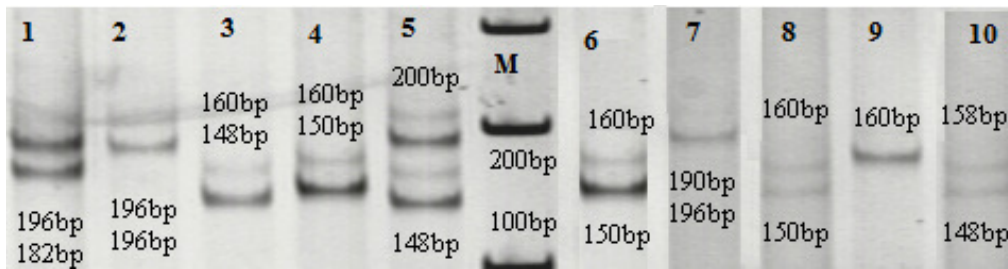
تصویر ۳۵- الگوی پرایمر Spl 163 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نترات نقره

جدول ۲۹، اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

توع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه پرایمر	
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱		
تترا سومیک	۲۲۴	۲۲۴	۲۲۴	۲۷۰	۲۵۲	۲۲۴	۲۵۲	۲۷۰	۲۲۴	۲۵۲	Spl 104	۱
	۲۱۰	۲۱۰	۱۹۴	۱۹۴	۲۲۴	۲۲۴	۱۹۴	۲۰۰	۲۱۰	۲۰۰		
تترا سومیک	۱۴۸	۱۵۴	۱۵۴	۱۵۴	۱۵۴	۱۳۴	۱۳۴	۱۴۸	۱۴۸	۱۵۴	Spl 105	۲
	۱۴۸	۱۳۴	۱۳۴	۱۳۴	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۴۸	۱۲۸		
تترا سومیک	۳۰۰	۳۱۰	۳۰۶	۳۰۰	۳۱۴	۳۱۰	۲۸۴	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	Spl 113	۳
	۲۸۴	۳۰۰	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴	۲۸۴		
تترا سومیک	۳۱۰	۳۱۴	۳۱۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۱۰	۳۰۴	۳۱۰	۳۰۰	Spl 120	۴
	۳۱۰	۲۸۶	۲۸۶	۳۰۰	۲۸۶	۲۸۶	۲۸۶	۲۸۶	۲۸۶	۲۸۶		
تترا سومیک	۳۱۰	۳۱۴	۳۱۰	۳۱۰	۳۱۸	۳۱۰	۳۱۴	۳۰۸	۳۱۴	۳۱۴	Spl 163	۵
	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۲	۲۹۰	۲۹۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۸	۲۹۰	۳۱۴		

پرایمر Spl 168

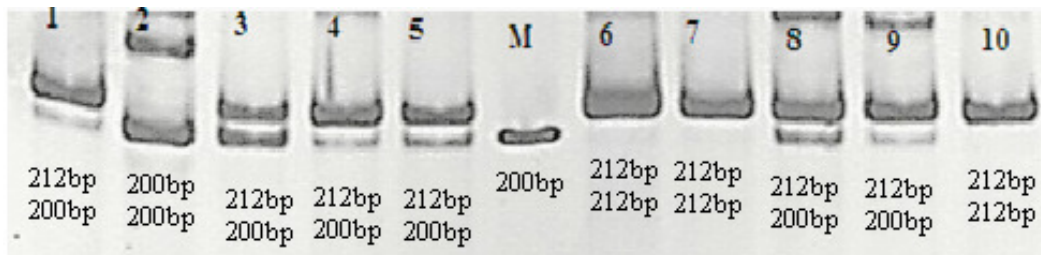
در این بررسی ۶ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۱۴۸ جفت باز و حداکثر ۲۰۰ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده آرایش آللی به شرح ذیل بوده است، که همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۱۵۴ و تاسماهی ایرانی ۱۴۸ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی ایرانی ۲۰۰ و تاسماهی روسی ۱۹۶ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۴ و در تاسماهی روسی ۴ بود (جدول ۳۰).



تصویر ۳۶- الگوی پرایمر Spl 168 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر Spl 170

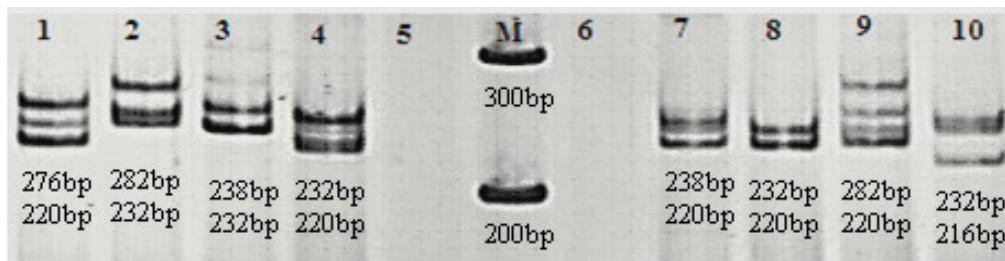
در این بررسی ۲ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۰۰ جفت باز و حداکثر ۲۱۲ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده همگی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی و تاسماهی ایرانی ۲۰۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی ۲۱۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی و در تاسماهی روسی ۲ بود (جدول ۳۰).



تصویر ۳۷- الگوی پرایمر Spl 170 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

پرایمر Spl 173

در این بررسی ۷ آلل مورد شناسایی قرار گرفته که حداقل اندازه آللی ۲۱۶ جفت باز و حداکثر ۲۸۲ جفت باز بوده است. از ۱۰ نمونه بررسی شده تمامی آللها در یک لوکوس قرار داشتند. حداقل اندازه آللی تاسماهی روسی ۲۱۶ و تاسماهی ایرانی ۲۲۰ جفت باز بود، حداکثر اندازه آللی تاسماهی ایرانی ۲۸۲ و تاسماهی روسی ۲۸۲ جفت باز بود. الگوی باندها حالت تتراسومیک را نشان می دادند. میزان فراوانی آللی در تاسماهی ایرانی ۵ و در تاسماهی روسی ۶ بود (جدول ۳۰).



تصویر ۳۸- الگوی پرایمر Spl 173 در تاسماهی ایرانی (ستونهای ۱-۵) و تاسماهی روسی (ستونهای ۶-۱۰) و M مارکر مولکولی 100 bp پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره

جدول ۳۰، اندازه آلی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی

توع پرایمر	تاسماهی روسی					تاسماهی ایرانی					گونه	
	۵	۴	۳	۲	۱	۵	۴	۳	۲	۱	پرایمر	گونه
تترا سومیک	۱۵۸	۱۶۰	۱۶۰	۱۹۶	۱۶۰	۲۰۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۹۶	۱۹۶	Spl 168	۱
	۱۴۸	۱۶۰	۱۵۰	۱۹۶	۱۵۰	۱۴۸	۱۵۰	۱۴۸	۱۹۶	۱۸۲		
دیسومیک	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۰۰	۲۱۲	Spl 170	۲
	۲۱۲	۲۰۰	۲۰۰	۲۱۲	۲۱۲	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰		
تترا سومیک	۲۳۲	۲۸۲	۲۳۲	۲۳۸	۲۳۸	۲۳۸	۲۳۲	۲۳۸	۲۸۲	۲۷۶	Spl 173	۳
	۲۱۶	۲۲۰	۲۲۰	۲۲۰	۲۳۲	۲۳۲	۲۲۰	۲۳۲	۲۳۲	۲۲۰		

تعیین میزان چند شکلی (پلی مورفیسم) با استفاده از تعداد الل واقعی (Na) و الل موثر (Ne) می باشد. الل های واقعی (Na) یعنی تعداد الل های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی می باشد. این معیار تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و این امکان وجود دارد که در آزمایشات مختلف با تعداد نمونه های مختلف، تعداد الل های واقعی مختلفی برای یک جایگاه (لوکوس) بدست آید. درحالیکه الل های موثر (Ne) بیانگر تعداد الل هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می کنند. در این بررسی بیشترین تعداد الل مشاهده شده (۷الل) مربوط به جایگاه AfuG 68 بوده و کمترین تعداد الل مشاهده شده مربوط به جایگاه Spl 170، AfuG 204 و AfuG 241 با دو الل مشاهده شد. تعداد ۱۱ لوکوس حالت دیسومیک را نشان دادند و ۱۶ لوکوس تراسومیک بودند (جدول ۳۱). لوکوس های AfuG-110، AfuG-135 و AfuG 175 باندهای واضح و قابل شمارشی را تولید نکردند.

جدول ۳۱- تعداد ایل واقعی (Na) و موثر (Ne) تاسماهی ایرانی و روسی در ۲۷ جایگاه پلی مورفیک بررسی شده

توع لوکوس	تاسماهی ایرانی		تاسماهی روسی		گونه جایگاه	ردیف
	Na	Ne	Na	Ne		
دیسومیک	3.000	2.778	4.000	3.333	AfuG 9	۱
دیسومیک	3.000	2.632	3.000	2.174	AfuG 56	۲
دیسومیک	4.000	2.941	3.000	2.174	AfuG 63	۳
دیسومیک	3.000	2.632	3.000	2.941	AfuG 74	۴
دیسومیک	4.000	3.333	5.000	3.125	AfuG 112	۵
دیسومیک	4.000	3.846	5.000	3.846	AfuG 119	۶
دیسومیک	4.000	2.941	4.000	2.941	AfuG 160	۷
دیسومیک	4.000	3.333	2.000	1.724	AfuG 195	۸
دیسومیک	2.000	1.724	2.000	2.000	AfuG 204	۹
دیسومیک	2.000	1.724	2.000	1.724	AfuG 241	۱۰
دیسومیک	2.000	1.923	2.000	1.471	Spl 170	۱۱
تتراسومیک	3.000	1.852	2.000	1.923	AfuG 66	۱۲
تتراسومیک	4.000	2.941	3.000	2.632	AfuG 67	۱۳
تتراسومیک	5.000	3.846	4.000	3.333	AfuG 68	۱۴
تتراسومیک	3.000	1.852	2.000	1.724	AfuG 95	۱۵
تتراسومیک	3.000	2.941	4.000	2.941	AfuG 122	۱۶
تتراسومیک	4.000	2.941	4.000	2.941	AfuG 229	۱۷
تتراسومیک	3.000	2.632	3.000	2.632	LS 62	۱۸
تتراسومیک	5.000	3.846	5.000	4.545	LS 68(1)	۱۹
تتراسومیک	3.000	2.174	3.000	2.273	Ls 68 (2)	۲۰
تتراسومیک	6.000	5.000	5.000	3.846	Spl 104	۲۱
تتراسومیک	4.000	3.333	4.000	3.846	Spl 105	۲۲
تتراسومیک	3.000	2.174	5.000	3.846	Spl 113	۲۳
تتراسومیک	4.000	2.941	4.000	3.571	Spl 120	۲۴
تتراسومیک	5.000	3.846	4.000	3.333	Spl 163	۲۵
تتراسومیک	6.000	5.000	4.000	2.941	Spl 168	۲۶
تتراسومیک	5.000	3.846	5.000	4.167	Spl173	۲۷
	3.714	2.991	3.571	2.869	میانگین	

از معیارهای که برای تعیین میزان چند شکلی (پلی مورفیسم) جایگاهها استفاده می شود تعداد الل واقعی و موثر است. بیشترین تعداد الل مشاهده شده متعلق به تاسماهی ایرانی با میانگین ۳/۷۱۴ الل می باشد درحالیکه تاسماهی روسی با میانگین ۳/۵۷۱ الل بود. در تاسماهی ایرانی بیشترین تعداد الل موثر در جایگاه Spl 104 (۵ الل) و کمترین میزان در جایگاه AfuG 204 و AfuG 241 (۱/۷۲۴) مشاهده شد، در تاسماهی روسی بیشترین تعداد الل موثر در جایگاه LS 68 (۴/۵۴۵) کمترین میزان در جایگاه Spl 170 (۱/۴۷۱) مشاهده شد. همچنین تعداد الل موثر با میانگین ۲/۹۹۱ در تاسماهی ایرانی مشاهده گردید که در نمونه تاسماهی روسی ۲/۸۶۹ بود. فاصله ژنتیکی با استفاده از مارکر میکروستلایت

شباهت و فاصله ژنتیکی :

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei,1972) بوسیله نرم افزار TFPGA محاسبه گردید. در این ماتریس فاصله ژنتیکی بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی ۰/۳۲۲ و شباهت ژنتیکی ۰/۷۲۴ بدست آمد. برای محاسبه فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار GenAlex در این آنالیز میزان اختلافهای بانندی در هر نمونه به صورت فاصله ژنتیکی تخمین زده می شود که به شکل ماتریسی در جدول ۳۲ آمده است. بنابر این بسته به میزان تفاوت باندها، اختلافهای درون گونه ای و بین گونه ای به صورت فاصله ژنتیکی مشخص می شود.

جدول ۳۲- فاصله ژنتیکی درون گونه ای و بین گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از مارکر

میکروستلایت

	A.p1	A.p2	A.p3	A.p4	A.p5	A.g1	A.g2	A.g3	A.g4	A.g5
A.p1	0									
A.p2	6.403	0								
A.p3	5.916	6.480	0							
A.p4	5.291	6.164	6.244	0						
A.p5	6.082	6.164	6.630	5.830	0					
A.g1	6.324	6.855	6.244	6.557	6.480	0				
A.g2	000.6	6.855	6.630	6.000	6.708	6.082	0			
A.g3	6.244	7.071	6.708	5.910	7.211	6.082	6.403	0		
A.g4	6.928	6.782	6.480	6.780	6.855	6.244	6.557	6.403	0	
A.g5	6.928	6.403	6.082	6.324	6.557	6.000	6.000	6.928	6.557	0

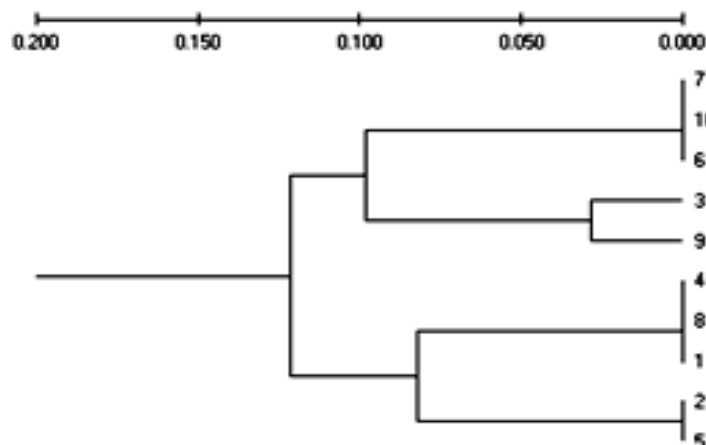
الف) تاسماهی ایرانی: بیشترین فاصله ژنتیکی مشاهده شده در تاسماهیان ایرانی ۶/۴۸۰٪ بین تاسماهی ایرانی شماره ۲ و ۳ و کمترین فاصله ژنتیکی ۵/۲۹۱٪ بین تاسماهی ایرانی شماره ۱ و ۴ مشاهده شد. میانگین فاصله ژنتیکی بین تاسماهیان ایرانی ۶/۱۲۰٪ محاسبه شد.

ب) تاسماهی روسی: بیشترین فاصله ژنتیکی مشاهده شده در تاسماهیان روسی ۶/۹۲۸٪ بین تاسماهی روسی شماره ۳ و ۵ و کمترین فاصله ژنتیکی ۶/۰۰۰٪ بین تاسماهی روسی شماره ۵ با تاسماهی روسی ۱ و ۲ مشاهده شد. میانگین فاصله ژنتیکی بین تاسماهیان ایرانی ۶/۳۲۵٪ محاسبه شد.

تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای: بیشترین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای بین تاسماهی ایرانی شماره ۲ و تاسماهی روسی شماره ۳ مشاهده شد (۷/۰۷۱٪) و کمترین فاصله ژنتیکی بین تاسماهی ایرانی شماره ۴ و تاسماهی روسی شماره ۳ مشاهده شد (۵/۹۱۰٪). میانگین فاصله ژنتیکی بین تاسماهیان ایرانی ۶/۵۵۶٪ محاسبه شد.

رابطه خویشاوندی با استفاده از روش UPGMA

دندروگرام UPGMA بر اساس فواصل ژنتیکی که بین دو گونه با استفاده از نرم افزار TFPGA ترسیم شد. در این دندروگرام تاسماهی ایرانی در فاصله نسبتاً بیشتری از تاسماهی روسی قرار گرفت ولی به خاطر تنوع بالای میکروستلایتها مشاهده شده که یک نمونه از تاسماهی ایرانی (شماره ۳) درون کلاسترهای تاسماهیان روسی قرار گرفت و دیگر اینکه کلاسترهای ایجاد شده از تناسب درختی و هماهنگی شاخه‌ای برخوردار نبود (نمودار ۳).



نمودار ۳-دندروگرام UPGMA بر اساس روش (Nei's 1978) بین تاسماهی ایرانی (شماره ۱-۴) و تاسماهی روسی (شماره ۵-۹) با استفاده از مارکر میکروستلایت

تست AMOVA:

میانگین اختلاف ژنتیکی (Fst) در سطح احتمال ۹۵٪ بین تاسماهی ایرانی و روسی ۰/۰۴۵۴٪ تعیین گردید که این نشان دهنده آن است که تمایز و تفکیک ژنتیکی بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی معنی دار نمی باشد میزان Fst بین صفر تا یک محاسبه می شود، بدین ترتیب که هرچه مقدار بدست آمده نزدیک به صفر باشد نشان دهنده شباهت دو گونه است و هرچه به یک نزدیکتر باشد نشان دهنده دو گونه متفاوت است. برای جدایی

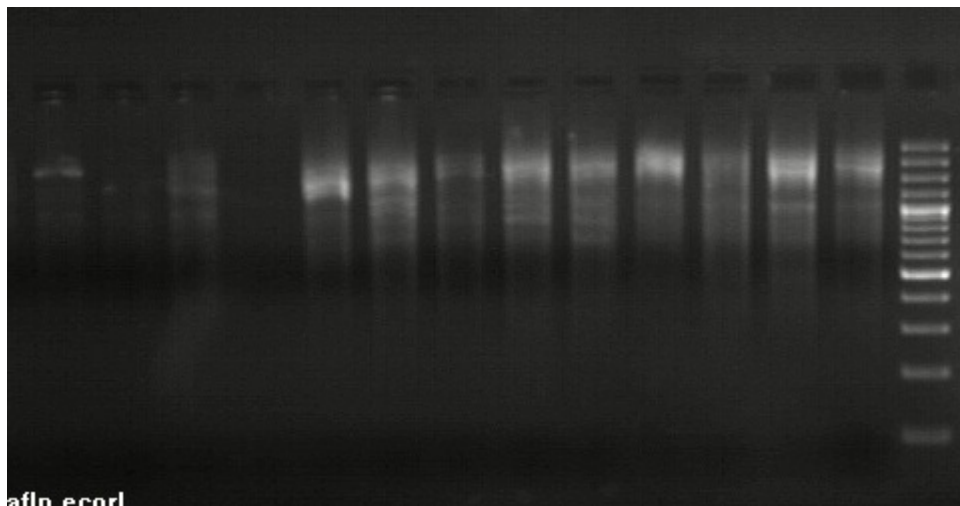
کامل دو گونه، F_{st} می بایست بیشتر از ۰/۵ باشد). در این بررسی در سطح احتمال ۰/۰۵، $F_{st}=۰/۰۴۵۴$ که کمتر از ۰/۵ است. از این رو این شاخص بیانگر که جدایی بسیار ضعیفی بین این دو گونه است.

۳-۴- نتایج روش AFLP

کیفیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد حاکی از وجود باندهای کاملاً واضح و یکدست بود که تمامی آنها فاقد هر گونه آلودگی RNA و پروتئین بودند. بدین منظور از نمونه هایی که بالاترین کیفیت و کمترین آلودگی را بر روی ژل آگارز نشان دادند برای انجام هضم استفاده گردید. مقادیر کمی DNA های استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ بر اساس جذب نوری مولکول DNA در محدوده ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. نسبت DNA های استخراج شده به پروتئین در محدوده ۲-۱/۸ میکرولیتر از کیفیت مناسبی برای PCR و هضم برخوردار می باشند به همین دلیل از نمونه هایی که دارای این کیفیت بودند برای هضم استفاده گردید.

هضم DNA کل با آنزیم برشی

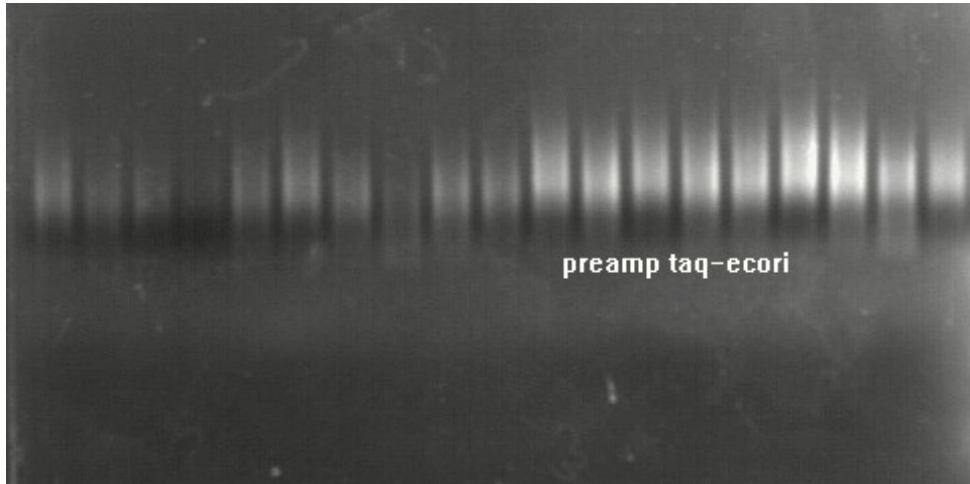
DNA کل با استفاده از دو جفت آنزیم برشی EcoRI/MseI و TaqI /PstI هضم و سپس بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. نتیجه هضم DNA به صورت اسمیر روی ژل مشاهده گردید.



تصویر ۳۹- هضم DNA کل با آنزیم های برشی پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید

الکتروفورز واکنش پیش تکثیر (Pre-amplification)

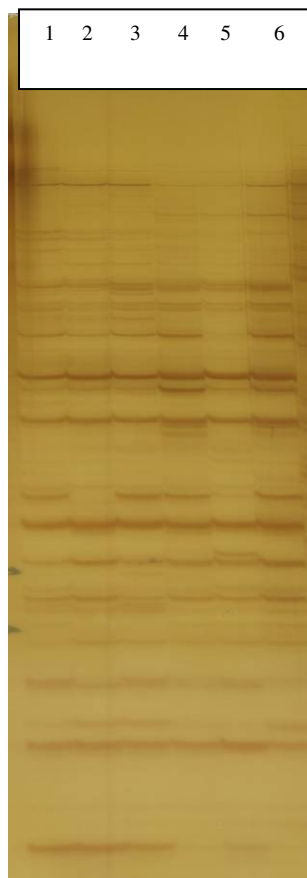
الکتروفورز محصول Pre-amplification بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد و در اثر تابش اشعه UV بر روی ژل آگارز باندها مشاهده گردیدند. باندهای به دست آمده بصورت اسمیر روی ژل آگارز مشاهده گردید.



تصویر ۴۰- تکثیر اولیه نمونه ها پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید

الکتروفورز واکنش تکثیر انتخابی

در این مرحله تکثیر انتخابی با ۹۸ جفت پرایمرهای مربوطه انجام شد و روی ژل اکریل آمید denature الکتروفورز گردید. همه پرایمرها در واکنش PCR تکثیر شدند و محدوده بانندی بین ۱۰۰۰-۵۰ جفت باز تولید کردند. با ارزیابی مقایسه ای باندهای حاصله از واکنش زنجیره ای پلیمرز هیچ کدام از پرایمرها باند شاخص و اختصاصی به یکی از دو گونه تولید نکرد و همه باندها در دو گونه مورد بررسی مشابه بود. گرچه ذکر این نکته ضروری است که در بعضی نمونه ها یکسری باندهای متمایز که عمدتاً تفاوت‌های فردی گونه ای را نشان میداد تولید گردید. از مجموع از ۹۸ جفت پرایمر مورد استفاده تعداد ۱۲۰۰ باند تولید گردید که هیچیک از باندها مربوط به گونه خاص نبود و فقط در حد تنوع تتیک و در سطح تفاوت‌های فردی بود. در ذیل محصول پس از الکتروفورز روی ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترا ت نقره بعنوان الگو ارائه میشود.



E-ATA,M-CATT پرایمر **AFLP** الگوی
(۱، ۲، ۳ تاسماهی ایرانی، ۴، ۵، ۶ تاسماهی روسی)

1 2 3 4 5 6



T(ACA)-P(AC)
۱،۲،۳ تاسماهی ایرانی، ۴،۵،۶
تاسماهی روسی

1 2 3 4 5 6 M

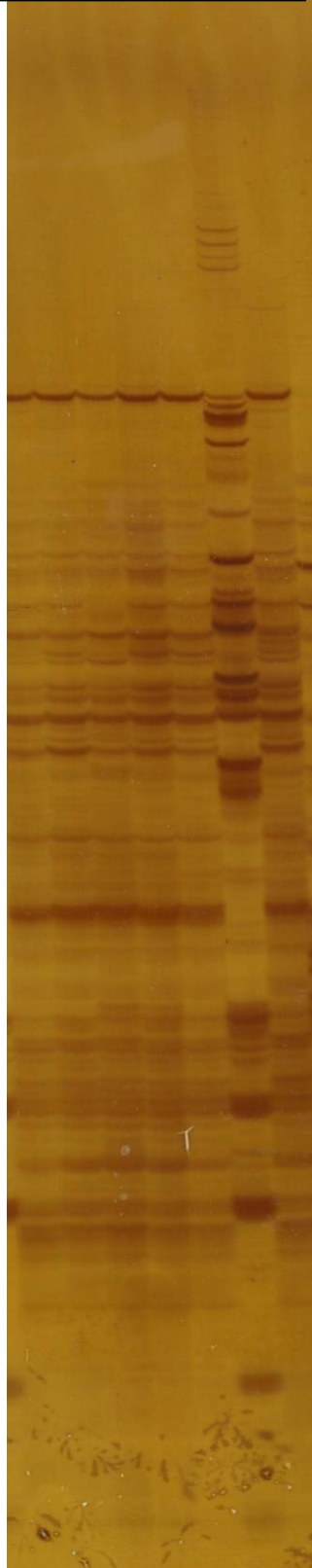


E-ACA, M-CGAT

نمونه های ۱ و ۲ و ۳. تاسماهی ایرانی

۴، ۵، ۶ تاسماهی روسی

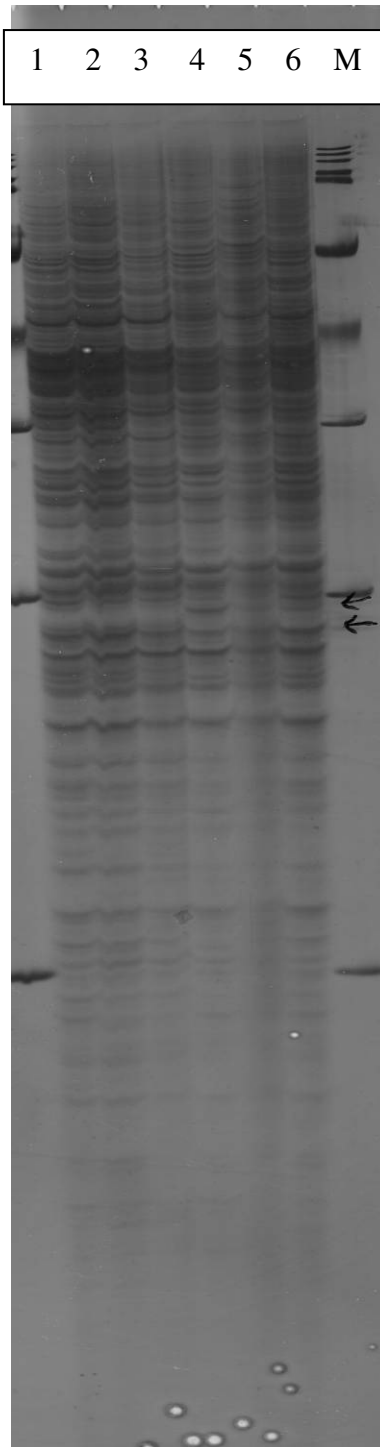
1 2 3 4 5 M 6



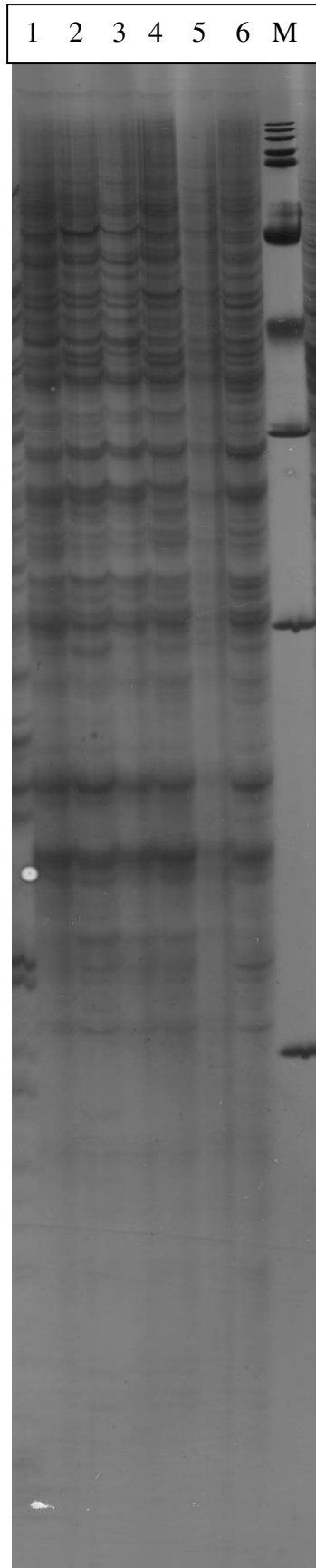
P(TC)-T(TG)

نمونه های ۱،۲،۳ تاسماهی ایرانی

۴،۵،۶ تاسماهی روسی



E(ATT)-M(CGTC)
ستونهای ۱،۲،۳ تاسماهی ایرانی، ۴،۵،۶
تاسماهی روسی



P(ACG)-T(GTC)
ستونهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ تاسماهی ایرانی و
۴، ۵، ۶، ۷ تاسماهی روسی

۴-۴- نتایج روش ND5

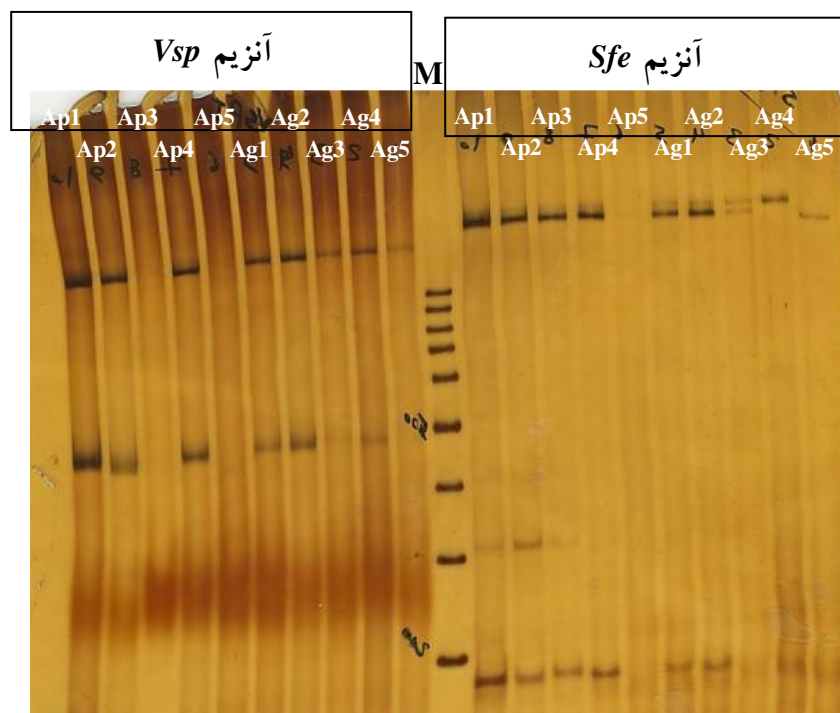
محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. نتایج حاصل از PCR نمونه های ND5 که باندهایی در محدوده ۱۶۶ جفت باز کرده بودند

Ap1 Ap2 Ap3 Ap4 Ap5 Ag1 Ag2 Ag3 Ag4 Ag5



تصویر ۴۱- محصول PCR تکثیر ژن ND5، ستونهای Ap مربوط به گونه تاسماهی ایرانی و ستونهای Ag مربوط به گونه تاسماهی روسی

جهت هضم آنزیمی ۳ میکرولیتر از محصول PCR با آنزیم های برشی Sfe I و Vsp I برش داده شد و سپس بر روی ژل پلی آکرلامید ۶٪ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.



تصویر ۴۲- قطع آنزیمی محصول PCR ژن ND5 با استفاده از آنزیم های Vsp I و Sfe I ستونهای Ap مربوط به گونه تاسماهی ایرانی و ستونهای Ag مربوط به گونه تاسماهی روسی

نتایج بررسی نشان داد که تفاوتی در الگوی باند DNA هضم شده ژن ND5 بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی مشاهده نگردید.

بررسیهای فیلژنیک روی ۵ نمونه ایرانی و روسی که با ژن ND5 نیز نتایج مشابه نشان داد بطوریکه نمیتوان از این دوژن برای تفکیک این دو گونه استفاده کرد.

ND5 f CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

ag1-fa---ANNNNNATATTTGCTCACCCCTCCTAATCATTTGCTCAATCCTCCTAATCATTTGCTC 57
ag3-fa ANNGNNNNNNNATCTGCTCACCCCTCCTAATCATTTGCTCAAGCCTCCTAATCATATGNGC 60
ag2-fa AGCTTNNATATNTGCTCACCTTCCTAATCATTTGCTCTAGCCTCCTAATCATTAGCTC 58
ap4-fa GNNCNANATTTACTCACCCCTCCTAATCATTTGCTC-ATCCTCCTAATCATTTGCTC 55
ap3-fa NNNNTNNATCATTTACTCACCCCTCCTAATCATTTGCTC-ATCCTCCTCATCATTTGCTC 57
ag4-fa NNNNNNNNCATNTGGTCACCCTCCTAATCATTTGCTCTATCCTCCTAATCATTTGCGC 58
ap1-fa NNNNCNANCANNNGGTCACCCTCCTAATCATTTGCTCTAGCCTCCTAATCATTTGCGC 59
ag5-fa NNNNTNNNNCATTTAGTCACCCTCCTAATCATTTGCTCAATCCTCCTAATCATTTTAGN 58
    
```

* * * * *

```

ag1-fa AAGCCTCCTAATCATTTGCTCATGCCCTCATCATAATCGCTTGCTCCCCCTCCTATT 117
ag3-fa ATGCCTAATAATCATATGCTTTAGCCCCATCCTCATATTCGTTTGCTCAACCCTCCTAAT 120
ag2-fa ATGCCCCCA-TCATAAGCTTTTGCCCCCTCCTCATAATCATATGCTCAACCCTCCTAAT 117
ap4-fa AACCTCCTAATCATTTGCTCAAGCCTCCTCATCATTTTCGCTTGCTCCCCATCCTTTG 115
ap3-fa ATGCCTCCTAATCATTTGCACTTGCCCCCTCCTCCTTTGCGCTTGCCCCCCCCCTCCTTT 117
ag4-fa AAGCCCCCA-TCATTTGCTCTTGCCCTCCTCATCATATTCGCATGCTCAACCATCCTAAT 117
ap1-fa AAGCCTCCA-TCATTTGCTCTTGCCCCCTCATCCTAATCTCATGCTCC-CCCTCATAAT 117
ag5-fa TTGCCCCCTCATCATAATCTCTTGCCCCCTCATCATAAGCGCTTGCTCAACCCTCATAAG 118
    
```

** * * * *

```

ag1-fa CTTTTGCTCCACCCTCCTAATCATATGCCTACCCCTCGTAATCATATGCTTATTCCCCCT 177
ag3-fa CTTTTGCTCAACCCCCCTAAGCTTTTCCCAAGCTCCCTAATCATTTGCTTATGCCTCCT 180
ag2-fa CATTGCCCCAACCCCCCTCATCCTATGCCTACGCCCTCATCCTATGCCTATGCCCCC 177
ap4-fa CTTTTGCTCCAGCCTCCTAATCTTTTGCCCACTCATCCTAATCATTTGCTCATTCTCCT 175
ap3-fa CTTTTGCCCCACCCTCCTTATCATTTGCCCCCCCCCTCCTATTATTGCCCCAACCTCCT 177
ag4-fa CATTGCCCCAACCCCCCTATTATTGCCCACCCCCCTAATCATATGCCCAACCCCCCT 177
ap1-fa CATTGCCCCAACCCCCCTAATCCTTTGCCCACCCCTCCTAATCCTTTGCCCAACCCTCCT 177
ag5-fa CATTGCCCCAACCCTCCTAATCATTTGCCCAACCCTCCTAATCATTTGCCCAACCCCCCT 178
    
```

* * * * *

```

ag1-fa ATTCATATTCACATCCCCCTCAATCTTGAGCATTACCCCATATTCTTATGCCTGTGCC 237
ag3-fa ATTCATATTCACATCCCCCTCAATCTTTAGCATTACCCCATATTCTTATTCTTTGCC 240
ag2-fa CTTCATATGCATATGCCCTCCATCTTAAGCAAAAGCCCATCCTCCATAATCCTGTGCC 237
ap4-fa TTTCATATGCTCATCCCTCTTAATCTTTAGCTCTACCCTCTTATTCTTATGCCATCCCC 235
ap3-fa TTTCCTTTGCCATCCCCCTATTCTTTTGCCCTACCCTCCTCATCTTATGCCATCCCC 237
ag4-fa ATTCATATGCCATCCCCCTAATCTTAAGCTCAACCCCATATTTCATATGCCATGCC 237
ap1-fa ATTCATATGCCAACCCCTCCTAATCATAAGCCCAACCCTCCTAATCATATGCCAAAGCC 237
ag5-fa AATCATTTGCTCAAGCCTCCTAATCATATGCTTTACCCTCCTAATCATTTGCCTATGCC 238
    
```

* * * * *

```

ag1-fa CTCCACCTTATTCGTTTGCTTTTACATCTTGCCCCGTGGCACATACACTCTAACCCCAAC 297
ag3-fa CTCCTCCTTATTCGTTTGCTTATCCATCTTGCCCCCTTGCCCCATCCCCCAACCCCTAAC 300
ag2-fa ATCCCCCTTAATCGTTTGCTTTTCCCCCTTGCCCCCTTGCCCCATCCCCCCCCCCCCCTAAC 297
ap4-fa CTTAATCTTATTCGCAACCTTCTAAATCTTGTCAGGCCCATACACCCCTAACCCCAAC 295
ap3-fa CTCCACCATTTTCGTTTCCCTTACATCTTATCCCTAGCCCCCTCCCCCTAACCCCAAC 297
ag4-fa CTCCTCTTATTCGTTTCCCTTACATCTTGTGCCCTTGCCCCATCCTCCTTAAGCCCTAAC 297
ap1-fa ATCCTCCATAGGCGTTTCCCTTTCTTCTTGTGCCCTTGCCCCATCCTCCTTAGCCCTAAC 297
ag5-fa CACCTTCATATGCTTTTGCCCTCACCCCTATAAGCCTTGCCCCATCCTCCTAAGCCCTAAC 298
    
```

* * * * *

```

ag1-fa CTAAACCGACTCTTCCAATATCTGCTCCTATTCTTGATTGCCCTAATTACCCTAGTCACA 357
    
```

ag3-fa CTAACCCACTCTTCCAATACCTGATCCTATTCTTGATTGCCCTAATTCCCCTAGTCACA 360
ag2-fa CTAACCCCTTCTCCAATAATCTTTTCTATTCTTATTGCCCTAATTCCCCTCCTCACA 357
ap4-fa CTAACCGTCTTTTCCAATATCTGCTCCTTCTTTTGCTTGGCCTAATTACCCTAGTCCCA 355
ap3-fa CCCAACCTCTTTTCCATTATCTTCTCCTTTTCTTGCTTGGCCTTATTCCCCTGTCCCT 357
ag4-fa CTCAACCTTCTTCCATTAGCTCCTCCTTCTTCTTGCTTGGCCTCATCCCCCTAGTCCCT 357
ap1-fa CCCAACCTTCTTTTCCATTGCCTCCTCCTCCTTCTTGCTTGGCCTTATTCCCCTAGTCCCA 357
ag5-fa CCCAACCTCCTATTCAATTAGCCATCCTCCATATTCTTATGCCCATGCCCTATTCTCT 358
* **** * * * * * * * * * * *

ag1-fa GCCACAACCTATTTTCAGCTGTTTCATCGGCCGAGAAGGAGTGGGCATTATATCTTTTCTA 417
ag3-fa GCCACAACCTATTTTCAGCTGTTTCATCGGCCGAGAAGGAGTGGGCATTATATCTTTTCTA 420
ag2-fa GCCACAACCTATTTCCGCTGTTTCTCGGCCGAAAACCCGTGGGCCTTATACCTTTCTA 417
ap4-fa GCCACAACATATTTTCAGCTGTTTCTCGGCCGACAAGGACTGGGCCTTATACCTTCTA 415
ap3-fa GCCCCAACCTTCTTTCAGCTGTTTCTCGGCCGCAAGGTCTGGGCCTTATCCCTCTCTA 417
ag4-fa AGCCCAACCTATTTTCAGCTGTTTCTCGGCCGACAAGGTCTGAGCCTTATCCCTCTCTA 417
ap1-fa TGCCACAACCTATTTAGGCTGTGCCTCGGCCGTCAAGGGCTTGGGCCTTATCCCTTTCTA 417
ag5-fa AAGCCCAACCCCAATAATCCTAAGCCAGCCCCACCTTCTAGGCTTAAGCCCTCTCT 418
* **** * * * * * * * * * * *

ag1-fa TTAATCGGGTGATGATACGGACGCGCGACGCCAACACCGCCGCCTTACAAGCAGTTATT 477
ag3-fa TTAATCGGGTGATGATACGGACGCGCAGACGCCAACACCGCCGCCTTACAAGCAGTTATT 480
ag2-fa TTAATCGGGTGCGAAACCCACGCCCGGATGCCAACATCGCCGTCTTACAAGTGGTTATT 477
ap4-fa TTTATCCGGTGACGACACGGACGCGCGACGCCAACACCGCCCCCTTACAAGCAGTTATT 475
ap3-fa TTAATCCGTTGGCGATACGGACGTGTGCACGCCACACTGCCCTTTGCAAGCCGTTATT 477
ag4-fa CTAATCCCCAGCCGAAACCTACGTACGCACGCCACACCGCCCCCTTACAAGCCGTTATT 477
ap1-fa CTAATCCTTAGACCAAACGGACTTGCCTTGGCCACACCGCCGTTATCCAAGGGCTTATT 477
ag5-fa CCTATCCCTAGGCCAACCTTCGTATGCCTAAGCCTACCCCTCTATGCCTAGGCTTATT 478
*** * * * * * * * * * * *

ag1-fa TACAACCGGGTAGGAGATATTGGACTGATTTTAAGCATAGCATGATTTGCAATAAACATA 537
ag3-fa TACAACCGGGTAGGAGATATTGGACTGATTTTGAAGCATAGCATGATTTGCAATAAACATA 540
ag2-fa TACAACCGGGTAGGAGATATTGGACTGATTTTAAGCATAGCATGATTTGCAATAAACATA 537
ap4-fa TACAACCGGCTAGGAGATATTGGACTGATTCTAAGCATAGCATGATTTGCAATAAACATA 535
ap3-fa TACCATCGGCTAGGACATATTGGACTGATTTTAAGCCTAACACGATTTGCAATAAACATA 537
ag4-fa TACAACCGGCTAGGACATATTGGACTGATTTTAAGCCTAGCATGATTTGCAATAAACATA 537
ap1-fa TACCGTCGGCTTGGACATATTGGACTGATCTTAAGCATAGGATGATTTGGAATAAACCTT 537
ag5-fa CACAATAGGCTTAGACATATTGTTCTTATTCTTAGCCTAACGCGCTTGTCTTAAACCTT 538
** * * * * * * * * * * * * * * * * *

ag1-fa AACACTTGGGAAATTCAACAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 596
ag3-fa AACACTTGGGAAATTCAACAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 599
ag2-fa AACACTTGGGAAATTCAACAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 596
ap4-fa AACACTTGGGAAATTCAACAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 594
ap3-fa AACACTTGGGAA-TTCAACAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 596
ag4-fa AACACTTGGGAAATTTCAGCAAATATTTCGCCTCCCCC-AAGACAACCAAGCAACCCTACC 596
ap1-fa AGCGCTTGGGAGATTGGGCAAAGATNCGCCTGCNNA--AAGATGGC-AAGCAGGGCTAGA 594
ag5-fa AACCCCGGGAGCTTANGCCTATGCTCGCCTCCCT--AAGCCAACCCAGCAACCCATA 596
* * * * * * * * * * * * * * * * *

ag1-fa ACTCATGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCACCCCTG 656

ag3-fa ACTCATGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCACCCCTG 659
 ag2-fa ACTCATGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCAACCCTG 656
 ap4-fa ACTCATGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCACCCCTG 654
 ap3-fa ACTCAAGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCACCCCTG 656
 ag4-fa ACTCAGGGGCTTAATCCTAGCTGCCACAGGAAAATCAGCCCAATTCGGTCTCCACCCCTG 656
 ap1-fa ACTTA-GGTCTTGATCTCTGGTGCCAGAGGTAAATCAGCCGAATTCGAGCTCCAGCCCTG 653
 ag5-fa AGCCAAGGCCTTAATCCAGACGCCAAAGG-AAATCAGCCTAATTCGG-CTCCAACCCTG 654
 * * * * *

ag1-fa ACTCCCTTCAGCAATAGAA-GGTCCAACACCGG-TCTCTGCCCTACTACACT-CCAGCAC 713
 ag3-fa ACTCCCCTCAGCAATAGAA-GGTCCAACACCGG-TCTCTGCCCTACTACACT-CCAGCAC 716
 ag2-fa ACTCCCTTCAGCAAAAAGAA-GGTCCAACACCGGGTCTCTGCCCTACTACACT-CCAGCAC 714
 ap4-fa ACTCCCTTCAGCAATAGAA-GGTCCAACACCGG-TCTCTGCCCTACTACACT-CCAGCAC 711
 ap3-fa ACTCCCTTCAGCAATAGAAAGGTCCAACACCGGGTCTCTGCCCTACTACACTTCCAGCAC 716
 ag4-fa ACTCCCTTCAGCAATAGAA-GGTCCAACACCGGGTCTCTGCCCTACTACACT-CCAGCAC 714
 ap1-fa ACTCCCTACAGCTATAGAA-GGTCCAACACCGG-TCTCTGNC-TACGACTCT-CTAGCAC 709
 ag5-fa ACTCCCCTAAGCAATAGAA--GGCCAACACCGG-TCTCTGCCCTACTACACT-CTAGCAC 710
 * * * * *

ag1-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 773
 ag3-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 776
 ag2-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 774
 ap4-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 771
 ap3-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 776
 ag4-fa CATGGTCGTAGCCGGCATCTTCCTACTCATCCGGCTCCACCCCTAATGGAACATAACCA 774
 ap1-fa TATGGTTGTAGC-GGCATCTACCTACTCAAC-GGCTACACCCNTTATGGAGATAGAG--- 764
 ag5-fa CATGGTCGTGGCCGGGATCTTCGTACTCATACGACTAGACCCCTAATGGAACATAACC- 769
 * * * * *

ag1-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTGCCTTGGA-GCTACAACCTACCTATTNA-CCGCTGC 830
 ag3-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTGCCTTGGA-GCCACAACCTACCTATTNA-CCGCTGC 833
 ag2-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTGCCTTGGA-GCTACAACCTACNTTATTNA-CCGCTGC 831
 ap4-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTGCCTTGGA-GCTACA-CTACCTTATTNA-CCGCTGC 827
 ap3-fa AATCGGCCCTAACAACCTGCCTCTGGCTTGGAAGCTACAACCTACCTATTATCCGCTGC 836
 ag4-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTGCCTTGGA-GCTACAACCTACCTATTNA-CCGCTGC 831
 ap1-fa AATCG--CCTAGCAGCCAGCA-CTG-CGTGGA-GNTACA-CTACCT-AGATA-CCGCTGC 816
 ag5-fa AATCG-CCCTAACAACCTGCCTCTG-CGTGGA-GCTACA-NCANNTTATTCA--CGCTGC 823
 * * * * *

ag1-fa CTGTGCCCTAACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTT-TTCCACGTC-CAGCCAA 888
 ag3-fa CTGTGCCCTAACACAAAATGACATCAAAAAAANCCTAGCCTN-NTCCACGTC-CAGCCNN 891
 ag2-fa CTGAGCCN-AACNCAAAA-GACATCAAAAAA-TCGTAGCCTT-TTCCACGTC-CAGCCAA 884
 ap4-fa CTGTGCCCTAACACAAAATGACATCAAAAAA-TCGTAGCCTTCTTCCACGTC-CAGCCAA 885
 ap3-fa CTGTGCCCTAACACAAAAGACATCAAAAAAATTCGTAGCCTT-CTCCACGTC-CAGCCAA 895
 ag4-fa CTGTGCCCTAACACAAAATGACATCAAAAAA-TCGTAGCCCT-TNCCACGNC-CAGCCAA 888
 ap1-fa TGGCGCT---ACACAAA-TNNGATCAAAAAG--CGTAGCTGTTTCNNATCAGN-NAGTAGG 869
 ag5-fa CTGTAGCCTAACACNNAATGATATCAAAAAAATCGTAGCCTT---TCANATC--AGCCAG 878
 * * * * *

ag1-fa CTAGGCCTA-ATGATAGTCACCAT-----CGGCTTAAACCAACCCC-AACTAGCCTTC- 939
 ag3-fa CTAGGCCTA-ATGATGGTCACCAT-----CGGCTTAAACCANCCCT-A-CTAGCCTNC- 941
 ag2-fa CTAGGCT---NTGGNNGTCAC-AT-----CGGNTTAAAC-AAACCC-AACTAGTCGTA- 931
 ap4-fa CTAGGCCTA-ATGATAGTCACCAT-----CGGCTTAAACCAACCCC-A-NTAG-CNTC- 934
 ap3-fa TAGGGCCTA-AAGATAGCCCCATC-----GGGCTTAAACCAACCCC-AACTAGTCATA- 947
 ag4-fa CTAGGCCTA-ATGATAGTCAC-AT-----CGGCTTAN-CCAACCCN---CTAGCCTTC- 935
 ap1-fa CTNNGATNGCACNATCGCNNNACTAACCACAGACTCNACANACATAACNANCAGTCNTGA 929

ag5-fa CTAGGCTTA---TGNTGTCACNTC-----GGCTAAACCAACNCA--ACTAGNCTTNN 925

** * * * * **

ag1-fa -CTACACATCTG----- 950
 ag3-fa -N-ACANATCT----- 950
 ag2-fa -CCTACCATCTGANCCACGN----- 950
 ap4-fa -CTACACATCTGTACCC----- 950
 ap3-fa -TCA----- 950
 ag4-fa -CTACACATCTGTACC----- 950
 ap1-fa GNNTGCTGTCTATGTNNGATC---- 950
 ag5-fa ACCNTCTGTACCAGCNTTCTTTAAG 950

ND5 r multiple sequence alignment

ap3-ra --CTGCCTTGGAGCTACAACCTACCTTATTTACCGCTGCCTGTGCCCTAACAC-AAAATG 56
 ap4-ra -----CCTTGGAGCTACA-CTACCTTATTTACCGCTGCCTGTGCCCTA-CAC-AAAATG 51
 ag1-ra -----TGCCTGGAGCTACA-CTACCTTATT-ACNGCTGCCTGTGCCCTAACACA-AAAATG 52
 ag2-ra TGCTCTNCTTGGAGCTACTACTACCTTATTTAC-GCTGCCTGTGCCCTAACAC-AAAATG 58
 ag4-ra -----GCNNGAGCTACAACCTACCTTATTTACCGCTGCCTGTGCC-TAACAC-AAAATG 51
 ap1-ra -----CTTGGAGCTACAACCTACNTTATTTAACGCTGCCTGTGCCCTAACAC-AAAATG 52
 ag3-ra -----NGGAGCCCACAACCTACNTTATTTACCGCTGCCTGTGCCCTAACACCAAATG 52
 ag5-ra -----TTGGAGCTANAGCA--CTTATTCACCGCTGCCTGTGCCCTAACAC-AAAATG 49
 * * * * * **

ap3-ra ACATCAAAAA-AATCGTAGCCTTT--CACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 113
 ap4-ra ACATCAAAAA-AATCGTAGCCTTTTCCACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 110
 ag1-ra ACATCAAAAA-AATCGTAGCCTTCN-CACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 110
 ag2-ra ACATCTAAAATAATCGTAGCCTTT--CACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 116
 ag4-ra ACATCAAAAA-AATCGTAGCCTTTTCCACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 110
 ap1-ra ACATCAAAAA-AATCGTAGCCTTTTCCACATCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATAGTCACC 111
 ag3-ra ACATCAAAAA-A-TCGTAGCCTTTNCCACGTCCAGCCAACCTAGGCCTAATGATGGTCACC 110
 ag5-ra ATATCAAAAA-AATCGTAGCCTTTTCCACATCCAGCCAGCTAGGCCTAATGATGGTCACC 108
 * * * * * **

ap3-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 173
 ap4-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 170
 ag1-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACC-ACGCATTCTTTAAA 169
 ag2-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 176
 ag4-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 170
 ap1-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 171
 ag3-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGCACCCACGCATTCTTTAAA 170
 ag5-ra ATCGGCTTAAACCAACCCCAACTAGCCTTCCTACACATCTGTACCCACGCATTCTTTAAA 168

ap3-ra GCAATACTGTTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 232
 ap4-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 229
 ag1-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTTTAATGATGAACAAGACAT 229
 ag2-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 235
 ag4-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 229
 ap1-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 230
 ag3-ra GCAATACTATTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AACGATGAACAAGACAT 229
 ag5-ra GCAATACTGTTCTTATGCTCCGGATCCATTATCCACAGCCTT-AATGATGAACAAGACAT 227

ap3-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 291
 ap4-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCCACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 289
 ag1-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 288

ag2-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 294
ag4-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 288
ap1-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 289
ag3-ra CCGAAAAATAGGAGGCCTCC-ACACCATGCTTCCGCTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 288
ag5-ra CCGAAAAATAGGGGGCCTCC-ACACCATGCTTCCACTCACCTCCACCTGCCTCACCATTG 286

ap3-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 351
ap4-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 349
ag1-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 348
ag2-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 354
ag4-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 348
ap1-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 349
ag3-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGGATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 348
ag5-ra GCAGTCTAGCCCTAACCGGAATACCATTTCTCTCCGGGTTTTTCTCAAAGACGCCATCA 346

ap3-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 411
ap4-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 409
ag1-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 408
ag2-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 414
ag4-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 408
ap1-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 409
ag3-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 408
ag5-ra TTGAAGCCCTGAACACATCACACCTGAACGCCTGAGCCCTAACCTAACTCTCATTGCCA 406

ap3-ra CCTCCTTCACAGCCGTATATAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 471
ap4-ra CCTCCTTCACAGCCGTATATAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 469
ag1-ra CCTCCTTCACAGCCGTATATAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 468
ag2-ra CCTCCTTCACAGCCGTATATAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 474
ag4-ra CCTCCTTCACAGCCGTATATAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 468
ap1-ra CCTCCTTCACAGCCGTATACAGCTTCCGAGTTATTTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 469
ag3-ra CCTCCTTCACAGCCGTATACAGCTTCCGGGTTATCTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 468
ag5-ra CCTCCTTCACAGCCGTATACAGCTTCCGAGTTATCTTCTTCGCCTCTATGGGCTCCCCC 466

ap3-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 531
ap4-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 529
ag1-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 528
ag2-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 534
ag4-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 528
ap1-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAGAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 529
ag3-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAATGAAAACAACCCAACAGTAATCAACCCAATCAAAC 528
ag5-ra GATTCTCCCCCTATCACCCCTCAACGAAAACAACCCAACAGTAATTAACCCAATCAAAC 526

ap3-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 591
ap4-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 589
ag1-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 588
ag2-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 594

ag4-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 588
ap1-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTAGCCGACTATTTATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 589
ag3-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTCATTACCTCTAACTTTTTACCAGCAA 588
ag5-ra GACTTGCCTGAGGAAGCATCCTGGCCGACTATTTATCACCTCCAACCTTTTTACCAGCAA 586

ap3-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 651
ap4-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 649
ag1-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 648
ag2-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 654
ag4-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 648
ap1-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 649
ag3-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCATAACCCTTAAGTTATCCGCACTACTAGTAACAGCCC 648
ag5-ra AAACACCAATTATAACCATAACCCGTAACCCTTAACTATCCGCACTACTAGTAACGGCCC 646

ap3-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 711
ap4-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 709
ag1-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 708
ag2-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTACAAAAAACCAACTCAAAATTTCCC 714
ag4-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 708
ap1-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTTCCC 709
ag3-ra TAGGATTACTCATAGCCCTAGAACTAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 708
ag5-ra TAGGATTACTCATAGCCCTGGAATAACAAGCCTAACAAACAAACAACCTAAAAATTACCC 706

ap3-ra CCACAATTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCCATCAATTATTCATC 771
ap4-ra CCACAATTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCCATCAATTATTCATC 769
ag1-ra CCACAATTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCCATCAATTATTCATC 768
ag2-ra CCACAATTTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCTCATCAATTATTCATC 774
ag4-ra CCACAATTTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCCATCAATTTATTGATC 768
ap1-ra CCACAATTTCCACTACACAACCTTCTCCAACACGCTGGGATATTTCTCATCATCTATTGATC 769
ag3-ra CCACAATTTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTGGGATACTTCTCATCAATTATTGCTC 768
ag5-ra CCACAATTTCCACTACACAACCTTCTCCAACATGCTAGGATACTTCTCATCAATTATTCATC 766

ap3-ra GCCTAGCCCCAAAAATTAACCTGAGCCTAGGACAAACTATAGCAAC-TCACCTAATTGAT 830
ap4-ra GCCTAGCCCCAAAAATTAACCTGAGCCTAGGACAAACTATAGCAAC-TCACCTAATTGAT 828
ag1-ra GCCTAGCCCCAAAAATTAACCTGAGCTCAGGACAATTTGCTCAAGCCTCCTCTTCTTTAG 828
ag2-ra GCCAATCCCCAAAAATTTCC-TTAACCTCTCAATCTCAAGCTCCCCCTCCCTTCCCCAAG 833
ag4-ra GCCCATCCCCAAAAATTGCTCAAACCTCCTAATCCTATTCTCAAGCCTCCCCCTCCTAAT 828
ap1-ra CCCCATCCCCAAAAAAGCCCAAACCTCATAATCATATTCTCAAGCCTCCCCATCCTAAG 829
ag3-ra GCCTATCCCCAAAAA-GCCCAAACCTCATAATTCCATGCTCAAACCTCCCCCTCCTAAG 827
ag5-ra GCCTATCCCCAAAAATAAAACAAACCTCATAATAATATGCTCAAGCCTCCTAATCATATG 826

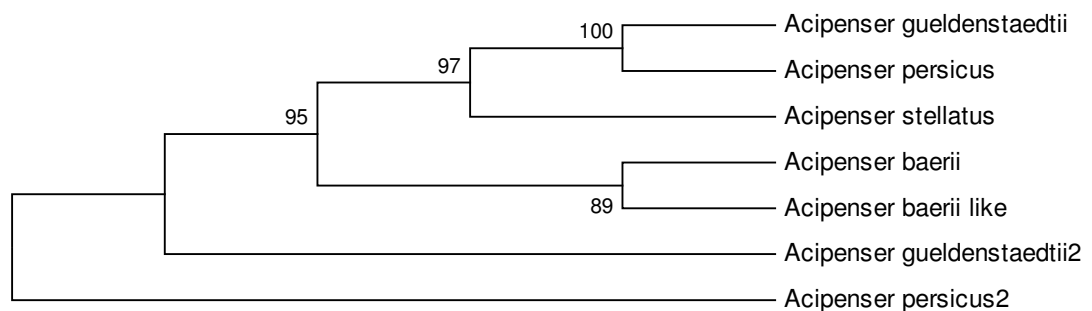
** * ***** * * * **

ap3-ra CAAACACGCCTTGATCAAGTAGGATTGCACAAACCTCCTAATCATCAGCTCACTCCTCCT 890
ap4-ra CAAACACGTCTAGATAAAGTTGGTTTGCACAGAACTCCTAATCATCTGCTCACTCCTCCT 888
ag1-ra CACACACCTCCTCCTCAAGT-GGGTCACACGGAACCTAATATCCAGCTCCCTCCTCCT 887

ag2-ra CCCACACCTCCCAATCCCGT-GGTTACCTCCAAATCAAAAGCTCAAACCCCTCCTCCT 892
 ag4-ra CTCAAGCCTCCTCCTATTCTCTTGCCCAACCCTCCTAATCATTAGCCCAATCCTCCT 888
 ap1-ra CCCAAGCCTCCTCCTATTCTCATGCCCCCCTCCTAATCTCAAGCCCCCTCCTCCT 889
 ag3-ra CCCAAACCTCCTACTCAAGTGGGCAAGCATCCAAATCCTATTCTCCAGCCCCCTCCTCCT 887
 ag5-ra CTCACCTCCTCATGTGCTCATGCCTCCTAATCCTAATCTCAAGCCCACTCCTCCT 886
 * * * * *

ap3-ra AATCATTGCTCAACCCTCCTAATC-ATT-GCTCATCCTC-CTAATCAT-GCTCANCNCN 946
 ap4-ra AATCATTGCTCAACCCTCCTAATC-ATT-GCTCATCCTC-CTAATCATTGCTCANNTNN 945
 ag1-ra AATCATGCTCAACCCTCCTAATC-ATT-GCTCATCCTCCTAATCATTGCTCANCTNN 945
 ag2-ra AATCAACCCCCC--CCCTCCTAACC--TT-GCTCATCCTC-CTAATCATTGCTCANCTGN 946
 ag4-ra AATCATTGCTCAACCCTCCTAATC-ATTTGCTCATCCTC-CTAATCAGTGCTCACTCNA 946
 ap1-ra AATCATTGCTCAACCCTCCTAATC-AAT-GCTCATCCTC-CTAATCANN-CTCACTCNN 945
 ag3-ra AATCATTGCCCAACCCTCCTAATC-AAT-GCTCATCCTC-CTAATCAGTGCTCAGCCTN 944
 ag5-ra ATTCATTGCTCAACCCTCCTAATCTATTGCTCATCCTC-CTAATCANTGCTCANNTNN 945
 * * * * *

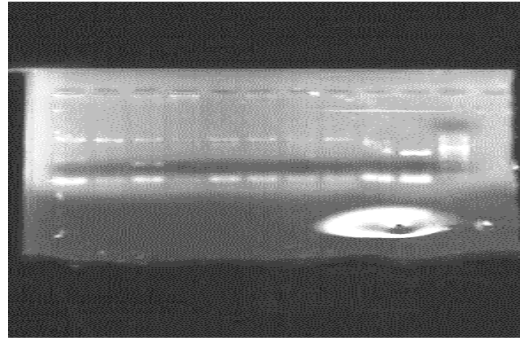
ap3-ra NNNC-- 950
 ap4-ra NNNNC- 950
 ag1-ra NNNNN- 950
 ag2-ra NGNN-- 950
 ag4-ra NNNN-- 950
 ap1-ra NTNNN- 950
 ag3-ra NNNNNT 950
 ag5-ra NTNNN- 950



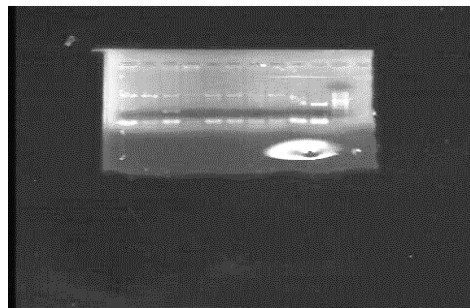
دندروگرام Maximum Parsimony بین تاسماهی ایرانی و روسی با ۱۰۰۰ بار تکرار با استفاده از ژن ND5

۵-۴- نتایج 16srDNA

محصول PCR کیفیت مناسبی داشت و باندهای جداسازی شده حاصل از تکثیر پرایمر از مرغوبیت خوبی برخوردار بود.



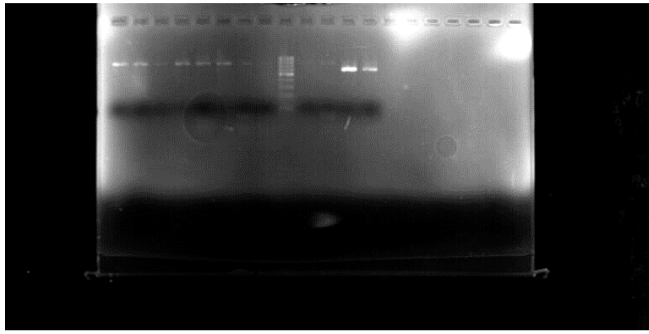
باندهای جداسازی شده حاصل از تکثیر پرایمر Forward شماره ۲ با Reverse شماره ۲ و ۳ بوده است.



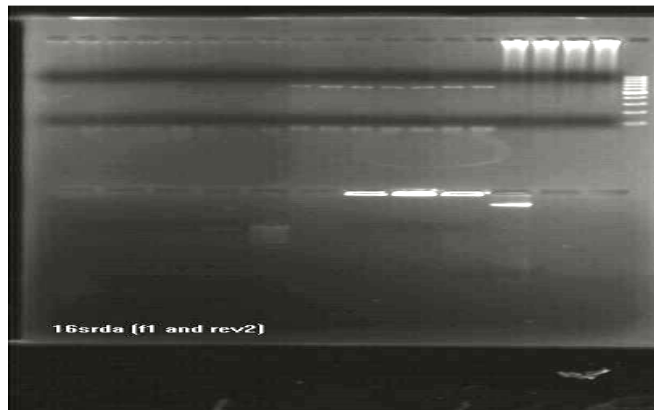
محصول PCR با استفاده از پرایمر شماره ۲



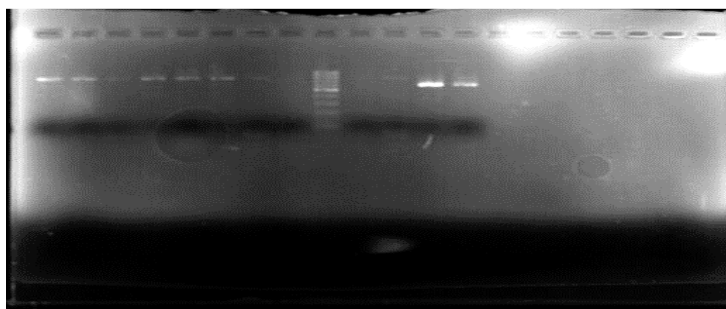
محصول PCR تولید شده از پرایمر فوروارد ۲ و برگشتی ۲



محصول PCR با استفاده از پرایمر رفت و برگشت ۱ و ۲



محصول PCR تولید شده از پرایمر فوروارد ۲ و برگشتی ۲



محصول PCR با استفاده از پرایمر رفت و برگشت ۱ و ۲

تعیین توالی برای ۴ نمونه تاسماهی روسی و ۳ نمونه تاسماهی ایرانی بشرح ذیل بدست آمد:

توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی روسی به شماره لوکوس GU003885 که در بانک ژن NCBI ثبت گردید به شرح ذیل می باشد.

```
1 agagaacttt attctgacc cccgaaacta gacgagctac tccgagacag cctaataggg
61 caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga agatctccga gtagaggcga caaacctaac
121 gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa ggggacactt cagcctcaag gcttctactg
181 tctactcaggt cactaccaac aaagacatca agaaaccctt aagagttatt caacackcct
241 ccccctctct tcccyyttt ttcaakawwa acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaaa
301 gggactttgt ttcagtgggc ctaaaagcag ccacctgcac agaaagcgtt aaagctcaga
361 caaacctca ccctattatc ccgataaaac aatcacaate ccctaaacct acagagccac
421 tctatacaac tatagaagca ataagtctaa aattagtaac aagaaggcac gaccttctcc
481 aagcacacgt gtaagtcaga tcggaccac cactgacaaa taacggacgc gagaagaggg
541 aagtacagaa tagtaataga aatcaagaaa acctgtaaa atactaccgt taaccaaca
601 caggagtcca ccatcaagga aagactaaaa gaaaaagaag gaactcgcca aacacgagcc
661 tcgctgttt accaaaaaca tcgctcttg caaaccaatg tattagaggt cccgctgcc
721 ctgtgaccaa aagttaacg gccgcg
```

۱- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی روسی به شماره لوکوس GU003886 که در بانک ژن NCBI ثبت گردید به شرح ذیل می باشد.

```
1 agagaacttt attctgacc cccgaaacta gacgagctac tccgagacag cctaataggg
61 caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga agatctccga gtagaggcga caaacctaac
121 gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa ggggacactt cagcctcaag gcttctactg
181 tctactcaggt cactaccaac aaagacatca agaaaccctt aagagttatt caacackcct
241 ccccctctct tggccyttt aacaakawwa acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaaa
301 gggactttgt ttcagtgggc ctaaaagcag ccacctgcac agaaagcgtt aaagctcaga
361 ctaaacctca ccctattatc ccgataaaac aatcacaate ccctaaacct acagagccac
421 tctatacaac tatagaagca ataagtctaa aattagtaac aagaaggcac gaccttctcc
481 aagcacacgt gtaagtcaga tcggaccac cactgacaaa taacggacgc gagaagaggg
541 aagtacagaa tagtaataga aatcaagaaa acctgtaaa atactaccgt taaccaaca
601 caggagtcca ccatcaagga aagactaaaa gaaaaagaag gaactcgcca aacacgagcc
661 tcgctgttt accaaaaaca tcgctcttg caaaccaatg tattagaggt cccgctgcc
721 cttegaccaa aagttt
```

۲- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی روسی به شماره لوکوس GU003887 که در بانک ژن NCBI ثبت گردید به شرح ذیل می باشد.

```
1 cctaataggg caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga agatctccga gtagaggcga
61 caaacctaac gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa ggggacactt cagcctcaag
121 gcttctactg tctactcaggt cactaccaac aaagacatca agaaaccctt aagagttatt
181 caacackcct ccccctctct tggccyttt aacaakawwa acaggcggat aaagatcaca
241 ttaatcaaaa gggactttgt ttcagtgggc ctaaaagcag ccacctgcac agaaagcgtt
301 aaagctcaga ctaaacctca ccctattatc ccgataaaac aatcacaate ccctaaacct
361 acagagccac tctatacaac tatagaagca ataagtctaa aattagtaac aagaaggcac
421 gaccttctcc aagcacacgt gtaagtcaga tcggaccac cactgacaaa taacggacgc
481 gagaagaggg aagtacagaa tagtaataga aatcaagaaa acctgtaaa atactaccgt
541 taaccaaca caggagtcca ccatcaagga aagactaaaa gaaaaagaag gaactcgcca
601 aacacgagcc tcgctgttt accaaaaaca tcgctcttg caaaccaatg tattagaggt
661 cccgctgcc cttegaccaa aagttt
```

۳- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی روسی به شماره لوکوس GU003888 که در بانک ژن NCBI ثبت گردید به شرح ذیل می باشد.

```

1 agagaacttt attctgacc cccgaaacta gacgagctac tccgagacag cctaataggg
61 caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga agatctccga gtagaggcga caaacctaac
121 gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa gggcacactt cagcctcaag gcttctactg
181 tcactcaggt cactaccaac aaagacatca agaaacctt aagagttatt caacackcct
241 ccccctctct tcccytttt ttcaakawwa acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaa
301 gggactttgt ttcagtgggc ctaaaagcag ccacctgcac agaaagcgtt aaagtcaga
361 caaacctca cctattatc ccgataaaac aatcacaatc cctaaacct acagagccac
421 ctatacaac tatagaagca ataagtctaa aattagtaac aagaaggcac gacctctcc
481 aagcacactg gtaagtcaga tcggaccac cactgacaaa taacggacca gccggaagag
541 ggaagtacag aatagtaata gaaatcaaga aaacctgta aaatactacc gftaaccaa
601 cacaggagtg caccatcaag gaaagactaa aagaaaaaga aggaactcgg caaacacgag
661 cctgcctgt ttacaaaaa catcgctct tgcaaacca tgtattagag gtcccgcctg
721 ccctgtgacc aaaagttaa cggccgcg
    
```

همینطور توالی یابی برای ۳ نمونه تاسماهی ایرانی برای ژن 16sr RNA میتوکندری صورت گرفت که مشخصات توالی به شرح ذیل می باشد.

۱- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی ایرانی به شماره لوکوس GU003889 که در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی 3889 به ثبت رسیده به شرح ذیل می باشد.

```

1 agagaacttt atttgtacc cccgaaacta gacgagctac tccgagacag cctaataggg
61 caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga agatctccga gtagaggcga caaacctaac
121 gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa gggcacactt cagcctcaag gcttctactg
181 tcactcaggt cactaccaac aaagacatca agaaacctt aagagttatt caacackcct
241 ccccctctct tcccytttt ttcaakawwa acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaa
301 gggactttga atggtgggcc taaaagcagc cacctgcaca gaaagcgtta aagctcagac
361 aaaacctcac cctattatc cgataaaaca atcacaatc cctaacctc cagagccact
421 ctatacaact atagaagcaa taatgctaaa attagtaaca agaaggcacg accttctcca
481 agcacactg taagtcagat cggaccacc actgacaaat aacggaccag ccggaagagg
541 gaagtacaga atagtaatag aaatcaagaa aacctgtaa aatactaccg ttaaccaac
601 acaggagtgc accatcaagg aaagactaaa agaaaaagaa ggaactcggc aaacacgagc
661 ctgcctgtt taccaaaaac atcgctctt gcaaaccaat gtattagagg tcccgcctgc
721 cctgtgacca aaagttaac ttccgcg
    
```

۲- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی ایرانی به شماره لوکوس GU003890 که در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی 3890 به ثبت رسیده به شرح ذیل می باشد.

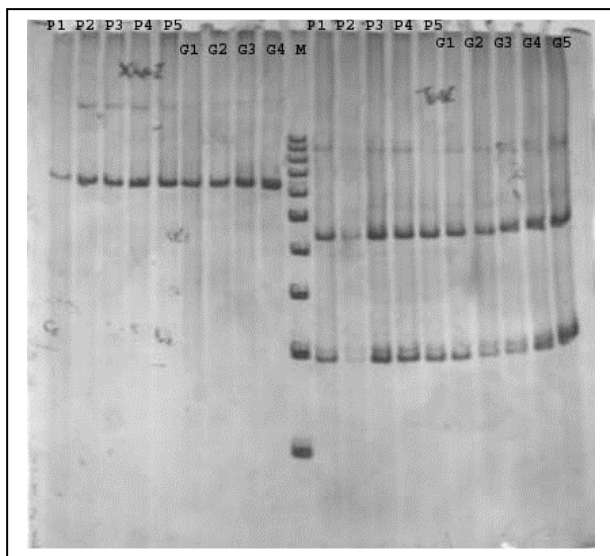
```

1 gacgagctac tccgagacag cctaataggg caaacccgtc tctgtggcaa aagagtggga
61 agatctccga gtagaggcga caaacctaac gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa
121 gggcacactt cagcctcaag gcttctactg tcactcaggt cactaccaac aaagacatca
181 agaaacctt aagagttatt caacackcct ccccctctct tcccytttt ttcaakawwa
241 acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaa gggactttga atggtgggcc taaaagcagc
301 cacctgcaca gaaagcgtta aagctcagac aaaacctcac cctattatc cgataaaaca
361 atcacaatc cctaacctc cagagccact ctatacaact atagaagcaa taatgctaaa
421 attagtaaca agaaggcacg accttctcca agcacactg taagtcagat cggaccacc
481 actgacaaat aacggaccag ccggaagagg gaagtacaga atagtaatag aaatcaagaa
541 aacctgtaa aatactaccg ttaaccaac acaggagtgc accatcaagg aaagactaaa
601 agaaaaagaa ggaactcggc aaacacgagc ttcagtaacc ctgtttacca aaaacatcgc
661 ctctgcaaa ccaatgtatt agaggtccc cctgcctctg gacaaaaagt ttaactcgg
721 cg
    
```

۳- توالی بخشی از ژن 16s ریبوزومال RNA میتوکندری تاسماهی ایرانی به شماره لوکوس GU003891 که در بانک ژن NCBI با شماره دسترسی 3891 به ثبت رسیده به شرح ذیل می باشد.

```
1 agatctccga gtgagggcga caaacctaac gagcctagta atagctggtt gctcaggaaa
61 gggcacact cagcctcaag gcttctactg tctactcaggt cactaccaac aaagacatca
121 agaaacctt aagagtatt caacackcct cccctctct tcccyyttt tcaakawwa
181 acaggcggat aaagatcaca ttaatcaaa gggacttga atggtgggcc taaaagcagc
241 cacctgcaca gaaagcgtta aagctcagac aaaacctcac cctattatcc cgataaaaca
301 atcacaatcc cctaaacctc agagccact ctatacaact atagaagcaa taatgctaaa
361 attagtaaca agaaggcacg accttctcca agcacacgtg taagtcagat cggaccacc
421 actgacaaat aacggaccag ccggaagagg gaagtacaga atagtaatag aaatcaagaa
481 aacctgtaa aatactaccg ttaaccaac acaggagtgc accatcaagg aaagactaaa
541 agaaaaagaa ggaactcggc aaacacgagc ttcagtaacc ctgtttacca aa
```

نمونه‌ها بعد از توالی یابی با برنامه‌های Mega و Clustalw2 مورد بررسی قرار گرفت و در ۴ جایگاه تفاوت برش آنزیمی را نشان دادند. آنگاه هضم آنزیمی با ۹ آنزیمبر شی *HpaII, SduI, NcoI, Sall, HinfI, BclI, HhaI, RsaI* و *Cfr13I* گذاشته شد که در همه نمونه‌ها الگوی بانندی مشابهی مشاهده شد.

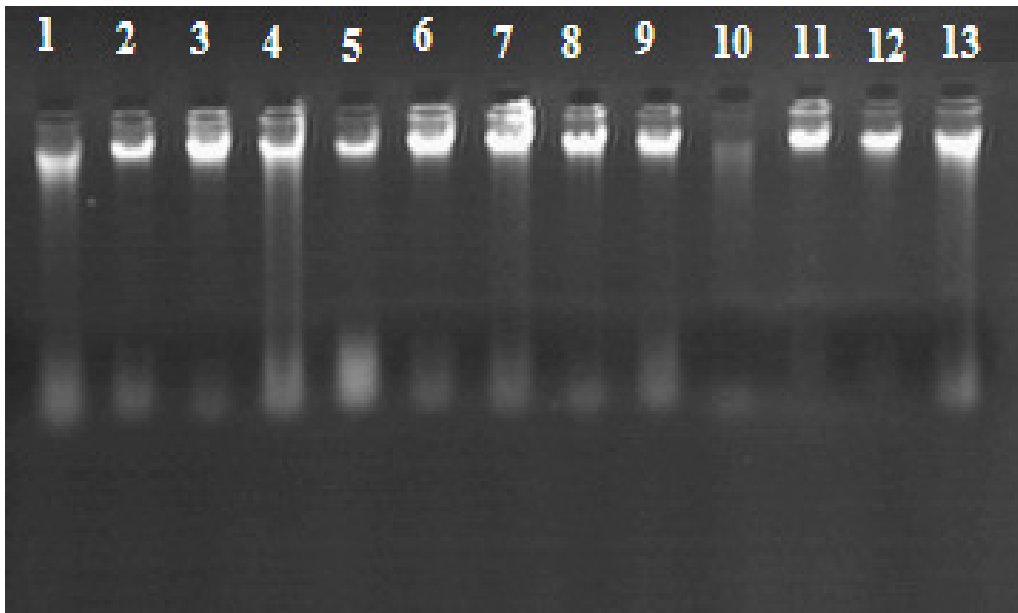


دو روش الکتروفورز و اسپکتوفتومتری به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آن در ذیل آورده شده است:

الف) روش الکتروفورز:

نتایج بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۰/۸ درصد) نشان داد که DNA استخراج شده از بافت باله دمی تاس ماهیان ایرانی و تاس ماهیان روسی از کیفیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش PCR

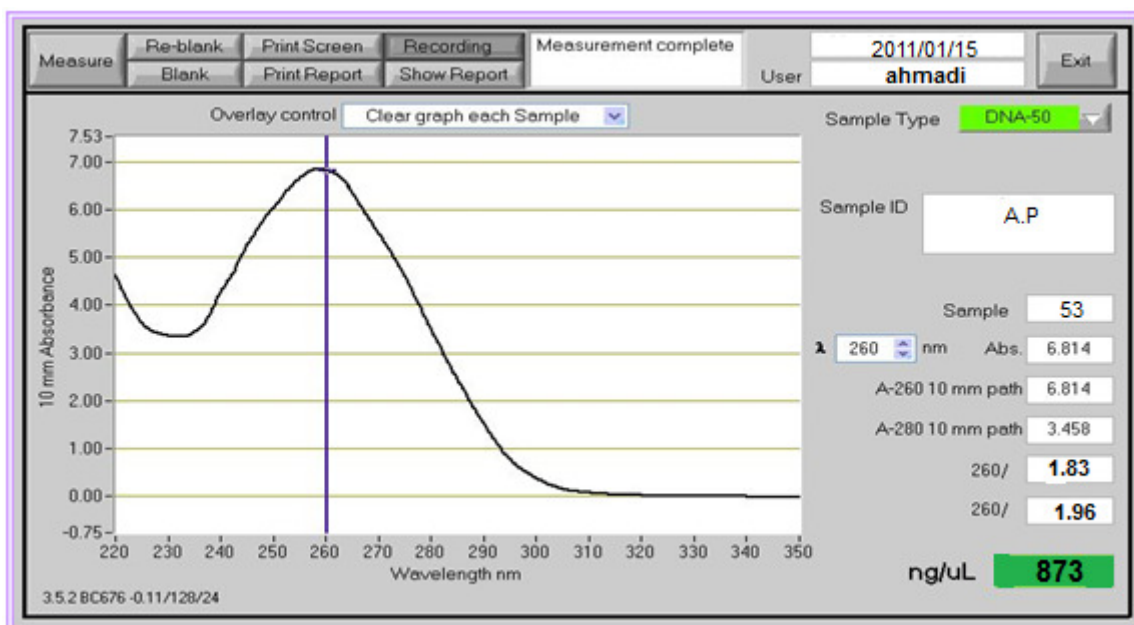
برخوردار هستند. باندهای DNA قوی و شفاف بودند و نشان دهنده این است که DNA استخراج شده فاقد آلودگی پروتئینی و RNA می باشد (تصویر ۴۳).



تصویر ۴۳- DNA استخراج شده از باله تاس ماهی ایرانی (ستون ۶-۱) و باله تاس ماهی روسی (۱۳-۷) به روش فنل-کلروفرم بر روی ژل آگاروز ۰/۸٪

ب) روش اسپکتوفتومتری:

بعد از استخراج DNA، میزان جذب نوری DNA های تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی در طول موج nm ۲۶۰ و طول موج nm ۲۸۰ با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Nanodrop اندازه گیری شد و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر که به عنوان شاخص کمیت می باشد برای ارزیابی DNA های استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت به طوریکه خلوص آنها در دامنه ۲ - ۱/۸ قرار داشت و پس از یکسان سازی غلظت دی ان ای استخراج شده (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) از آنها برای انجام واکنش PCR استفاده شد. غلظت و مقادیر نسبی میزان DNA در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۹۰ نانومتر در جدول ۳۳ ارائه گردیده است.



تصویر ۴۴- نمودار بررسی کمیته DNA به روش اسپکتروفتومتری

جدول ۳۳- غلظت و مقادیر کمی DNA در نمونه‌های تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی و نسبت آن در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر

Sample	غلظت ng/ul	260/280	Sample	غلظت ng/ul	260/280	Sample	غلظت ng/ul	260/280
1	311.39	1.820	41	239.65	1.983	81	898.58	1.879
2	286.07	1.890	42	297.59	1.986	82	478.66	1.878
3	305.82	1.950	43	492.82	1.989	83	1066.88	1.877
4	412.32	1.810	44	506.64	1.992	84	625.29	1.876
5	1201.14	1.875	45	520.46	1.995	85	289.02	1.875
6	288.76	1.878	46	534.28	1.998	86	439.09	1.874
7	526.72	1.881	47	548.11	2.001	87	155.37	1.873
8	269.03	1.884	48	561.93	2.004	88	964.47	1.972
9	1190.92	1.887	49	575.75	2.007	89	459.07	1.871
10	336.6	1.890	50	589.57	2.010	90	1307.44	1.871
11	429.44	1.893	51	431.39	1.881	91	239.65	1.970
12	382.58	1.896	52	286.07	1.933	92	397.59	1.869
13	1097.82	1.899	53	305.82	1.921	93	492.82	1.868
14	254.47	1.902	54	412.32	1.882	94	506.64	1.867
15	818.11	1.905	55	1201.14	1.902	95	520.46	1.866
16	950.84	1.908	56	288.76	1.901	96	534.28	1.865
17	950.26	1.911	57	526.72	1.900	97	548.11	1.864
18	256.72	1.914	58	269.03	1.899	98	561.93	1.863
19	917.11	1.917	59	1190.92	1.898	99	575.75	1.962
20	1869.49	1.920	60	336.6	1.898	100	589.57	1.862
21	1722.51	1.923	61	229.44	1.897			
22	584.95	1.926	62	382.58	1.896			

23	427.27	1.929	63	1097.82	1.895
24	1249.94	1.932	64	254.47	1.894
25	895.46	1.935	65	818.11	1.893
26	803.35	1.938	66	950.84	1.892
27	835.21	1.941	67	950.26	1.891
28	1150.52	1.944	68	156.72	1.890
29	483.95	1.947	69	917.11	1.889
30	407.93	1.950	70	1869.49	1.889
31	898.58	1.953	71	1722.51	1.888
32	178.66	1.956	72	584.95	1.887
33	1066.88	1.959	73	427.27	1.886
34	625.29	1.962	74	1249.94	1.985
35	289.02	1.965	75	895.46	1.884
36	539.09	1.968	76	803.35	1.883
37	455.37	1.971	77	835.21	1.982
38	964.47	1.974	78	1150.52	1.881
39	559.07	1.977	79	383.95	1.880
40	1307.44	1.980	80	407.93	1.880

۶-۴- نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز محصولات آن

نتایج این تحقیق مشخص کرد از ۱۰۱ پرایمر مورد استفاده ۴۸ عدد از آغازگرها تولیدالگوی باند داشتند و ۵۳ عدد از آنها هیچ گونه الگوی بانندی تولید نکردند. در آزمایشهای PCR با استفاده از پرایمرهای بدون تولیدالگوی باند در سه دمای متفاوت اتصال (Annealing) یعنی ۳۱ و ۳۳ و ۳۵ درجه سانتیگراد تکرار گردید ولی نتایج تغییر نکرد و در هیچ کدام از شرایط دمایی مورد آزمایش، عمل اتصال پرایمرها و تولید باند انجام نشد. از ۴۸ آغازگری که تولید محصول PCR داشتند ۳۹ آغازگر باندهای یکسان و هم شکل (مونومورف) در دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید نمودند که در ادامه به بررسی و توضیح تعدادی از این آغازگرها پرداخته خواهد شد. ۹ آغازگر دارای باندهای متمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی و جایگاه (Loci) متفاوت تولید کردند ولی با تکرار آزمایش و انجام واکنش PCR نتایج قبلی تکرار نشد و محصول PCR که در آزمایش نخست تولید گردیده بود بدست نیامد (جدول ۳۴).

جدول ۳۴- نتایج PCR با استفاده از ۱۰۱ پرایمر مورد استفاده، تعداد دفعات تکرار، درصد C+G و توالی پرایمرهایی که محصول PCR تولید نمودند با علامت + و فاقد محصول با علامت - مشخص شده است.

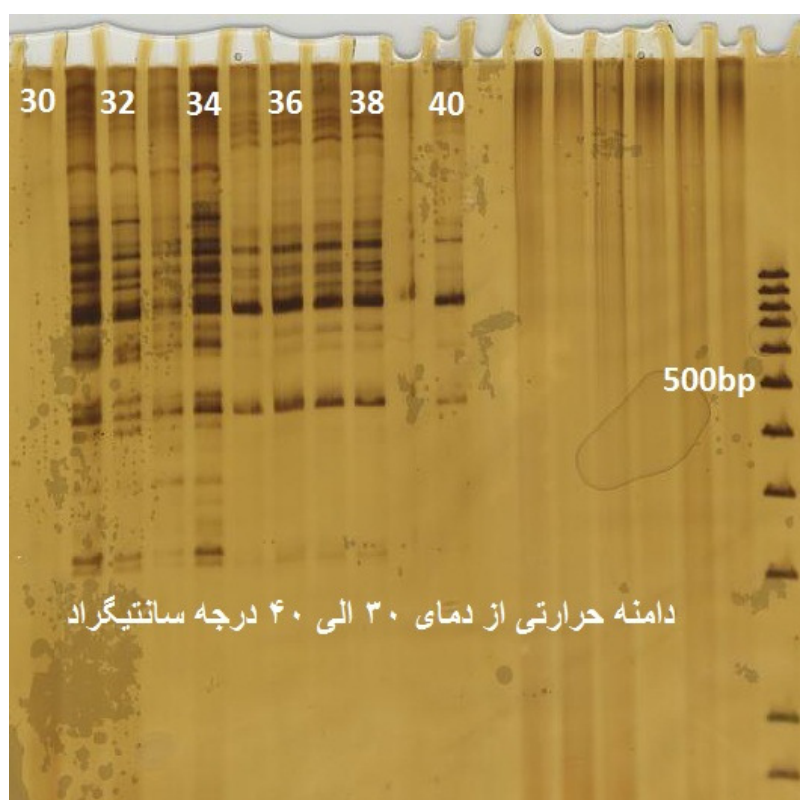
ردیف	نامگذاری پرایمر	(5) - (3' توالی پرایمر	C+G(%)	نتایج تکثیر پرایمر	تعداد دفعات تکرار پرایمر
1	1	5'-AGC CGA AAG G-3'	60%	+	-
2	2	5'-CCC GGG TAC C-3'	80%	+	10
3	3	5'-CGC GCG ATA T-3'	60%	-	-
4	4	5'-TCG ATC GAT C-3'	50%	-	-
5	5	5'-AAA GGG TCC C-3'	60%	+	3
6	6	5'-TTT AAA GGC C-3'	40%	-	-
7	7	5'-CCA AGC TAC T-3'	50%	+	-
8	8	5'-CTG ACT GCT A-3'	50%	+	-
9	9	5'-CGT TGC TTA A-3'	40%	-	-
10	10	5'-AGG TCA GGT C-3'	60%	+	5
11	11	5'-CGA CTC GAT C-3'	60%	+	-
12	12	5'-CAA AGT TTC A-3'	30%	+	-
13	13	5'-CTT TCA TCT C-3'	40%	+	-
14	14	5'-TGC AAC GTG G-3'	60%	+	-
15	15	5'-GCC TTA AGG C-3'	60%	-	-
16	16	5'-AGA GAG CAG C-3'	60%	-	-
17	17	5'-CGC GCG CGC G-3'	100%	-	-
18	18	5'-CGA AGC AGC T-3'	60%	+	-
19	19	5'-GGC TGA AGA A-3'	50%	+	-
20	20	5'-ACC TGA ACG G-3'	60%	-	-
21	21	5'-ACT AAG TTT T-3'	20%	-	-
22	22	5'-GTA CGC ATG T-3'	50%	-	-
23	23	5'-ATT CCG GAA T-3'	40%	-	-
24	24	5'-CTA GGT CGG A-3'	60%	-	-
25	25	5'-GCC CCT ATG C-3'	70%	-	-
26	26	5'-AAC TGG ACT G-3'	50%	+	-
27	27	5'-CAA TGC CGG A-3'	60%	+	15
28	28	5'-CTC TGG AGA C-3'	60%	+	-

-	+	60%	5'-GGG ATA TCG G-3'	29	29
3	+	60%	5'-GGA GTA CTG G-3'	30	30
-	-	70%	5'-TGC GGC TGA G-3'	31	31
-	-	60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	32	32
-	+	60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	33	33
-	-	60%	5'-TCT GGT GAG G-3'	34	34
-	+	60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	35	35
-	-	60%	5'-GGT CTA CAC C-3'	36	36
-	+	60%	5'-TTA TGG CCC C-3'	37	37
-	-	60%	5'-TGC GGC TGA G-3'	38	38
-	-	60%	5'-ACG CAC AAC C-3'	39	39
-	-	40%	5'-GTC TAT GTC T-3'	40	40
-	-	50%	5'-TAG GCA GGT T-3'	41	41
-	-	60%	5'-ACG ACA CGA C-3'	42	42
-	-	50%	5'-GGT CAA TCG A-3'	44	43
-	-	60%	5'-ACG ACC GAC A-3'	45	44
-	-	40%	5'-ATG AAC CAT G-3'	46	45
-	-	70%	5'-GAG GGG GAC T-3'	48	46
-	-	50%	5'-TAC CAT TCG G-3'	49	47
-	-	50%	5'-ATG TGT ACC C-3'	50	48
-	+	50%	5'-TGG TGA AGC T-3'	52	49
-	-	50%	5'-GTA CCT ACC T-3'	55	50
-	-	70%	5'-CAT CCC CCT G-3'	B-03	51
2	+	70%	5'-TGC TCT GCC C-3'	B-06	52
-	+	70%	5'-GGT GAC GCA G-3'	B-07	53
-	-	60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	A-10	54
-	+	70%	5'-GGA AGT CGC C-3'	H-04	55
4	+	70%	5'-AGT CGT CCC C-3'	H-05	56
-	-	60%	5'-CTG CAT CGT G-3'	H-07	57
-	+	70%	5'-CCC AAG GTC C-3'	E-01	58
-	+	60%	5'-AGA TGC AGC C-3'	E-07	59
-	-	60%	5'-GAA CCC AAC C-3'	D-02	60

-	-	70%	5'-GTC GCC GTC A-3'	D-03	61
-	+	70%	5'-TTG GCA CGG G-3'	D-07	62
-	-	70%	5'-GGG GGA TGA G-3'	M-03	63
-	-	60%	5'-GTC CAC TGT G-3'	M-11	64
-	+	70%	5'-GGG ACG TTG G-3'	M-12	65
-	+	60%	5'-CTC ACG TTG G-3'	N-01	66
2	+	60%	5'-ACA ACT GGG G-3'	N-10	67
6	+	60%	5'-CAT TGG GGA G-3'	N-17	68
-	+	60%	5'-GTC CGT ACT G-3'	N-19	69
-	+	60%	5'-AGC GAG CAA G-3'	K-07	70
-	+	60%	5'-GAA ACG GGT G-3'	KEYVAN-30	71
-	+	60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	KEYVAN-31	72
-	+	70%	5'-TCC GCT CTG G-3'	KEYVAN-33	73
-	-	70%	5'-CCC GAT TCG G-3'	KEYVAN-36	74
-	-	60%	5'-CTG ACG TCA C-3'	KEYVAN-37	75
-	-	60%	5'-CTC TCC GCC A-3'	KEYVAN-38	76
-	-	70%	5'-GTC ACC AGC C-3'	KEYVAN-39	77
-	+	70%	5'-CGC GCG ATA C-3'	CINAGEN-1	78
-	+	50%	5'-CTG ACT GCT A-3'	CINAGEN-2	79
-	+	60%	5'-AGG TCA GGT C-3'	CINAGEN-3	80
-	+	60%	5'-CGA CTC GAT C-3'	CINAGEN-4	81
-	-	30%	5'-CAA AGT TTC A-3'	CINAGEN-5	82
-	-	40%	5'-GTT TCA TCT C-3'	CINAGEN-6	83
-	-	60%	5'-GCC TTA AGG C-3'	CINAGEN-7	84
-	+	60%	5'-AGA GAG CAG C-3'	CINAGEN-8	85
-	+	60%	5'-GGA GTA CTG G-3'	CINAGEN-9	86
-	+	60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	CINAGEN-10	87
-	-	50%	5'-TGG TGA AGC T-3'	CINAGEN-11	88
-	+	100%	5'-GCC CGC CCG G-3'	CINAGEN-12	89
-	-	54%	5'-GGA GTA CTG GA-3'	11bp-7	90
-	+	54%	5'-GGA GTA CTG GT-3'	11bp-8	91
-	+	63%	5'-GGA GTA CTG GC-3'	11bp-9	92

-	+	63%	5'-GGA GTA CTG GG-3'	11bp-10	93
-	-	54%	5'-AGC CGA AAG GA-3'	11bp-12	94
-	-	54%	5'-AGC CGA AAG GT-3'	11bp-13	95
-	-	63%	5'-AGC CGA AAG GC-3'	11bp-14	96
-	-	63%	5'-AGC CGA AAG GG-3'	11bp-15	97
-	-	54%	5'-GCC TTA AGG CA-3'	11bp-17	98
-	-	54%	5'-GCC TTA AGG CT-3'	11bp-18	99
-	-	63%	5'-GCC TTA AGG CC-3'	11bp-19	100
-	-	63%	5'-GCC TTA AGG CG-3'	11bp-20	101

در این تحقیق از ۱۰ دمای متفاوت برای انجام PCR استفاده گردید که دمای اتصال آنها ۳۰ الی ۴۰ درجه سانتیگراد بود. نتایج حاصله نشان داد که بیشترین تکثیر و تولید محصول PCR در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد بود و به عنوان دمای اتصال (Annealing) در برنامه واکنش PCR مد نظر قرار گرفت. نمونه ای از ژل پلی اکریل آمید از محصول PCR در دمای ۳۰ الی ۴۰ درجه سانتیگراد در تصویر ۴۵ ارائه گردیده است.



تصویر ۴۵- محصول PCR پس از الکترو فورز ژل پلی اکریل آمید ۶٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره در ۱۰ دامنه حرارتی متفاوت بین ۳۰ الی ۴۰ درجه سانتیگراد. هر یک از ستونها یک درجه بالاتر را نشان می دهد.

نتایج این تحقیق مشخص کرد که از ۱۰۱ آغازگر مورد استفاده ۵۳ آغازگر هیچ گونه الگوی باند DNA تکثیر نکردند. برای اطمینان مجدداً ۵۳ آغازگر در ۲ دمای اتصال متفاوت (Annealing) ۳۳ و ۳۵ درجه سانتیگراد انجام شد ولی هیچ گونه تکثیر الگوی باند DNA در مورد آغازگرهای مذکور انجام نشد (جدول ۳۵).

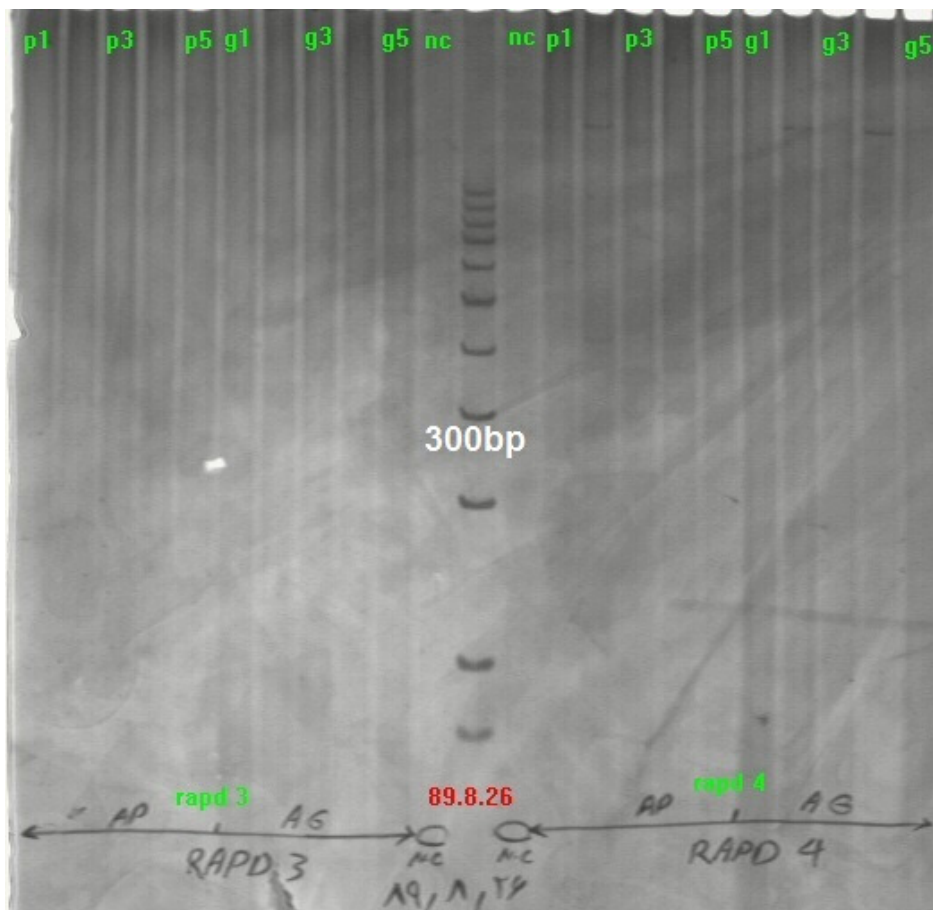
جدول ۳۵- درصد C+G، تعداد دفعات تکرار آزمایش PCR و توالی ۵۳ پرایمر مورد استفاده که هیچگونه محصول

PCR تولید نکرد

تعداد دفعات تکرار پرایمر	C+G(%)	(5) - (3' توالی پرایمر	نامگذاری پرایمر	ردیف
3	60%	5'-CGC GCG ATA T-3'	3	3
3	50%	5'-TCG ATC GAT C-3'	4	4
3	40%	5'-TTT AAA GGC C-3'	6	6
3	40%	5'-CGT TGC TTA A-3'	9	9
3	60%	5'-GCC TTA AGG C-3'	15	15
3	60%	5'-AGA GAG CAG C-3'	16	16
3	100%	5'-CGC GCG CGC G-3'	17	17
3	60%	5'-ACC TGA ACG G-3'	20	20
3	20%	5'-ACT AAG TTT T-3'	21	21
3	50%	5'-GTA CGC ATG T-3'	22	22
3	40%	5'-ATT CCG GAA T-3'	23	23
3	60%	5'-CTA GGT CGG A-3'	24	24
3	70%	5'-GCC CCT ATG C-3'	25	25
3	70%	5'-TGC GGC TGA G-3'	31	31
3	60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	32	32
3	60%	5'-TCT GGT GAG G-3'	34	34
3	60%	5'-GGT CTA CAC C-3'	36	36
3	60%	5'-TGC GGC TGA G-3'	38	38
3	60%	5'-ACG CAC AAC C-3'	39	39
3	40%	5'-GTC TAT GTC T-3'	40	40
3	50%	5'-TAG GCA GGT T-3'	41	41
3	60%	5'-ACG ACA CGA C-3'	42	42
3	50%	5'-GGT CAA TCG A-3'	44	43
3	60%	5'-ACG ACC GAC A-3'	45	44
3	40%	5'-ATG AAC CAT G-3'	46	45
3	70%	5'-GAG GGG GAC T-3'	48	46
3	50%	5'-TAC CAT TCG G-3'	49	47
3	50%	5'-ATG TGT ACC C-3'	50	48
3	50%	5'-GTA CCT ACC T-3'	55	50
3	70%	5'-CAT CCC CCT G-3'	B-03	51
3	60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	A-10	54
3	60%	5'-CTG CAT CGT G-3'	H-07	57
3	60%	5'-GAA CCC AAC C-3'	D-02	60
3	70%	5'-GTC GCC GTC A-3'	D-03	61
3	70%	5'-GGG GGA TGA G-3'	M-03	63
3	60%	5'-GTC CAC TGT G-3'	M-11	64
3	70%	5'-CCC GAT TCG G-3'	KEYVAN-36	74
3	60%	5'-CTG ACG TCA C-3'	KEYVAN-37	75
3	60%	5'-CTC TCC GCC A-3'	KEYVAN-38	76
3	70%	5'-GTC ACC AGC C-3'	KEYVAN-39	77
3	30%	5'-CAA AGT TTC A-3'	CINAGEN-5	82

3	40%	5'-GTT TCA TCT C-3'	CINAGEN-6	83
3	60%	5'-GCC TTA AGG C-3'	CINAGEN-7	84
3	50%	5'-TGG TGA AGC T-3'	CINAGEN-11	88
3	54%	5'-GGA GTA CTG GA-3'	11bp-7	90
3	54%	5'-AGC CGA AAG GA-3'	11bp-12	94
3	54%	5'-AGC CGA AAG GT-3'	11bp-13	95
3	63%	5'-AGC CGA AAG GC-3'	11bp-14	96
3	63%	5'-AGC CGA AAG GG-3'	11bp-15	97
3	54%	5'-GCC TTA AGG CA-3'	11bp-17	98
3	54%	5'-GCC TTA AGG CT-3'	11bp-18	99
3	63%	5'-GCC TTA AGG CC-3'	11bp-19	100
3	63%	5'-GCC TTA AGG CG-3'	11bp-20	101

نتایج حاصل از واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای شماره ۴ و ۳ نشان داد که هیچ گونه الگوی باند DNA تکثیر و مشاهده نشد. علاوه بر پرایمرهای فوق در ۵۱ پرایمر دیگر هیچگونه الگوی باند DNA تکثیر نشدند، که تصویر شماره ۳-۴ نمونه ای از این ۵۳ پرایمر بدون الگوی تولید باند DNA می باشد.



تصویر ۶-۴- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمرهای ۳ و ۴. NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).

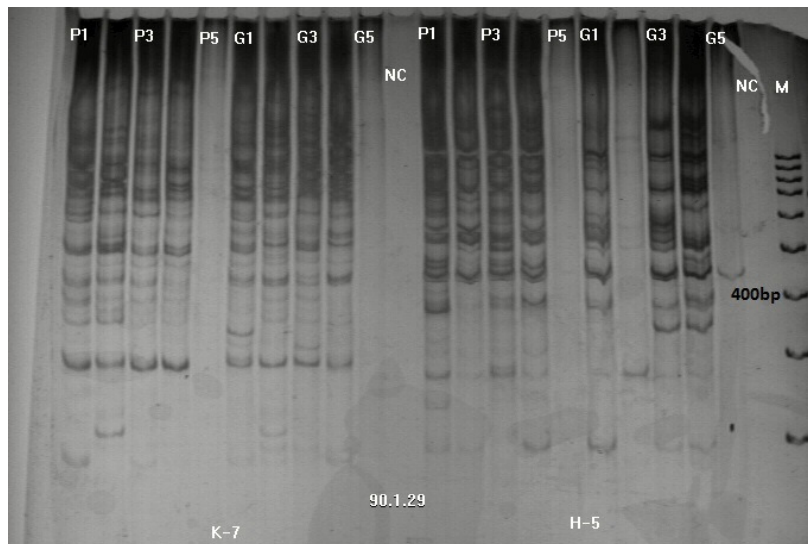
نتایج نشان داد که ۳۹ آغازگر، دارای الگوی تولید و تکثیر محصول PCR هستند. با توجه به اینکه از هر گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی ۵ نمونه استفاده گردید باندهای کاملاً مشابهی در ۵ نمونه از هر ۲ گونه تولید و تکثیر گردیدند، و هیچ گونه باندهای که فقط در ۵ نمونه از یک گونه تولید و تکثیر شده باشد و به عنوان تمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی محسوب شود رویت نگردید (جدول ۳۶). نتایج کنترل منفی (NC) هم هیچگونه باندهای تولید نکرد که بیانگر عدم وجود آلودگی در تمام ۳۹ آغازگر بود.

جدول ۳۶- توالی ۳۹ پرایمر مورد استفاده و نتایج تکثیر و تعداد دفعات تکرار هر پرایمر

ردیف	نامگذاری پرایمر	(5) - (3' توالی پرایمر	C+G(%)	نتایج تکثیر پرایمر
1	1	5'-AGC CGA AAG G-3'	60%	+
7	7	5'-CCA AGC TAC T-3'	50%	+
8	8	5'-CTG ACT GCT A-3'	50%	+
11	11	5'-CGA CTC GAT C-3'	60%	+
12	12	5'-CAA AGT TTC A-3'	30%	+
13	13	5'-CTT TCA TCT C-3'	40%	+
14	14	5'-TGC AAC GTG G-3'	60%	+
18	18	5'-CGA AGC AGC T-3'	60%	+
19	19	5'-GGC TGA AGA A-3'	50%	+
26	26	5'-AAC TGG ACT G-3'	50%	+
28	28	5'-CTC TGG AGA C-3'	60%	+
29	29	5'-GGG ATA TCG G-3'	60%	+
33	33	5'-ACC TGA ACG G-3'	60%	+
35	35	5'-ACC TGA ACG G-3'	60%	+
37	37	5'-TTA TGG CCC C-3'	60%	+
49	52	5'-TGG TGA AGC T-3'	50%	+
53	B-07	5'-GGT GAC GCA G-3'	70%	+
55	H-04	5'-GGA AGT CGC C-3'	70%	+
58	E-01	5'-CCC AAG GTC C-3'	70%	+
59	E-07	5'-AGA TGC AGC C-3'	60%	+
62	D-07	5'-TTG GCA CGG G-3'	70%	+
65	M-12	5'-GGG ACG TTG G-3'	70%	+

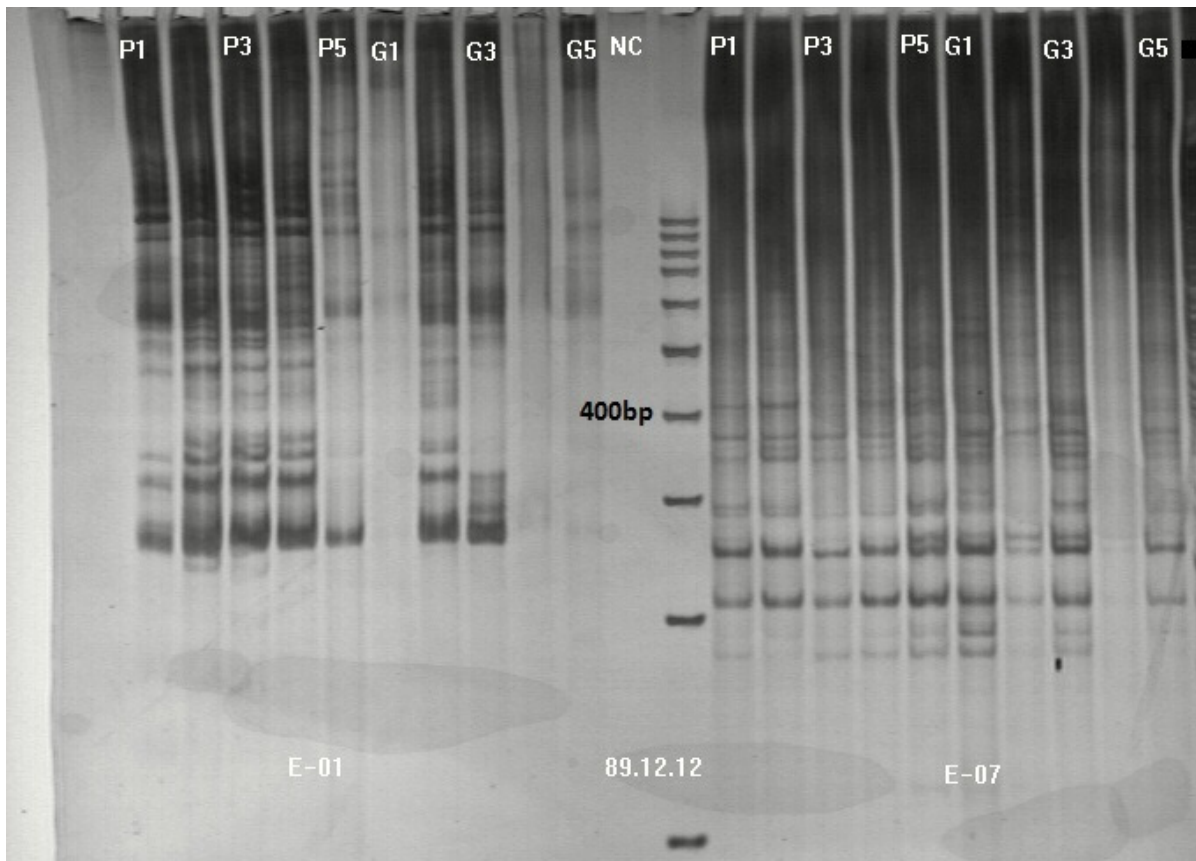
+	60%	5'-CTC ACG TTG G-3'	N-01	66
+	60%	5'-GTC CGT ACT G-3'	N-19	69
+	60%	5'-AGC GAG CAA G-3'	K-07	70
+	60%	5'-GAA ACG GGT G-3'	KEYVAN-30	71
+	60%	5'-GTG ATC GCA G-3'	KEYVAN-31	72
+	70%	5'-TCC GCT CTG G-3'	KEYVAN-33	73
+	70%	5'-CGC GCG ATA C-3'	CINAGEN-1	78
+	50%	5'-CTG ACT GCT A-3'	CINAGEN-2	79
+	60%	5'-AGG TCA GGT C-3'	CINAGEN-3	80
+	60%	5'-CGA CTC GAT C-3'	CINAGEN-4	81
+	60%	5'-AGA GAG CAG C-3'	CINAGEN-8	85
+	60%	5'-GGA GTA CTG G-3'	CINAGEN-9	86
+	60%	5'-TTA TGC CCG C-3'	CINAGEN-10	87
+	100%	5'-GCC CGC CCG G-3'	CINAGEN-12	89
+	54%	5'-GGA GTA CTG GT-3'	11bp-8	91
+	63%	5'-GGA GTA CTG GC-3'	11bp-9	92
+	63%	5'-GGA GTA CTG GG-3'	11bp-10	93

پرایمرهای H-05 و K-07 نشان دادند که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تکثیر شد ولی هیچ تفاوتی به عنوان تمایز در الگوی باندهای DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مشاهده نشد. کوچکترین اندازه باند تولیدی در محدوده ۲۰۰ جفت باز مشاهده شد و همچنین با توجه به مارکر ملکولی شاخص بکار رفته که بزرگترین شاخص آن ۱۰۰۰ جفت باز می باشد باندهای بیش از ۱۰۰۰ جفت باز تولید گردید که در این ۲ آغازگر قابل شمارش نبودند (تصویر شماره ۴۶).



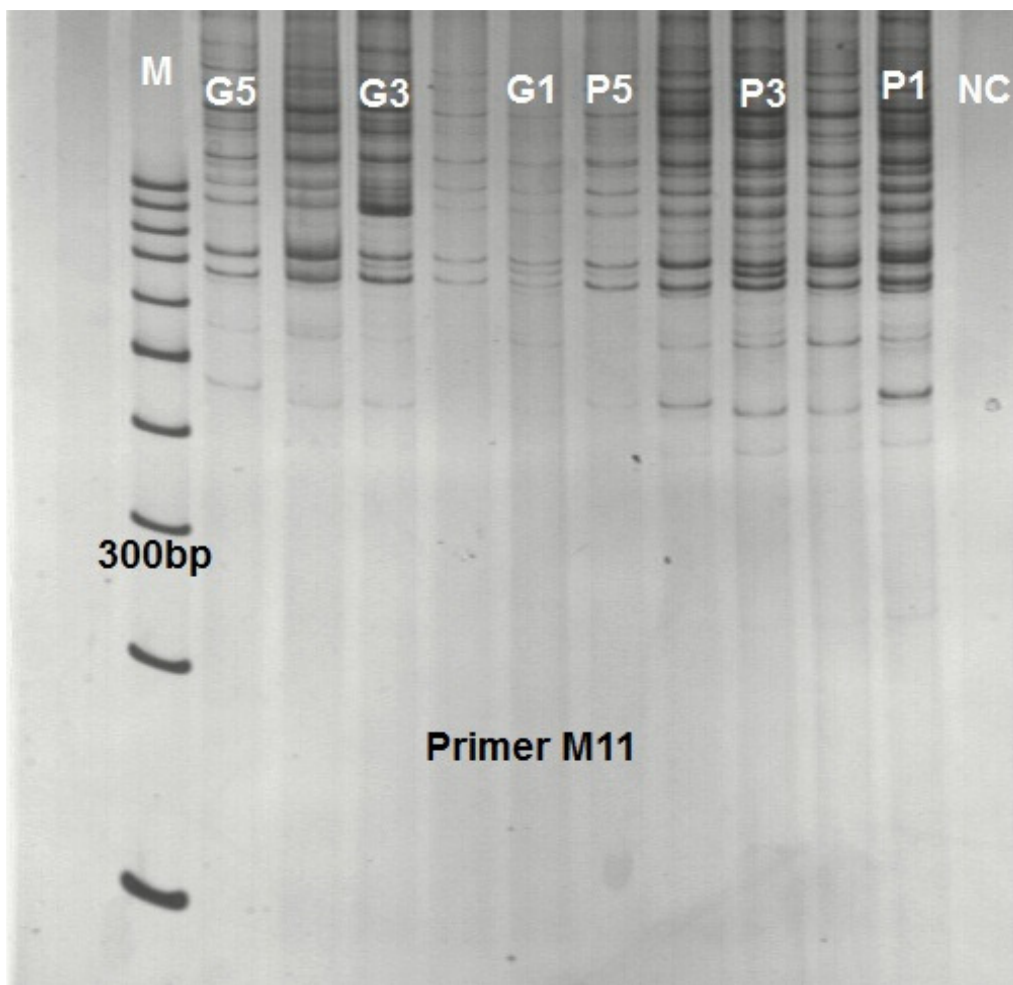
تصویر ۶- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمرهای H-05 و K-07. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر مولکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

پرایمرهای E-01 و E-07 نشان دادند که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید و تکثیر دارند، آغازگر E-01 تعداد ۴ باند تولید نمود که بیش از ۱۰۰۰ جفت باز به طور مشخص می باشد و کوچکترین باند تولید شده در هر گونه ۳۵۰ جفت باز است و در آغازگر E-07 کوچکترین باند تولید شده در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی ۱۸۰ جفت باز مشاهده شد و نیز هیچ تفاوتی به عنوان تمایز در الگوی باندهای DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مشاهده نشد (تصویر شماره ۴۷).



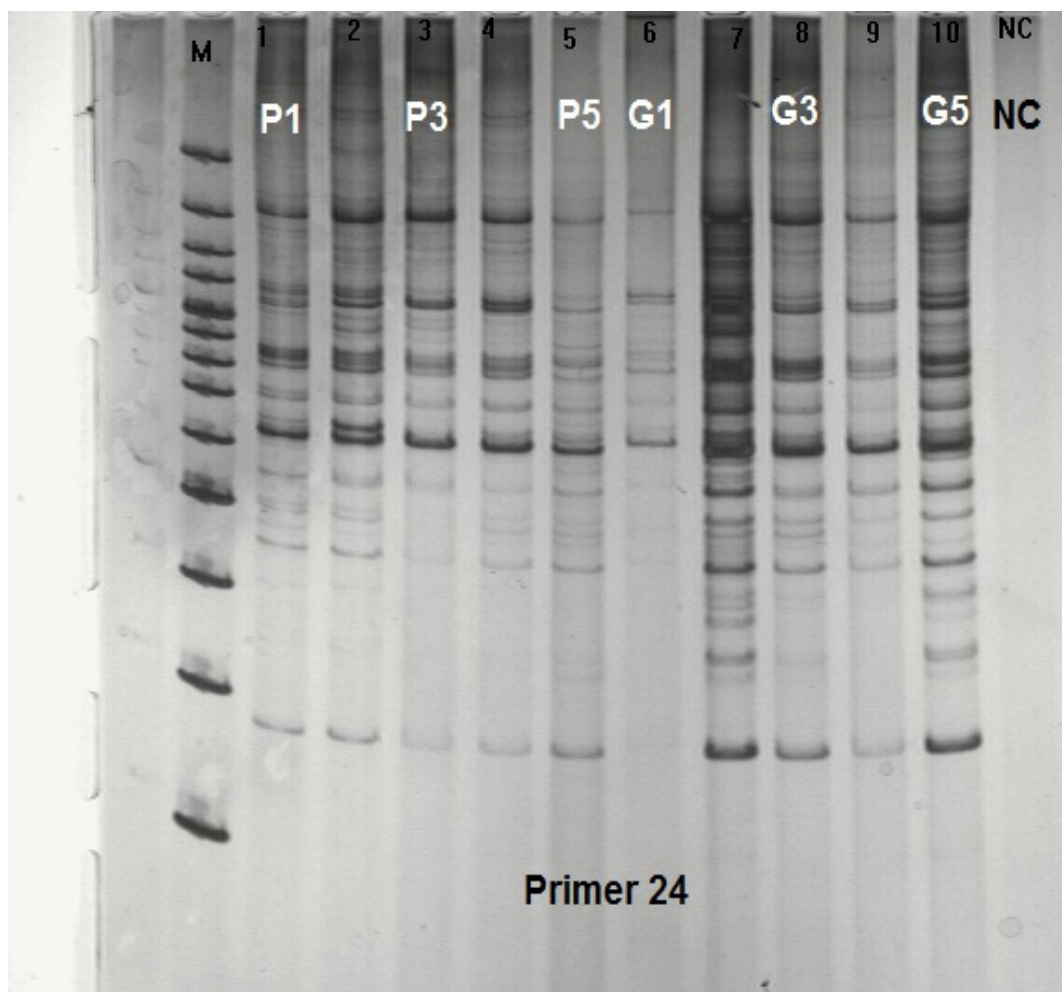
تصویر ۴۷- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمرهای E-01 و E-07. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

پرایمر M11 نشان داد که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تکثیر نمود و نیز محصول PCR آغازگر ذکر شده تولید ۱۷ باند نمود که اندازه آنها ۴۰۰ جفت باز به عنوان کوچکترین باند تولید شده و تعداد ۷ باند بیش از ۱۰۰۰ جفت باز شمارش گردید و هیچ تفاوتی به عنوان تمایز در الگوی بانندی DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مشاهده نشد (تصویر شماره ۴۸).



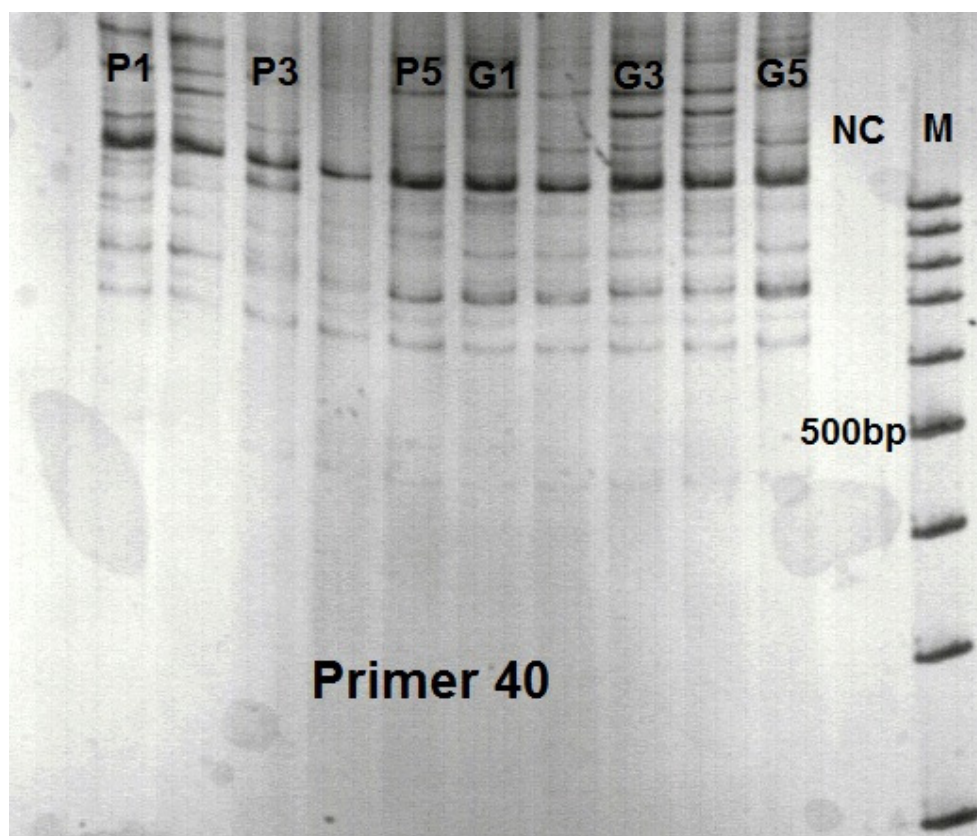
تصویر ۴۸- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر M11. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی M. مارکر مولکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

نتیجه حاصله از واکنش PCR با استفاده از پرایمر ۲۴ شماره نشان داد که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید نمود و محصول PCR این آغازگر تولید ۱۸ باند به طور واضح نمود و کوچکترین باند تولید و تکثیر شده ۲۸۰ جفت باز بود و هیچ تفاوتی به عنوان تمایز در الگوی باندهای DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مشاهده نشد (تصویر شماره ۴۹).



تصویر ۴۹- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر 24.
 ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M.
 مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

پرایمر شماره ۴۰ نشان داد که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید نمود و محصول PCR تکثیر شده، کوچکترین باند تکثیری ۴۰۰ جفت باز و با توجه به مارکر ملکولی شاخص بکار رفته که بزرگترین شاخص آن ۱۰۰۰ جفت باز می باشد تعداد ۸ باند بیش از ۱۰۰۰ جفت باز شمارش گردید. (تصویر شماره ۵۰).



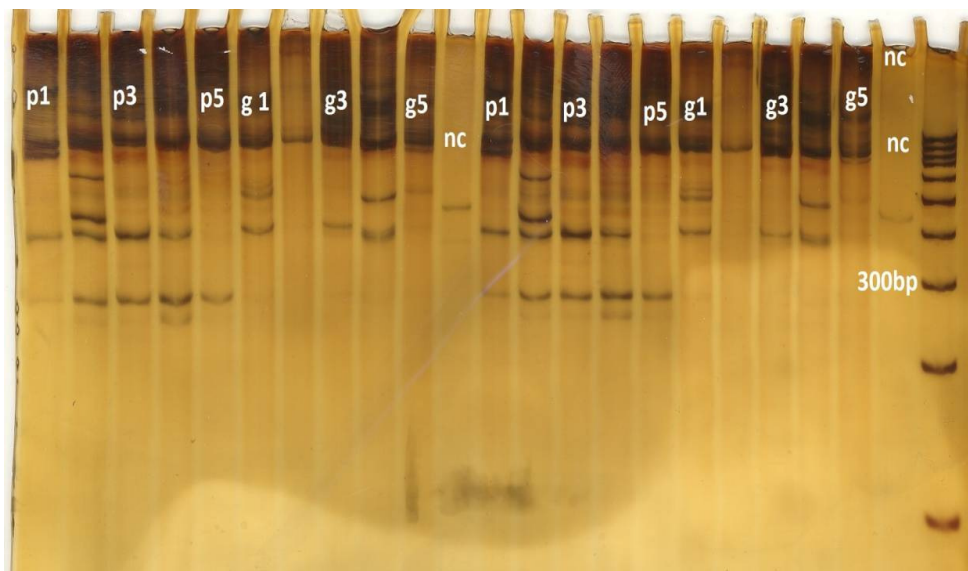
تصویر ۵۰- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر 40. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

نتایج بدست آمده از محصول PCR، ۱۰۱ آغازگر مورد استفاده نشان داد که ۹ آغازگر جدول ۳-۵ بر روی رشته DNA نمونه های تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی پهلوگیری دارد و دارای الگوی تولید و تکثیر محصول PCR هستند و همچنین در این آغازگرها باندهای متمایز مشاهده گردید بدین صورت که در ۵ نمونه از یک گونه، باندهای تولید گردید که در هیچ یک از ۵ نمونه گونه دیگر وجود نداشت. این باندهای متمایز در این ۹ آغازگر محدوده های باندهای متفاوتی در هر آغازگر تولید نمودند که در ادامه با توجه به تصویر هریک از آغازگرها، توضیحات بیشتر ارائه خواهد شد. همچنین نتایج تکرار این آغازگرها که هر یک از آنها به دفعات متفاوت، واکنش PCR در مورد آنها صورت پذیرفت در هیچکدام از آغازگرهای مذکور نتایج اولیه تکرار نگردید (جدول ۳۷).

جدول ۳۷- توالی ۹ پرایمر مورد استفاده، نتایج تکثیر و تعداد دفعات تکرار هر یک از پرایمرها

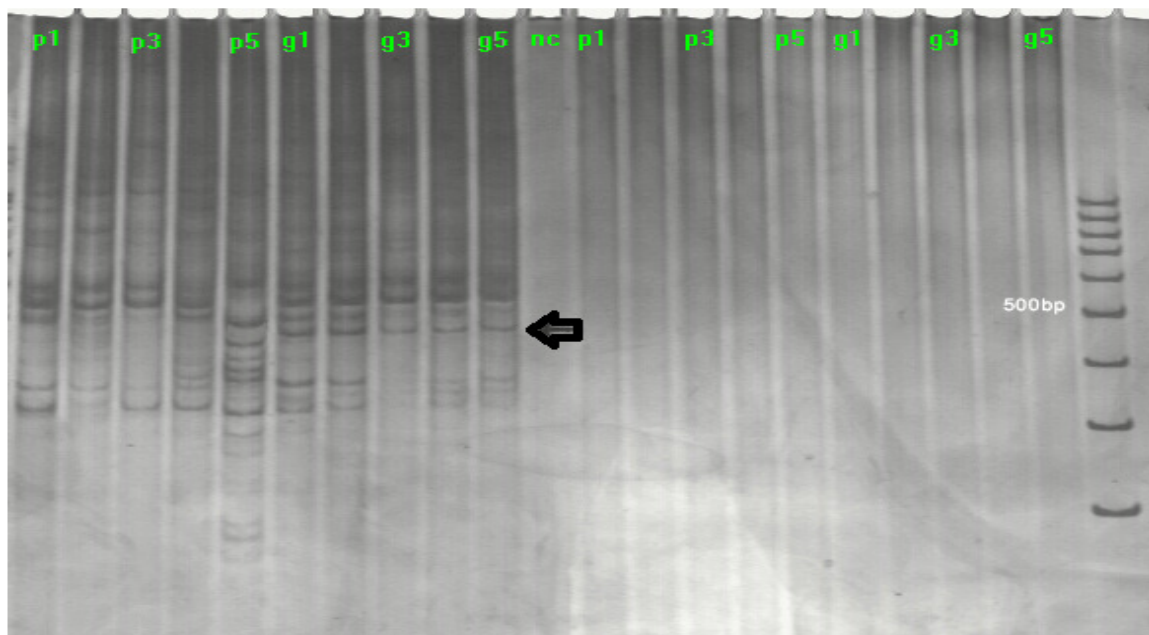
ردیف	نامگذاری پرایمر	(5'-3' توالی پرایمر)	C+G(%)	نتایج تکثیر پرایمر	تعداد دفعات تکرار پرایمر
2	2	5'-CCC GGG TAC C-3'	80%	+	10
5	5	5'-AAA GGG TCC C-3'	60%	+	3
10	10	5'-AGG TCA GGT C-3'	60%	+	5
27	27	5'-CAA TGC CGG A-3'	60%	+	15
30	30	5'-GGA GTA CTG G-3'	60%	+	3
52	B-06	5'-TGC TCT GCC C-3'	70%	+	2
56	H-05	5'-AGT CGT CCC C-3'	70%	+	4
67	N-10	5'-ACA ACT GGG G-3'	60%	+	2
68	N-17	5'-CAT TGG GGA G-3'	60%	+	6

نتیجه محصول PCR با استفاده از آغازگر شماره ۳۰ نشان داد که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید و همچنین الگوی بانندی DNA تولیدی در تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی از یکدیگر متمایزند و اندازه آن در محدوده ۲۹۰ جفت باز بدست آمد. (در آغازگر شماره ۳۰ برای اطمینان بیشتر و همچنین جداسازی باندهای متمایز برای انجام مراحل بعدی تحقیق ۲ سری محصول PCR، Load صورت گرفت و نیز درصد ژل پلی اکریل آمید به صورت ۸٪ استفاده شد). تعداد دفعات تکرار در این آغازگر ۳ مرتبه بود که البته نتیجه مطلوب اولیه حاصل نگردید (تصویر شماره ۴۹).



تصویر ۵۱- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر 30. NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).

نتیجه محصول PCR با استفاده از آغازگر شماره ۵ نشان داد که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید می گردد، همچنین الگوی بانندی DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید شده از یکدیگر متمایز بوده و اندازه آن در محدوده ۵۰۰ جفت باز بود. در پرایمر شماره ۶ هیچگونه الگوی تولید باند در تمامی نمونه های دو گونه مشاهده نگردید و لازم به توضیح است علت اینکه آغازگر شماره ۶ در این بخش توضیح داده شد به جهت قرار گرفتن محصول PCR هر دو پرایمر در یک ژل است (تصویر شماره ۵۲).

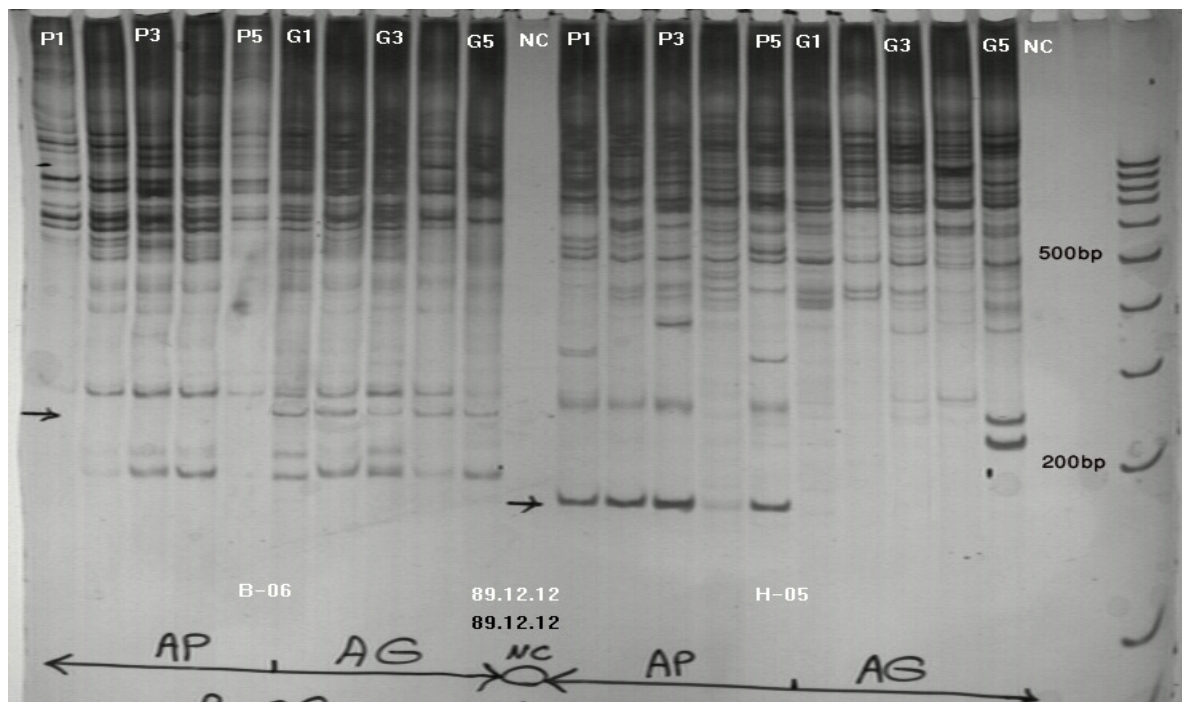


تصویر ۵۲- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر 5 و 6.

ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی وستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M.

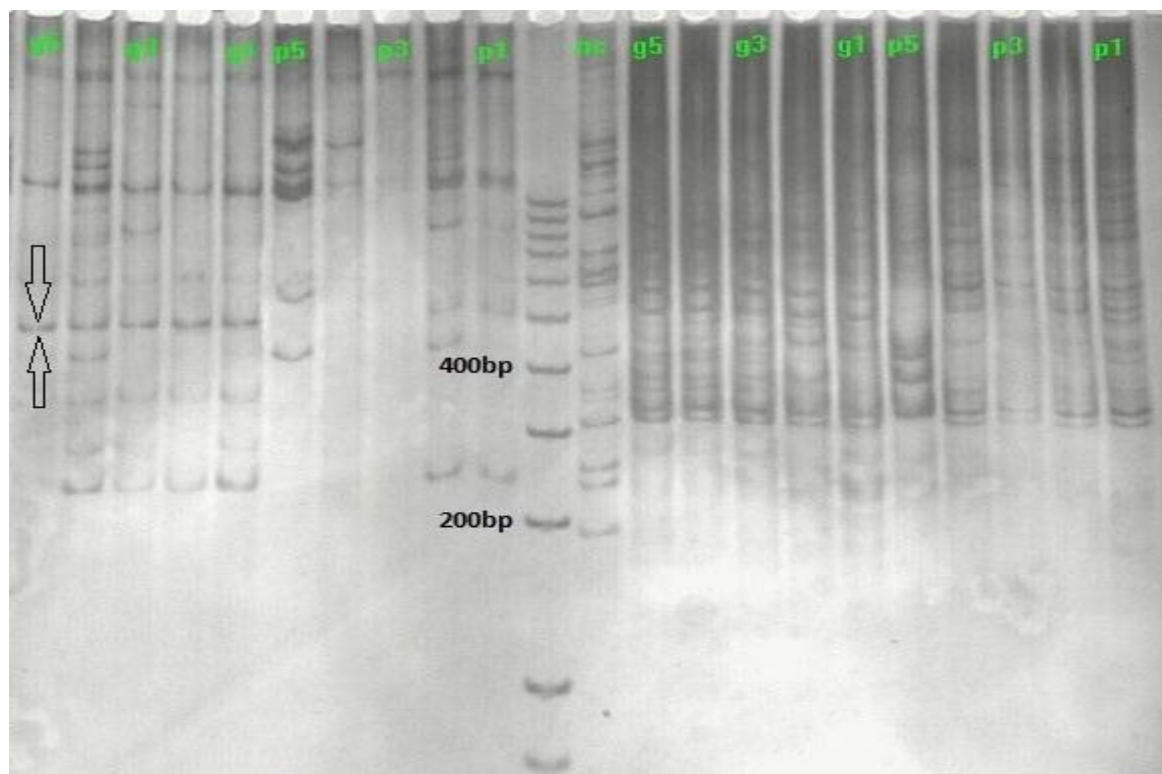
مارکر مولکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

آغازگرهای H-05 و B-06 نشان دادند که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید شده است و همچنین در الگوی بانندی DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی باند متمایز در این دو آغازگر مشاهده شد. باند متمایز مشاهده شده برای آغازگر H-05 در محدوده ۱۷۰ جفت باز و باند متمایز تکثیر شده در آغازگر B-06 در محدوده بانندی ۲۶۰ جفت باز رویت گردید. برای اطمینان کار مجدداً آغازگر H-05 برای ۴ مرتبه واکنش PCR انجام شد تا نتیجه اولیه اثبات گردد ولی نتیجه اولیه حاصل نشد و همچنین آغازگر B-06، نیز ۲ مرتبه دیگر واکنش PCR در مورد این آغازگر انجام شد و نتیجه ابتدایی بدست نیامد (تصویر شماره ۵۳).



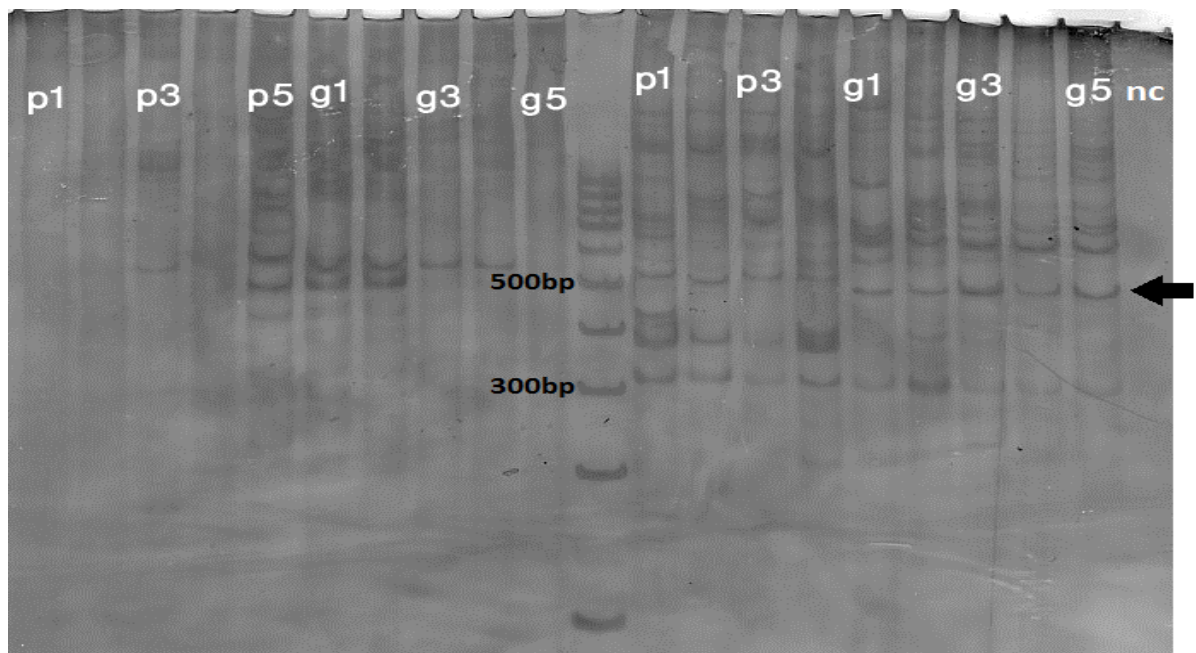
تصویر ۵۳-محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر B-06 و H-05.
 ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی وستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M.
 مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

نتیجه بدست آمده از آغازگر شماره ۲۷ بدین صورت بود که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تکثیر شده و الگوی بانندی DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی باند متمایز از یکدیگر بودند. اندازه باند متمایز در محدوده ۵۰۰ جفت باز بود و برای اطمینان ۱۵ بار دیگر واکنش PCR، انجام گردید که نتیجه بسیار مطلوب اولیه بدست نیامد. پرایمر شماره ۱۹ تولید الگوی باند DNA نمود ولی الگوی باند تولیدی در دو گونه مورد بررسی متمایز نبودند (تصویر شماره ۵۴).



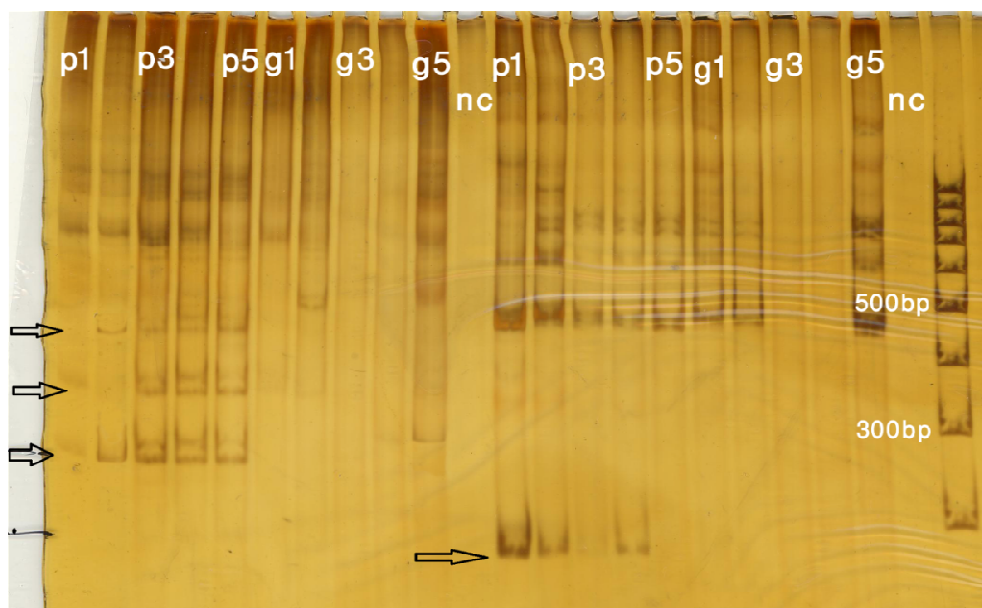
تصویر ۵۴- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمرهای 19 و 27. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

نتیجه بدست آمده از آغازگر شماره ۲ بدین صورت است که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تکثیر گردید و همچنین در الگوی باندهای DNA تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی باند متمایز مشاهده شد که در محدوده ۵۰۰ جفت باز است و همچنین تعداد دفعات تکرار این آغازگر ۱۰ مرتبه انجام شد و نتایج حاکی از عدم تکرار نتیجه اولیه بودند. و نیز پرایمر شماره ۱ که تولید باند نمود ولی باند متمایز مشاهده نگردید (تصویر شماره ۵۵).



تصویر ۵۵- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر 1 و 2.
 ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M.
 مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

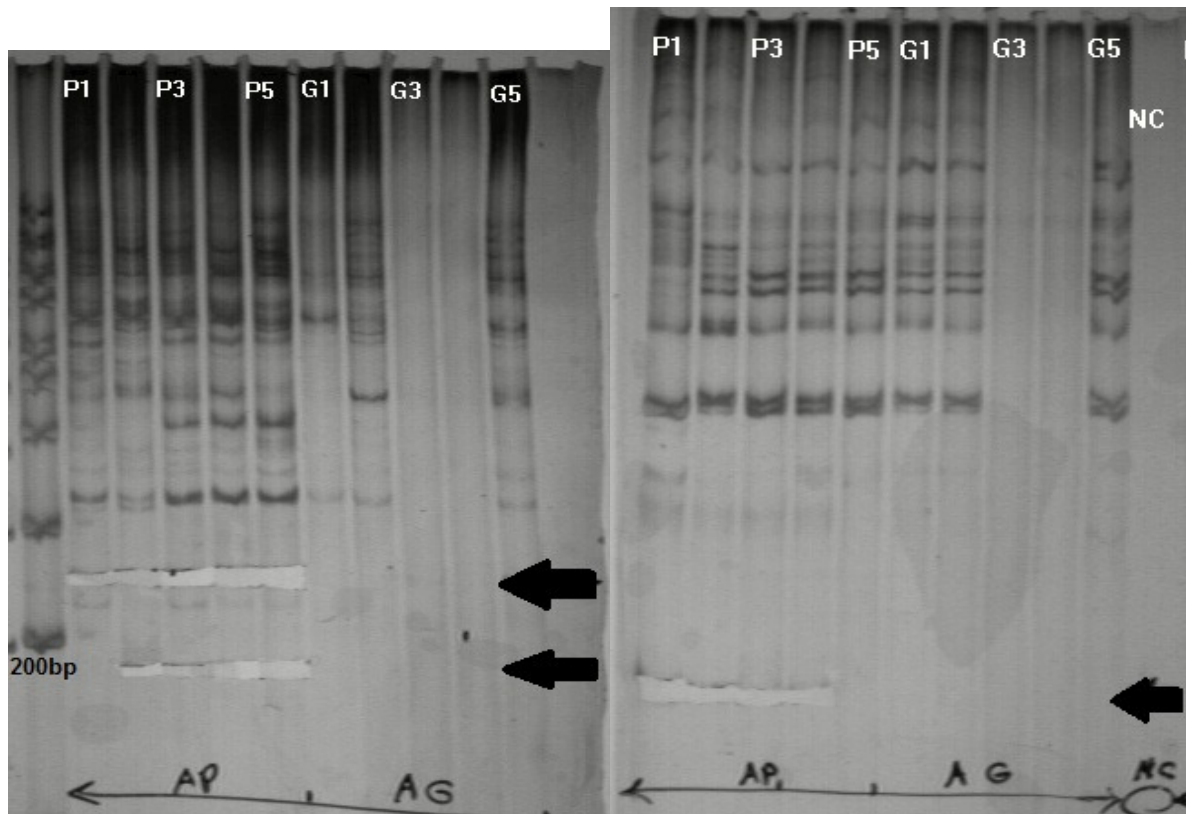
آغازگرهای N-10 و N-17 نشان دادند که باند DNA در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تولید شد که الگوی باند در دو گونه فوق باند متمایز بود، بدین صورت که در آغازگر N-10 در ۳ محدوده به ترتیب در محدوده های ۲۵۰، ۳۳۰ و ۴۵۰ جفت باز بدست آمد. برای اطمینان ۲ مرتبه دیگر واکنش PCR با استفاده از آغازگر فوق تکرار شد ولی نتیجه اولیه صورت پذیرفت. در آغازگر N-17 باند متمایز در محدوده ۲۸۰ جفت باز مشاهده شد و دفعات تکرار این پرایمر برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR)، ۶ بار صورت پذیرفت و نتیجه اولیه حاصل نگردید. (تصویر شماره ۵۶)



تصویر ۵۶- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمرهای N-10 و N-17. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر مولکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

برش باندهای متمایز (چند شکلی)

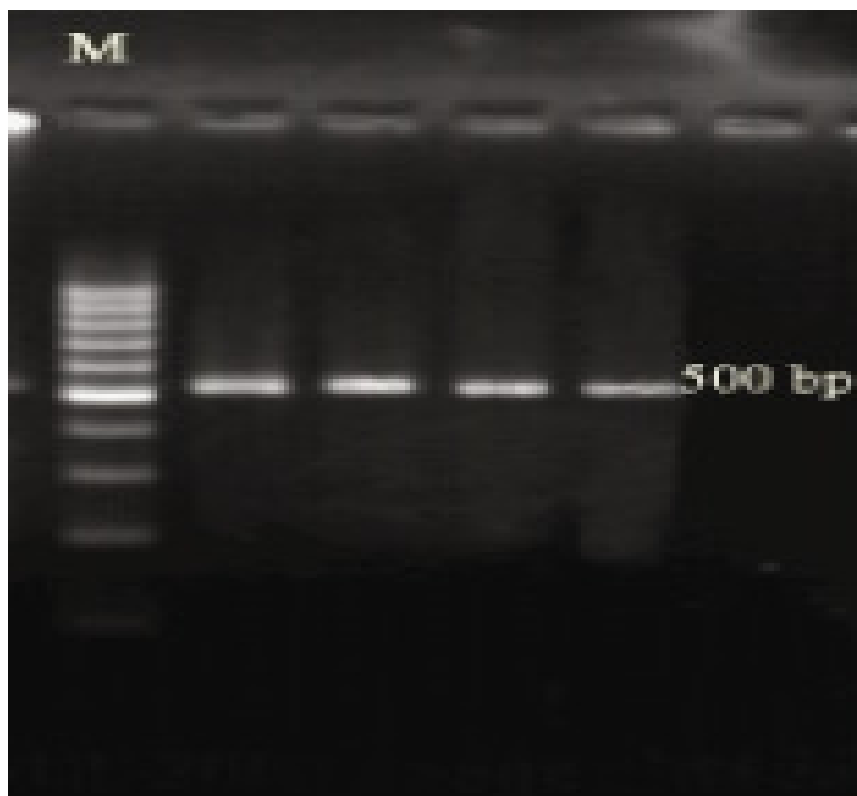
باندهای متمایز برش داده شده با استفاده از آغازگرهای N-10 در ۲ محدوده بانندی و آغازگر N-17 را در یک محدوده بانندی در تصویر ۵۷ ارائه شده است، که با نهایت دقت و در شرایط کاملاً استریل جدا سازی گردید (تصویر ابتدایی آغازگرهای N-10 و N-17 که باندهای متمایز در آنها بدست آمده را قبل از جداسازی در تصویر شماره ۵۶ آمده است). لازم به ذکر است که از تمام آغازگرهایی که ایجاد باند متمایز (چند شکلی) بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی نموده بودند اقدام به جدا سازی باندهای مربوطه شد که توضیحات و تصویر این دو آغازگر به عنوان نمونه ذکر گردید.



تصویر ۵۷- محصول PCR تولید شده با استفاده از آغازگرهای N-10 و N-17 پس از برش باندهای متمایز (چند شکلی) از روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ و رنگ آمیزی شده با روش نیترا ت نقره.

تکثیر نوارهای برش یافته

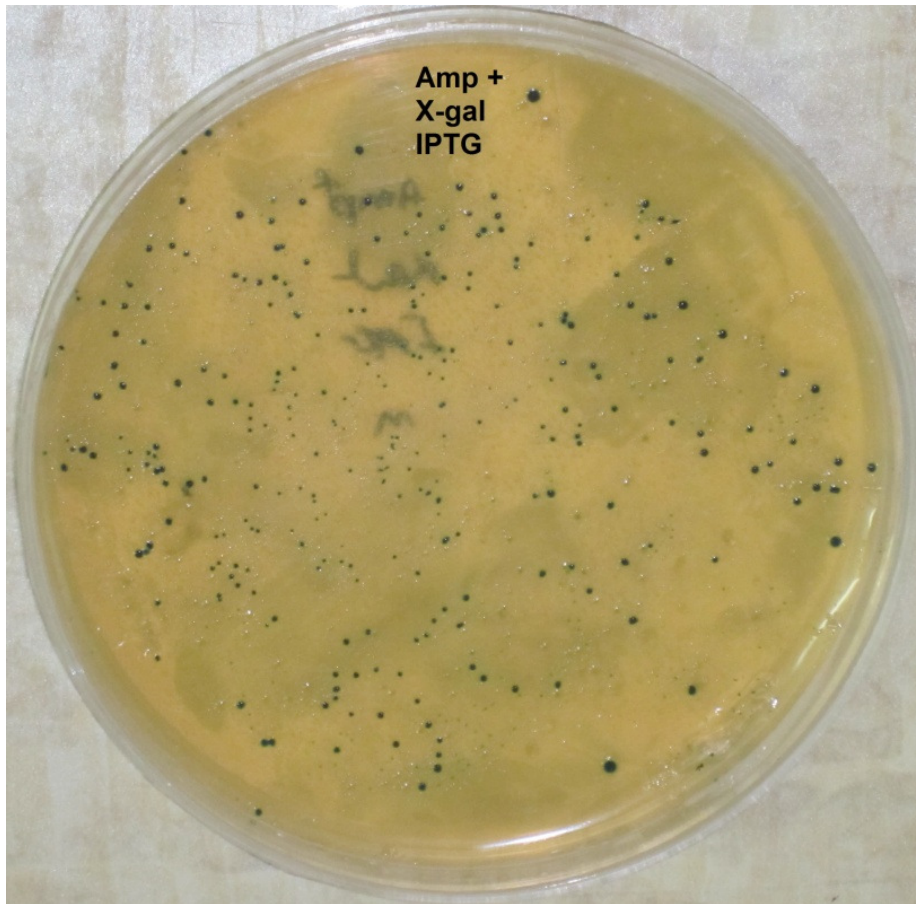
در این تحقیق باندهای متعددی از ۹ ژل برش داده شد که جهت رعایت اختصار نتایج یکی از آنها ارائه می شود. پس از جداسازی باندهای متمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی ، با استفاده از آغازگر شماره ۲۷ اقدام به تکثیر مجدد گردید. عدم دقت در مرحله جداسازی نوارها باعث آلودگی یا تکثیر سایر نوار- های مجاور و کاهش عملکرد در مرحله همسانه سازی می شود. پس از تکثیر DNA محصول، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای تائید اندازه نوار و عدم وجود هاله مورد بازبینی قرار گرفتند. محصول PCR تولید شده اندازه های در محدوده 500bp را داشت (تصویر ۵۸) که مربوط به باند متمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی در محدوده 500bp جداسازی شده از ژل پلی اکریل آمید با استفاده از آغازگر شماره ۲۷ بود.



تصویر ۵۸-محصول PCR تولید شده پس از تکثیر مجدد نوارهای برش داده شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

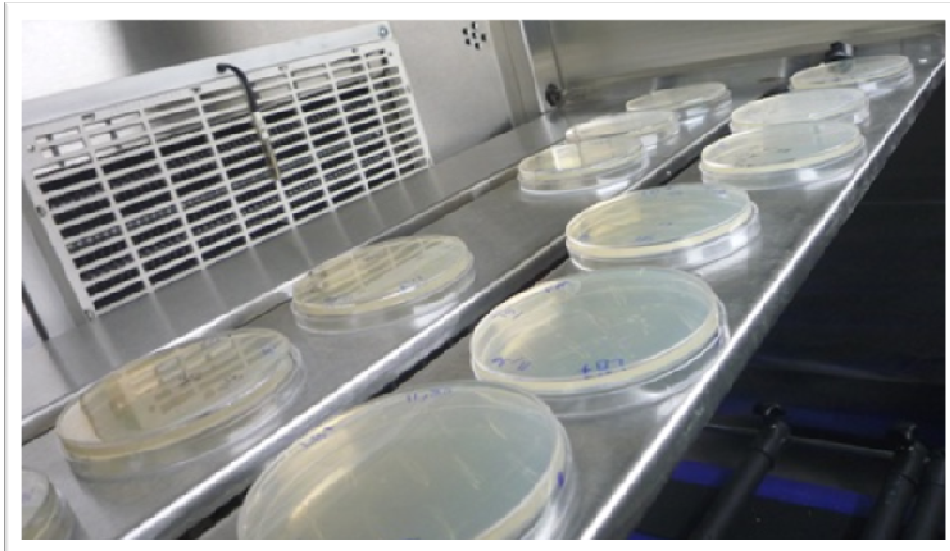
همسانه‌سازی (Cloning)

پس از انتقال صحیح قطعه DNA خارجی که در این بررسی باند DNA تمایز دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی بود، سبب می شود که ناقل یا وکتور PTZ 57 R به صورت حلقوی درآید. اگر قطعه DNA مورد نظر به طور صحیح وارد ناقل نشود ژن کشنده فعال شده و سبب از بین رفتن باکتری می شود. وجود کلونی های سفید رنگ بر روی محیط کشت LB تایید کننده انتقال صحیح قطعه DNA مورد نظر به درون ناقل است (تصویر ۳-۱۸). نتایج بدست آمده از همسانه سازی در این تحقیق نیز نشان داد که پس از کشت باکتری ها بروی محیط کشت LB که حاوی DNA هدف درون ناقل باکتری می باشد ایجاد کلنی های سفید نمودند و این نتیجه بدست آمد که انتقال موفق DNA هدف به داخل باکتری E.coli سویه GM107 انجام گردید (تصویر ۵۹).



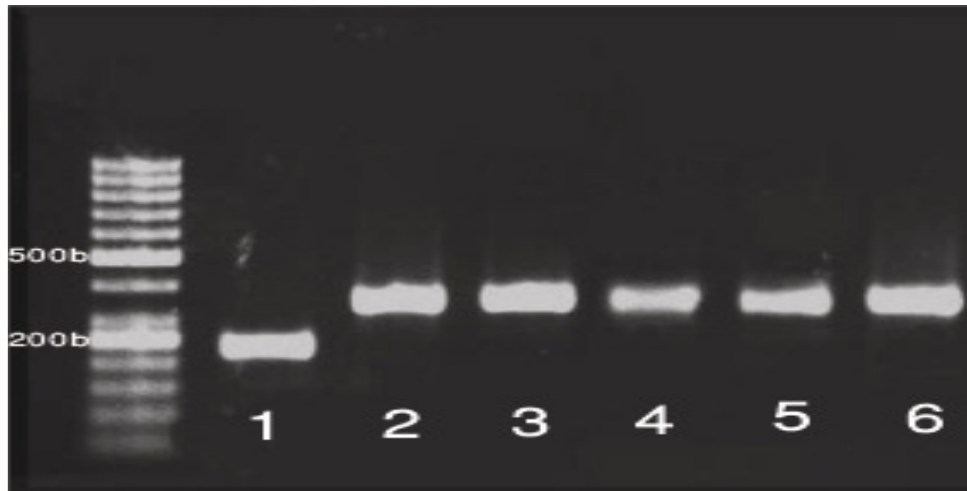
تصویر ۵۹- رشد باکتری در محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین پس از ورود قطعه DNA هدف در حامل پلاسمیدی PTZ57R

کلنی سفید رنگ بیانگر انتقال موفق DNA هدف و کلنی های آبی رنگ فاقد DNA هدف می باشد.



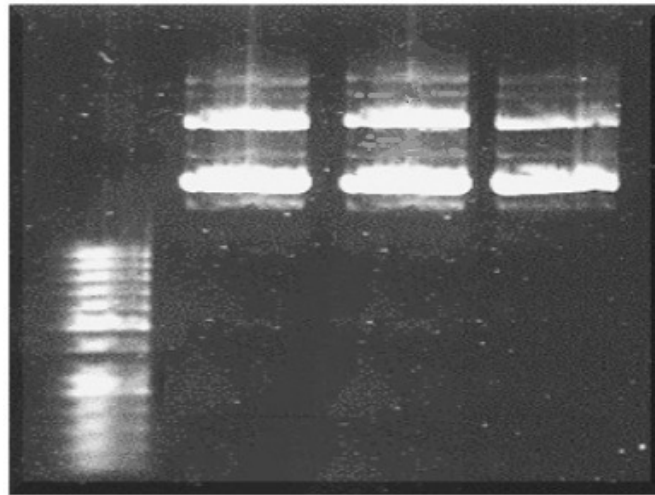
تصویر ۶۰- کشت باکتری در محیط LB در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد.

کلونی PCR (تکثیر کلونی ها) که به منظور تایید اندازه و بازبینی قطعه DNA هدف همسانه سازی شده می باشد، انجام گردید و نتایج بیانگر آن بودند که باندهای با طول کاملاً مشابه با باندهای ۹ آغازگر رپید که ایجاد باند متمایز نموده بودند بدست آمد تصویر ۶۱ نمونه ای از نتایج کلونی PCR می باشد.



تصویر ۶۱ - الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ محصول کلونی PCR به منظور شناسایی همسانه مطلوب در ۲ محدوده بانندی 500bp مربوط به آغازگر شماره ۲۷ (ستون های ۶-۲) و 200bp تکثیر شده مربوط به آغازگر H-05 (ستون ۱).

استخراج پلاسمید از کلنی هایی که در مرحله کلونی PCR اندازه بانندی آنها با آغازگر مربوطه ایجاد کننده باند متمایز کاملاً مشابه بود صورت گرفت و نتایج آن پس از بررسی کمی و کیفی از طریق اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز نشان دهنده صحت و تایید مرحله استخراج پلاسمید است. به عنوان نمونه آغازگر شماره ۲ ایجاد باند متمایز در محدوده ۵۰۰ جفت باز برای گونه تاس ماهی روسی نمود و پس از انجام مرحله استخراج پلاسمید نتیجه بدست آمده بیانگر آن بود که دقیقاً باندهای متناسب با باندهای متمایز اولیه آغازگر شماره ۲، در مرحله استخراج پلاسمید که در محدوده ۵۰۰ جفت باز می باشد مشاهده گردید و نتیجه مطلوب مورد نظر در این مرحله از تحقیق انجام شد. برای ۸ آغازگر دیگر ایجاد کننده باندهای متمایز نیز مرحله استخراج پلاسمید با موفقیت انجام شد که به جهت اختصار بیان نگردید (تصویر ۶۲).



تصویر ۶۲- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ استخراج پلاسمید برای ۳ نمونه.

توالی یابی نمونه ها

نتایج بدست آمده توالی یابی ۳ نمونه از تاس ماهی ایرانی و ۳ نمونه تاس ماهی روسی در ادامه ذکر گردیده است. شایان ذکر است توالی های دیگری نیز از آغازگرهای ایجاد کننده باند تمایز بدست آمد اما بدلیل اینکه پرایمر طراحی شده از آنها نتیجه مورد نظر در این تحقیق را نداشتند برای اختصار توالی آنها بیان نگردید.

```

p1      AACCGGGGTGA-ATGG-GTGAACACGGAGTGACTCATC-TACATTT-GAGA-GCTTCCCA
p13     --CGGGGGGGACATGGCATAAACACGGGGTGACTCATCATACATTTTGAGA-GCTTCCCA
g6      CGCGTGGTTCGACATGTCCAGAACACGGAGTGTCTCATCAT-CATTTTGAGATGAAGCCCA
g20     --CGGGCGTGC--TAGTCTGA-TACGGGGTGA-TGATCAT-CATTTTGAGT--GTTCCCA
g16     -----CGGGGTGTCTCATCAT-CATTTTGAGA-GAAGCCCA
p11     -----CGGGGTGTTCGCATCATACATTTTGAGA-TCTGCCA
          **** * * * * * * * * * *
    
```

```

p1      TACTTTGAGAGTTGGCTGGAGGCGCCTAGAGTGTCAACCTTCTCAGGGTA-CCCTATTG
p13     TGTTTTGAGAGTTGGTTGGAGGTGCCGAGTGTGTGACCTTCTGATGGAA-CCCTATTG
g6      TACTTTGAGAGTTTGGTGAAGCACCGAGAGAGTCAACGTTTCTCATGACATCCCTATTG
g20     TATTTTGAGAGTTTGGTGGAGGCGCCGAGAGAGTTCG-CGTTTCTCATGACATCCTTCTTG
g16     -GTCGTAGAGTTTGGTGAAGTGCCGAGAGTGTGCG-CGTT-CTCATGGTAC-CTTCTGG
p11     TGCTCGTAGAGTTTGGTGGAGGTGCCGAGATTGTCAACGTTTCTCATGACATTCCTCAGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

p1      ACA--GGATCCATGTTTTTTTCTCA-CTATCCAAAATGACCTATGAGAAAATAATACCAT
p13     CAA--TGATCCATGTTTTTTTCTCA-GTATCCAAAATGACCTATGAGAAAATAATACCAT
g6      CAGCTTGGTT--TGTTTTTTTCTCA-GTATCCAAAATGACCTAGGAGAAAATAATACCAT
g20     CAGCTGGGTT--TGTTTGGTGAAGAAGTATGTCAA-TGACATATGAGAGAATAATACCAT
g16     CAGCTGGGTT--TGTTTTTTTAAAGCACTGTGTCATGCTGC-TGTTTGTGCACA-CGGGTT
p11     CAGC-GGGTT--TGTTGGTG-AAGCACTATGTCATGCTGC-TATGAGAGAACT-CGGGTT
          * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

p1      ATTCCTTTTTTTTAA-CACGCTTTTTTTTCTTAATCTCTACTGCACTAGCGTTGCATAAA
p13     ATTCCTTCATTTTTAACACGCTTTTTTTTCTTAATCTCTACTGCACTAGAGATGCGTGTA
g6      ATTCCTTCATTTTTGCACGCTTTTTTTTCTTAAATTTCTACTGCACTAACATTGCATATA
g20     ATTCCTTTTTTTTTG-CACGCTTTTTTTTCTTAAATTTGAGTGCCTAACGATGTGTGTA
g16     ATTCCTTTTTTTTTAA-GACGCACTTTTTTCGCAA-TTTTAGTACAGTAGCATTGCGTGTA
p11     ATTCCTTTTTTTTTG-CACGCTTTTTTTTTCGCAT-CTCTACTGCACTAGCGTTGCGTAAA
    
```

***** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

p1 AAAAAATTGCCAACATATGACGGAACAACCCAATAGC-TTTACCTCTGGCATTATGCTGC
 p13 TAAGTATTGGCAACATTTGAAGTAACTACCCATTAGC-TTTACCTCCGTCATGATACTGC
 g6 TTAATGTTGGCAACATTTGACGGAACACTACCCGAGTGC-TCTTCCTCCGTCATGTCGCTGC
 g20 TTAAAATTGGCTACATTTGACGGGACTACCCGAGTGC-ACTTCCTCCATCATGACGCTGC
 g16 TT-GTGCCTTACATTTGACGTGACTACCCG--AGTGTTTTCTCTGTTCATGACACAGC
 p11 AAAGTGTTTTCTACATTTGACGGAACAACCCAATTAGC-TTTTCCTCTGGCATTTTGCAGA
 ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

p1 TGGCATAAACACGCTGGA-GCTTCCTGAGGAAGTT--GTTCTCTGTTTGCACAATCCAC
 p13 TGGCAAAAAACTGCTGGA-GCTTCCTGAGGAATACCAAGAGAAACGTTT--ACAATGTCA
 g6 CGGCAACAACCCGCTGGA-GCTTCCTGAGGAATACCAAGAGAAACTTTT--ACAATCCCA
 g20 TGAGAAAAAACGAACCATGCTTCCTGAGGAATACCAAGAGAAACGTTT--
 ACAATCTCA
 g16 TGAGAAAAAACGAAGGATGCTGCGGAGGAAGTTGTTAACAGACGTTT--CGATCTCA
 p11 TGGCTTCAACCCGCTGGATCCTGTGCGATGAAGTTGTTCTCTGTTTGTCT--CGATCCAC
 * ** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * *

p1 TAATTTCCAACAAACACTACTAGCTTGAACGGATCAAAAATGCTGATTTTACCCCTGTAT
 p13 TCATTTCCAACAAACACTACGAGCTTGAACGGATCAAAAATGCTGATCAGACCCCTGTAT
 g6 TCATTTCCAACAAACACTACGAGCTTGGACAGATCAAAAATGCTGATTTTACCCCTGTAT
 g20 GCACCTCCGACAAACACTACTAGCATGGACAGATTA AAAACTGCTGATCTTACCCCTGTAT
 g16 GCACTTCCGCCAAACACATCGAGCTTGGACAGATTCAATCTGCTGATTTTACCCTCGCTC
 p11 TCACTTCCGCCAAACACATCTAGCTTGAACGGATTCAATCTGCTTATTTTACCCTCGCTC
 *

p1 TTTTC-CAAATACTGGTGTC-TGTTCCGTGCTGTCCGACTCGC-TGGTTT-CACTCCA--
 p13 TTTTCATACATAACCGGGGAA-TGTTTCAGTGTCTCGACTCGCCTGGTTTGCATTCCAA-
 g6 TTTTC-GACATACTGGTGTC-TGTTTATTGCTGTCTGTCTCGC-TGGTTC--CTTCACA
 g20 TTTTC-TACAT-CCGGTGCAATGTTTGTGCTGTCTGTCTCGC-TGGTTC--CTTCACA
 g16 TTTTA-TACCC-CCGGTGCCATGTCTCTGTCTCCC-GTCTG-C-TGGGT-----
 p11 TTGTA-TACCC-CTGGTGTCGC-CCCCGCGTCGTC-GTCTAAC-TGGTT-----
 *

قابل ذکر است که از روی توالی های ذکر شده (۳ نمونه تاس ماهی ایرانی و ۳ نمونه تاس ماهی روسی) اقدام به طراحی پرایمری شد که منتج به تکثیر باند متمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و روسی گردید و نتیجه طراحی این آغازگر به این صورت است.

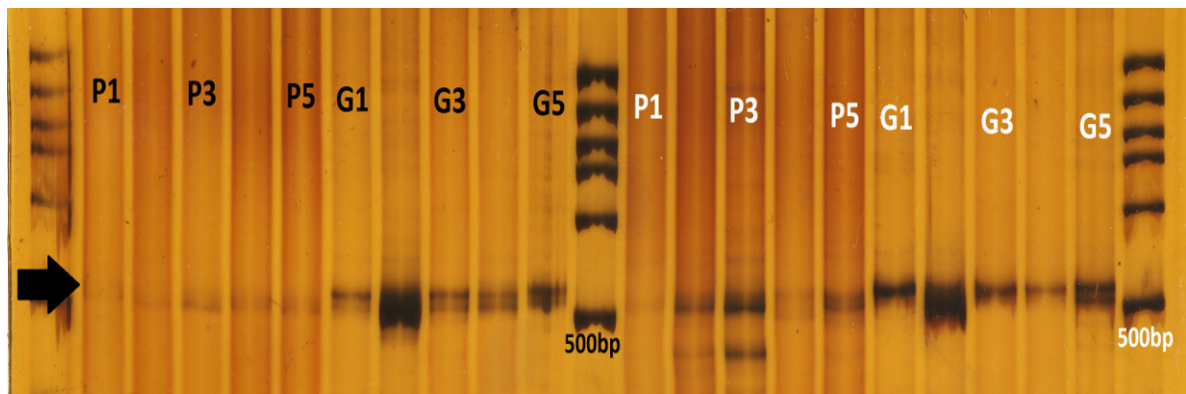
Forward: 5'- GGA ACC AGC GAC TAC GAC AG -3'
Reverse : 5'- GCT TAT GTC AGT TAC GGA G -3'

همچنین نتایج توالی های دیگر و پرایمرهای طراحی شده از آنها که نتیجه ای در بر نداشت برای اختصار ذکر نگردید.

نتایج حاصل از PCR پرایمر طراحی شده برای تفکیک تاس ماهی ایرانی از تاس ماهی روسی

نتایج حاصل از PCR نمونه های DNA استخراج شده از عدد ۵۰ تاس ماهی ایرانی و ۵۰ عدد تاس ماهی روسی با استفاده از آغازگر طراحی شده، منجر به تکثیر باند متمایز در محدوده 500bp در ۵۰ نمونه از گونه تاس ماهی روسی شد که این باند در هیچکدام از ۵۰ نمونه گونه تاس ماهی ایرانی مشاهده نشد (دقت شود که در ۵۰ نمونه تاس ماهی ایرانی تقریباً در همین محدوده و فقط در حدود ۱۰ الی ۲۰ bp کمتر باند تولید گردیده است، اما دقیقاً در راستای باند تولیدی در ۵۰ نمونه تاس ماهی روسی که به عنوان تمایز محسوب می گردد هیچگونه بانندی در این راستا در نمونه های ایرانی تکثیر نشده است). همچنین بهینه کردن شرایط PCR باعث حذف بسیاری از باندهای جانبی شد و بانندی که نشان دهنده تمایز بود دارای تکثیر و تولید بیشتر گردید. نتایج بررسی تمام ۱۰۰ نمونه دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی که محصول PCR آنها بروی ژل پلی اکریل آمید ران گردید آورده شده است که در تمام ۵۰ نمونه روسی این باند مشاهده شد و نتایج یکسانی در بر داشت (تصاویر ۶۲ الی ۷۰).

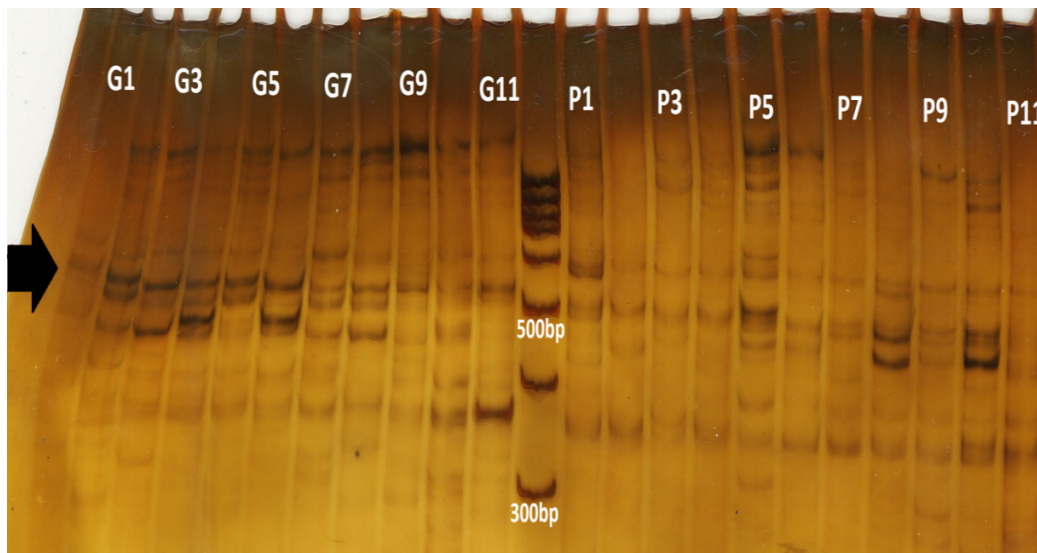
برای افزایش اطمینان از درستی و صحت آزمایش در ۵ نمونه از ۵۰ نمونه در هر گونه پس از انجام واکنش PCR، از ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ استفاده گردید که همان نتایج ژل پلی اکریل آمید ۶٪ را نشان داد (تصویر ۶۳).



تصویر ۶۳- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای.

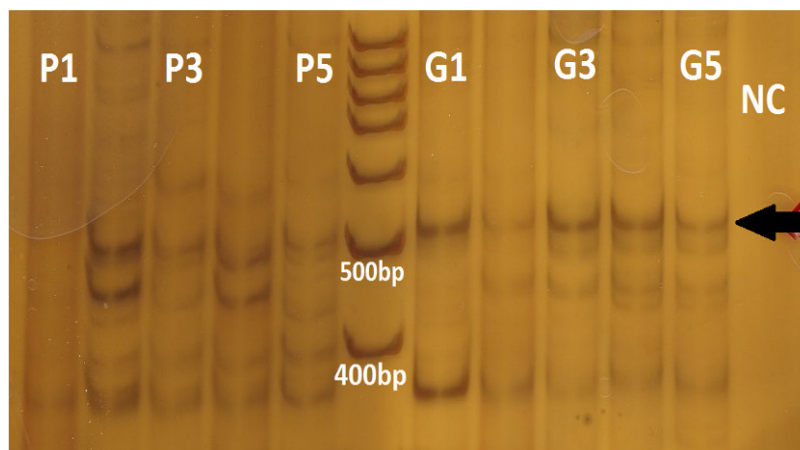
ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M. مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز). NC نمونه کنترل منفی.

نتایج محصول PCR، ۱۶ نمونه تاس ماهی ایرانی و ۱۶ نمونه تاس ماهی روسی از مجموع ۵۰ نمونه از هر گونه قبل از بهینه کردن واکنش PCR نشان داد که باند متمایز در محدوده ۵۰۰ جفت باز برای تاس ماهی روسی تولید و تکثیر شده است و این باند در هیچکدام از ۱۶ نمونه تاس ماهی ایرانی وجود ندارد، البته تکثیر باندهای جانبی دیگری در هر دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی قابل رویت است (تصاویر ۶۴ و ۶۵).



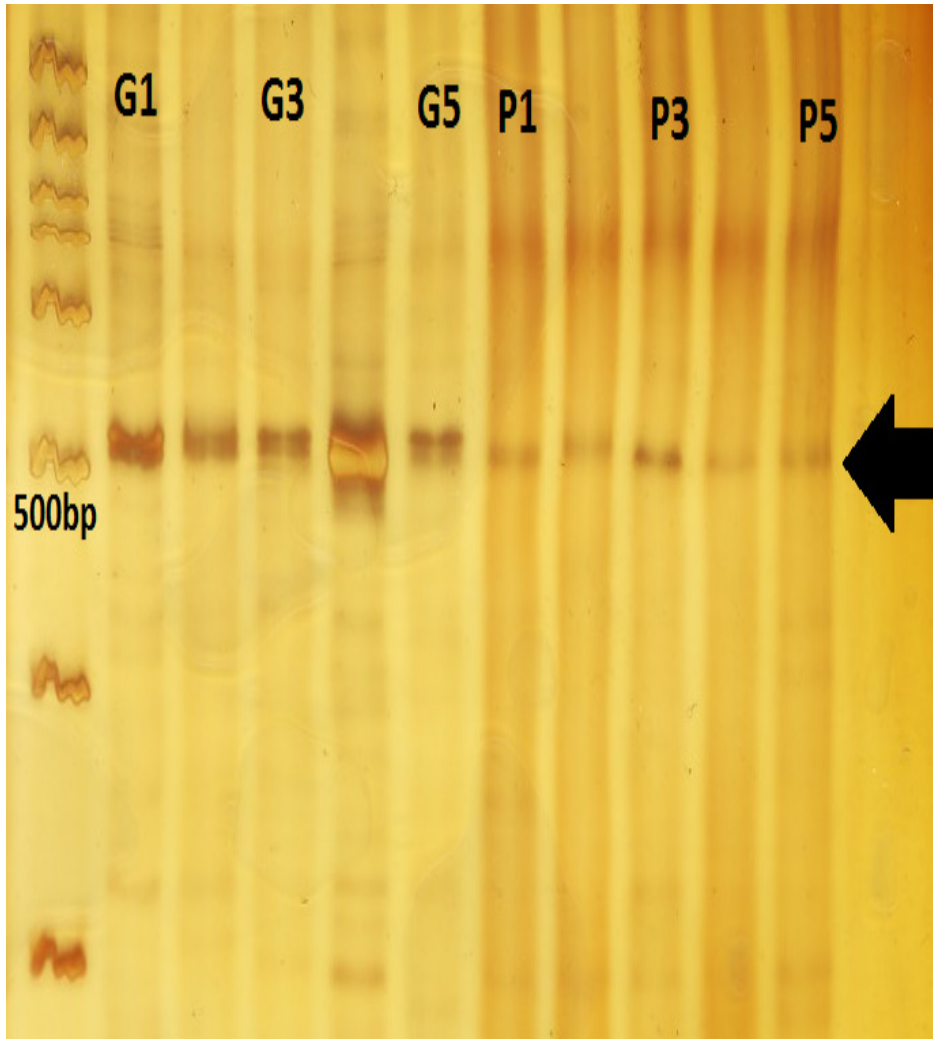
تصویر ۶۴ - محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای.

ستونهای P1-P11 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G11 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).



تصویر ۶۵ - محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای. NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).

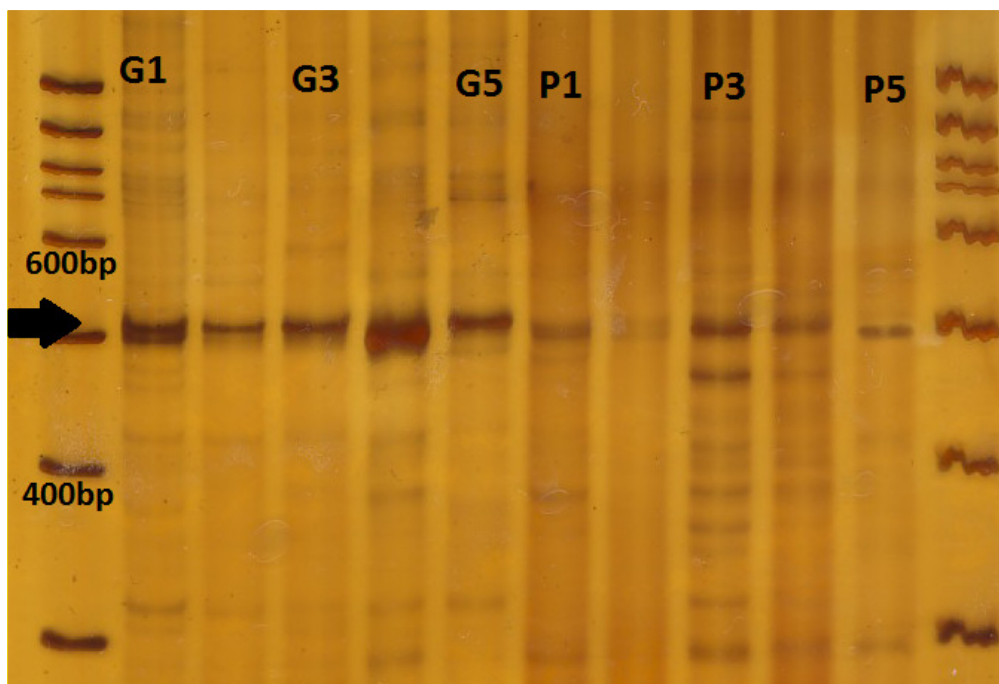
تصویر ۶۶ الی تصویر ۷۱ نشانگر تولید و تکثیر الگوی باند متمایزی است که فقط در ۵۰ نمونه تاس ماهی روسی در محدوده ۵۰۰ جفت باز تولید شده است و البته تمامی این تصاویر و نتایج بدست آمده بعد از بهینه کردن شرایط PCR است که با بهینه کردن شرایط واکنش PCR منجر به کاهش باندهای جانبی گردید ، البته چون در چند نوبت انجام واکنش PCR برای این ۱۰۰ نمونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی صورت پذیرفت مقداری تفاوت در تولید باندهای جانبی مشاهده شد ولی در تمام این موارد باند ایجاد کننده تمایز بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی دارای تولید و تکثیر بود .



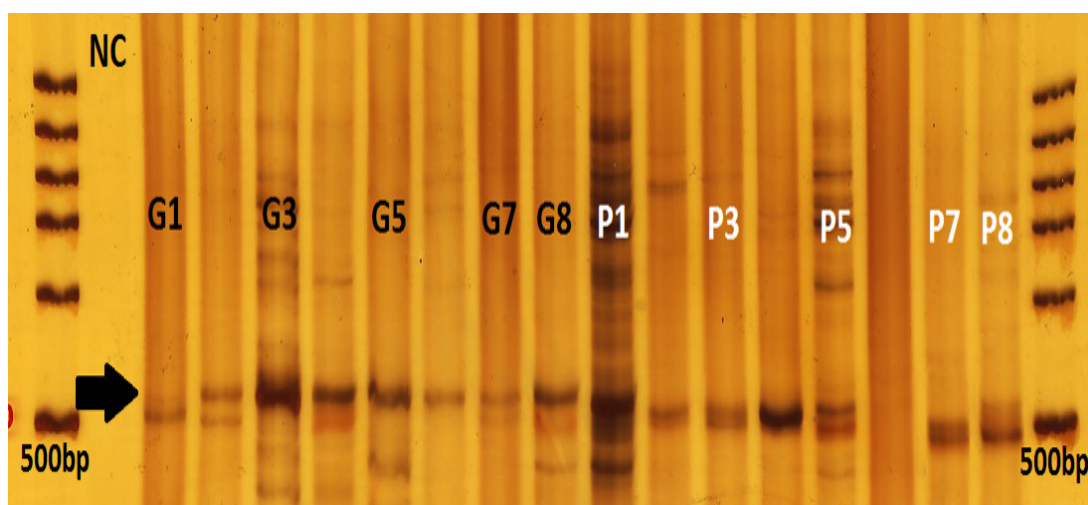
تصویر ۶۶- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای.

NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5

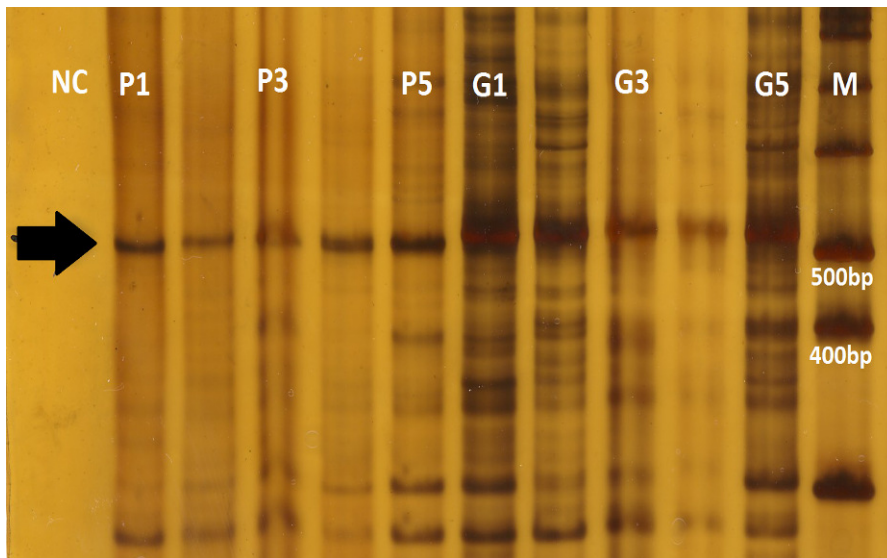
نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).



تصویر ۶۷- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).

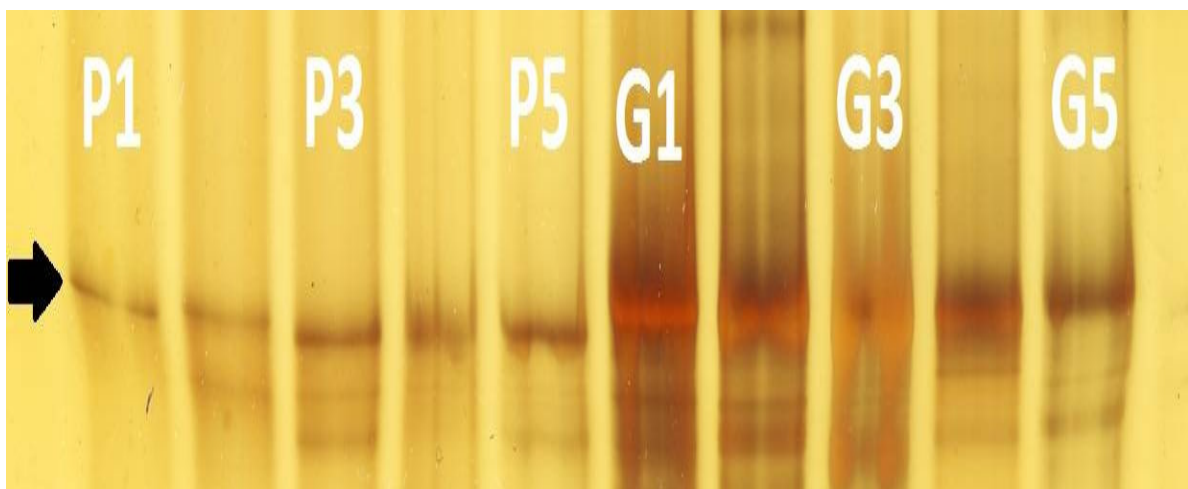


تصویر ۶۸- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای. NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P8 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G8 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).



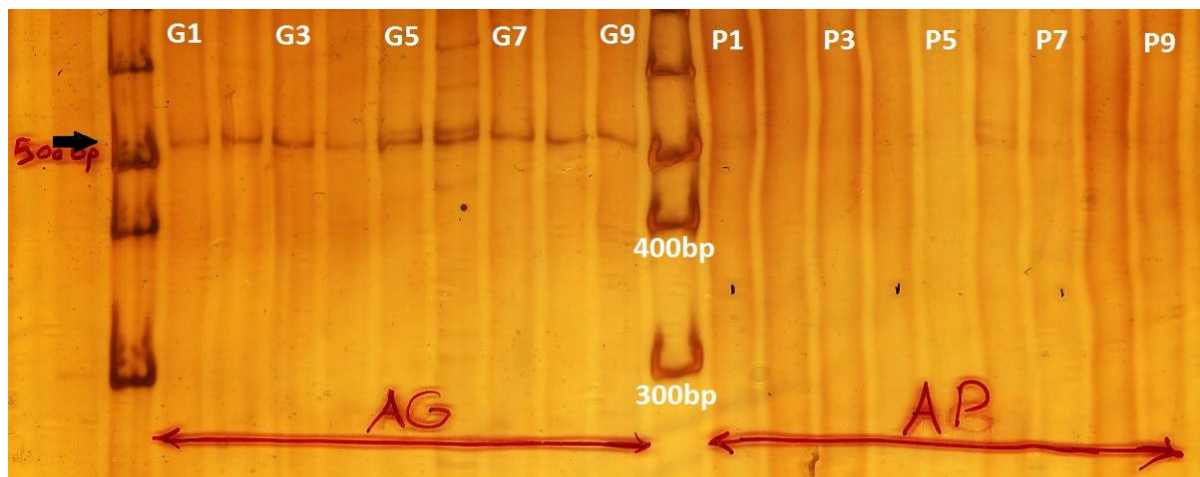
تصویر ۶۹- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای. NC نمونه کنترل منفی. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر ملکولی (۸۰ جفت باز).

در این تصویر به علت بزرگنمایی به جهت بهتر نشان دادن تمایز باندهای حاصله مارکر ملکولی در تصویر مشاهده نمی شود.



تصویر ۷۰- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای تفکیک گونه ای. ستونهای P1-P5 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G5 نمونه تاس ماهی روسی

نتایج محصول PCR ۹ نمونه از ۵۰ نمونه تاس ماهی ایرانی و ۹ نمونه از ۵۰ نمونه تاس ماهی روسی تصویر ۳-۳۰ مشاهده می شود نشان داد، تکثیر و تولید باند متمایز DNA در محدوده ۵۰۰ جفت باز برای ۹ نمونه تاس ماهی روسی حاصل گردیده است و هیچ گونه باند مشابهی در نمونه های تاس ماهی ایرانی تولید نگردید و همچنین هیچگونه باند جانبی در نمونه های تاس ماهی روسی مشاهده نشد که در ۴۱ نمونه دیگر از هر گونه به اینصورت کاهش باند های جانبی مشاهده نگردید.



تصویر ۷۱- محصول PCR تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی با استفاده از پرایمر طراحی شده

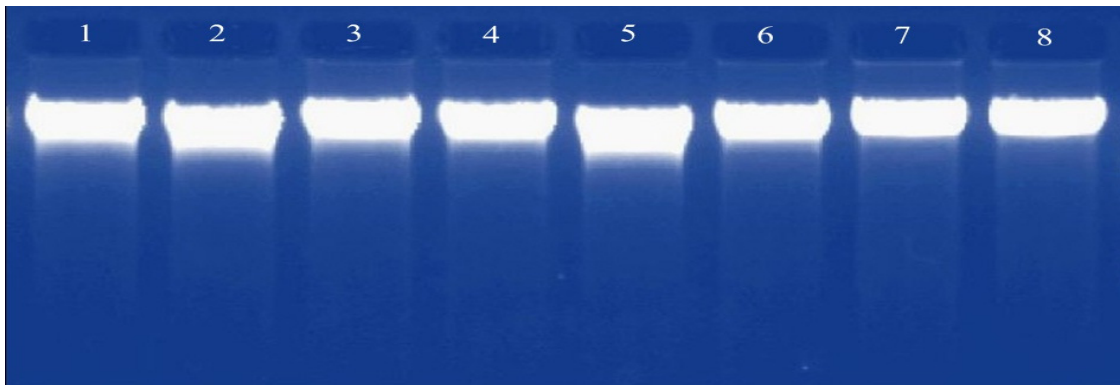
برای تفکیک گونه ای. NC نمونه کنترل منفی.

ستونهای P1-P9 نمونه تاس ماهی ایرانی و ستونهای G1-G9 نمونه تاس ماهی روسی. M مارکر مولکولی (۸۰ جفت باز).

۷-۴- نتایج مطالعات با استفاده از هورمون رشد

۷-۴-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA

بررسی DNA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که باند های به دست آمده کاملاً واضح و فاقد هر گونه آلودگی RNA و پروتئین بودند که نشاندهنده انجام صحیح مراحل استخراج DNA بود. در این تحقیق از نمونه هایی که بالاترین کیفیت و کمترین آلودگی را بر روی ژل آگارز نشان دادن برای انجام PCR استفاده گردید (تصویر ۷۲).



تصویر ۷۲- محصول DNA پس از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ستون های ۱-۴ مربوط به DNA تاسماهی ایرانی و ستون های ۵-۸ مربوط به DNA تاسماهی روسی می باشد.

مقادیر کمی DNA های استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ بر اساس جذب نوری مولکول DNA در محدوده ۲۶۰ الی ۲۸۰ نانومتر نشان داد که DNA های استخراج شده در محدوده ۲-۱/۸ و غلظت بالای ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار هستند لذا از نمونه هایی با کیفیت مطلوب برای PCR استفاده گردید. جدول ۳-۱ غلظت و ضریب جذب DNA های استخراج شده از ۴ نمونه تاسماهی ایرانی و ۴ نمونه تاسماهی روسی به منظور PCR را نشان می دهد. کمترین غلظت DNA مربوط به نمونه ۸ تاسماهی روسی با ۶۵۹ ng/ul و بیشترین غلظت به دست آمده مربوط به نمونه ۴ در تاسماهی ایرانی با ۱۰۲۳ ng/ul می باشد.

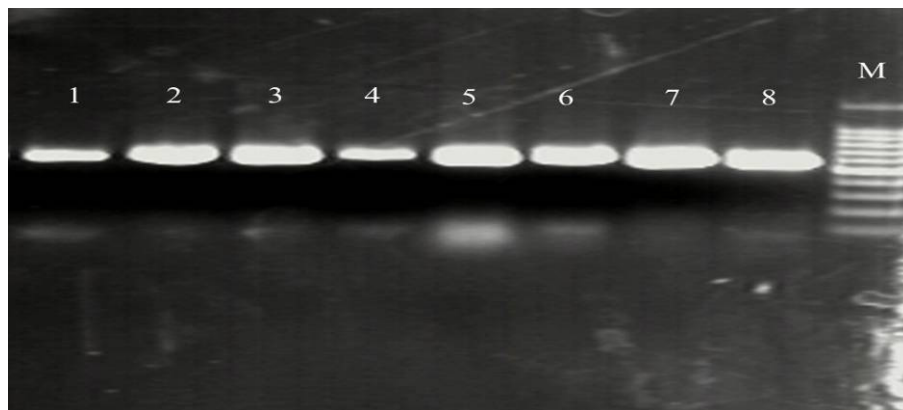
جدول ۳۸- غلظت و ضریب جذب DNA های استخراج شده در تاسماهی ایرانی و روسی

نمونه	ضریب جذب ۲۶۰/۲۸۰	غلظت ng/ul
تاسماهی ایرانی - ۱	1.87	773
تاسماهی ایرانی - ۲	1.92	765
تاسماهی ایرانی - ۳	1.86	1023
تاسماهی ایرانی - ۴	1.92	831
تاسماهی روسی - ۱	1.89	812
تاسماهی روسی - ۲	1.88	923
تاسماهی روسی - ۳	1.91	893
تاسماهی روسی - ۴	1.88	659

۸-۴- نتایج الکتروفورز محصول PCR

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان داد که باند های بدست آمده کاملاً واضح و فاقد باند غیر اختصاصی و اسمیر و دایمر پرایمر بود. محدوده باند به دست آمده برای ژن هورمون رشد در تمامی نمونه های محصول PCR تاسماهی ایرانی و روسی با توجه به نشانگر مولکولی، ۶۵۰ bp بود.

محصول PCR برای تمامی نمونه های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بر روی ژل آگارز دارای باند قوی بودند و همگی قطعات بدون اختلاف در اندازه شان در یک ردیف قرار داشتند (تصویر ۷۳).



تصویر ۷۳ - محصول PCR حاصل از تکثیر ژن هورمون رشد در دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی پس از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید. ستون های ۱-۴ مربوط به تاسماهی ایرانی و ستون های ۵-۸ مربوط به تاسماهی روسی و ستون M مارکر مولکولی ۱۰۰ bp می باشد.

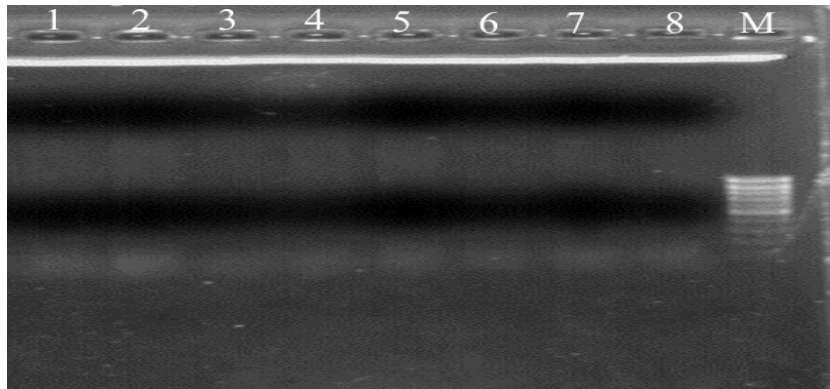
۸-۴-۱- الکتروفورز محصول PCR برای آغاز گر های اینترونی و اگزونی

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد به دست آمده از آغاز گر های اینترونی هیچ بانندی را نشان نداد. آغاز گر هایی که هیچ محصول PCR تولید نکردند حداقل سه بار PCR و الکتروفورز برای آن ها تکرار شد تا از عدم اتصال آغاز گر و تشکیل باند اطمینان حاصل گردد (تصویر ۳-۳). محصول PCR که با آغاز گر های اگزونی انجام شد بسته به نوع آغاز گر طول باند های متفاوتی را بر روی ژل آگارز نشان دادند. جفت آغاز گر های اگزونی طراحی شده از نواحی اگزونی ژن رشد، طول باند های به دست آمده در تاسماهی ایرانی و روسی برابر هم می باشد. کمترین طول باند مربوط به جفت آغاز گر F1-R647 با طول باند ۶۵۰ bp و بیشترین طول باند مربوط به جفت آغاز گر F1-R2393 با طول ۶۵۰ bp می باشد (جدول ۳۹).

جدول ۳۹- اندازه محصول PCR و محدوده باندی طبق آغاز گر های مختلف

محدوده باندی	جفت آغاز گر مورد استفاده در هر PCR
650 bp	F1-R2393
150 bp	F1-R647
300 bp	F1-R1620
550 bp	F645-R2393
350 bp	F1641-R2393
250 BP	F645-R1620

پس از الکتروفورز محصول PCR و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، هیچ بانندی بر روی ژل مشاهده نگردید و بیانگر آن است که PCR محصولی نداشته و ژن مزبوطه تکثیر نگردید (تصویر ۷۴).



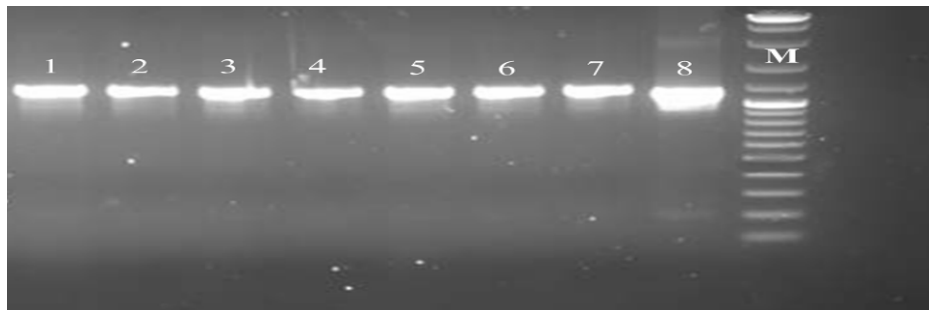
تصویر ۷۴- الکتروفورز محصول PCR نواحی ایترونی. ستون M مارکر مولکولی ۱۰۰ bp و ستون ۱-۴ مربوط به محصول PCR نمونه های تاسماهی ایرانی و ستون ۵-۸ مربوط به نمونه های محصول PCR تاسماهی روسی می باشد.

۲-۸-۴- توالی ژن رشد

محصول PCR چهار نمونه تاسماهی ایرانی و چهار نمونه تاسماهی روسی پس از بررسی کیفیت باندهای بدست آمده بر روی ژل آغاز ۱٪، به منظور شناسایی ژن سنتز کننده هورمون رشد توالی یابی شدند تا صحت ژن سنتز کننده هورمون رشد به دست آید که نتایج زیر به دست آمد:

۳-۸-۴- کلون توالی ژن رشد در وکتور PTZ57R/T

پس از الحاق ژن به وکتور PTZ57R/T و تکثیر آن توسط باکتری، نمونه های به دست آمده با انجام HotStart PCR بر روی الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیانگر الحاق صحیح ژن به وکتور و تشکیل باند در محدوده ژن و وکتور مورد نظر بر روی ژل آگارز بود (تصویر ۷۵).



تصویر ۷۵- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای وکتور حاوی ژن رشد. ستون های ۴-۱ تاسماهی ایرانی و ستون های ۸-۵ تاسماهی روسی و ستون M مارکر مولکولی ۱۰۰ bp می باشد.

۴-۸-۴- نتایج توالی ژن رشد در تاسماهی ایرانی

بر اساس شمارش نوکلئوتید های توالی های به دست آمده مشخص گردید که ژن کد کننده هورمون رشد تاسماهی ایرانی دارای توالی ۶۴۵ نوکلئوتیدی می باشد و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را کد گذاری می کند. این ژن با کدون آغاز ATG شروع و در جایگاه ۶۴۵ با کدون TAG متوقف می شود. توالی های ژن رشد به دست آمده تاسماهی ایرانی با استفاده از نرم افزار MEGA 4 با یکدیگر بلاست شدند و از نظر همولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز توالی نشان دهنده ۱۰۰ درصد همولوژی چهار نمونه تاسماهی ایرانی می باشد (مقایسه ذیل). نتایج بیانگر این است ژن سنتز کننده هورمون رشد در تاسماهی ایرانی یک ژن پیوسته بدون نواحی اگزونی بر روی DNA ژنومی می باشد. در ژن رشد این ماهی از کدون آغاز تا پایان هیچ اینترونی مشاهده نگردید. توالی به دست آمده درصد همولوژی بالایی را با نواحی اگزونی ژن رشد سایر گونه های مهره دار نشان داد.

P1 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 P2 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 P3 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 P4 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60

M A S G L L L C P V L L V I L L V S P K

P1 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 P2 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 P3 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 P4 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120

E S G A Y P M I P L S S L F T N A V L R

P1 GCACAGTACCTACACCAGCTTGCTGCAGACATTTACAAAGATTTTCGAGCGTACCTATGTT 180
 P2 GCACAGTACCTACACCAGCTTGCTGCAGACATTTACAAAGATTTTCGAGCGTACCTATGTT 180
 P3 GCACAGTACCTACACCAGCTTGCTGCAGATATTTACAAAGATTTTCGAGCGTACCTATGTT 180
 P4 GCACAGTACCTACACCAGCTTGCTGCAGACATTTACAAAGATTTTCGAGCGTACCTATGTT 180

A Q Y L H Q L A A D I Y K D F E R T Y V

P1 CCAGATGAGCAACGTCCTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCTGAGACC 240
P2 CCAGATGAGCAACGTCCTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCTGAGACC 240
P3 CCAGATGAGCAACGTCCTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCTGAGACC 240
P4 CCAGATGAGCAACGTCCTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCTGAGACC 240

P D E Q R H S S K N S P S A F C Y S E T

P1 ATCCCTGCTCCCACTGGCAAAGATGAGGCCCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
P2 ATCCCTGCTCCCACTGGCAAAGATGAGGCCCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
P3 ATCCCTGCTCCCACTGGCAAAGATGAGGCCCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
P4 ATCCCTGCTCCCACTGGCAAAGATGAGGCCCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300

I P A P T G K D E A Q Q R S D V E L L Q

P1 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTTC 360
P2 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTTC 360
P3 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTTC 360
P4 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTTC 360

F S L A L I Q S W I S P L Q S L S R V F

P1 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAACTGAAAGATCTGGAG 420
P2 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAACTGAAAGATCTGGAG 420
P3 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAACTGAAAGATCTGGAG 420
P4 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAACTGAAAGATCTGGAG 420

T N S L V F S T S D R V F E K L K D L E

P1 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
P2 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
P3 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
P4 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480

E G I V A L M R D L G E G G F G S S T L

P1 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
P2 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
P3 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
P4 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540

L K L T Y D K F D V N L R N D D A L F K

P1 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
P2 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
P3 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
P4 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600

N Y G L L S C F K K D M H K V E T Y L K

P1 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
P2 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
P3 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
P4 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645

V M K C R R F V E S **N C T L**

مقایسه توالی ژن هورمون رشد در چهار نمونه تاسماهی ایرانی به همراه توالی اسید آمینه آن. P1، P2، P3 و P4 مربوط به نمونه های تاسماهی ایرانی ۱ الی ۴ می باشد، توالی اسیدهای آمینه با حروف انگلیسی بزرگ در حد فاصل ۲ توالی نشان داده شده است.

۵-۸-۴- نتایج توالی ژن رشد در تاسماهی روسی

ژن سنتز کننده هورمون رشد در تاسماهی روسی دارای توالی ۶۴۵ نوکلئوتیدی می باشد که پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را کد گذاری می کند. این ژن با کدون آغاز ATG شروع و با کدون TAG در جایگاه ۶۴۵ تمام می شود. با استفاده از نرم افزار MEGA 4 چهار نمونه تاسماهی روسی با یکدیگر بلاست شدند (مقایسه ذیل).

G1 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 G2 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 G3 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 G4 ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60

M A S G L L L C P V L L V I L L V S P K

G1 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 G2 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 G3 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 G4 GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120

E S G A Y P M I P L S S L F T N A V L R

G1 GCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGACATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTT 180
 G2 GCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGACATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTT 180
 G3 GCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGACATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTT 180
 G4 GCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGACATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTT 180

A Q Y L H Q L A A D I Y K D F E R T Y V

G1 CCAGATGAGCAGCGTCACTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACC 240
 G2 CCAGATGAGCAGCGTCACTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACC 240
 G3 CCAGATGAGCAGCGTCACTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACC 240
 G4 CCAGATGAGCAGCGTCACTCCAGCAAAAACCTCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACC 240

P D E Q R H S S K N S P S A F C Y S E T

G1 ATCCCTGCGCCCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
 G2 ATCCCTGCGCCCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
 G3 ATCCCTGCGCCCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
 G4 ATCCCTGCGCCCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300

I P A P T G K D E A Q Q R S D V E L L Q

G1 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTT 360
 G2 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTT 360
 G3 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTT 360
 G4 TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTT 360

F S L A L I Q S W I S P L Q S L S R V F

G1 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420
 G2 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420
 G3 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420
 G4 ACCAATAGCCTGGTGTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTGTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420

T N S L V F S T S D R V F E K L K D L E

G1 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
 G2 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
 G3 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
 G4 GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480

E G I V A L M R D L G E G G F G S S T L

G1 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
 G2 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
 G3 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
 G4 CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540

L K L T Y D K F D V N L R N D D A L F K

G1 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
 G2 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
 G3 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
 G4 AATTATGGGCTTTTAAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600

N Y G L L S C F K K D M H K V E T Y L K

G1 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
 G2 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
 G3 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
 G4 GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645

V M K C R R F V E S **N C T L**

مقایسه توالی ژن هورمون رشد چهار نمونه تاسماهی روس به همراه توالی اسید آمینه ای آن. P1، P2، P3، P4 مربوط به نمونه های تاسماهی روسی ۱ الی ۴ می باشد، توالی اسید های آمینه با حروف انگلیسی بزرگ در حد فاصل ۲ توالی نشان داده شده است.

۶-۸-۴- ثبت ژن رشد تاسماهی ایرانی

به منظور اطمینان از شناسایی صحیح ژن رشد و ثبت آن، توالی ژن رشد شناسایی شده برای تایید به بانک جهانی ژن NCBI ارسال شد. که با شماره دسترسی JX124221 در بانک ژن ثبت گردیده است (جدول ۴۰).

جدول ۴۰- ثبت ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی به همراه شماره دسترسی، کدون آغاز و پایان ژن رشد، توالی آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی آن.

Acipenser persicus growth hormone gene	
LOCUS	JX124221 DNA linear VRT
23-JUL-2012	
Definition <i>Acipenser persicus</i> growth hormone gene, partial cds.	
ACCESSION JX124221	
VERSION JX124221.1 GI:395759941	
KEYWORDS .	
SOURCE <i>Acipenser persicus</i> (Persian sturgeon)	
ORGANISM <i>Acipenser persicus</i>	
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;	
Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae;	
Acipenser.	
AUTHORS Pourkazemi,M., Salamroodi,M. and Khoshkholgh,M.	
TITLE Identification the growth hormone gene sequence in Acipenseridae	
family	
JOURNAL Unpublished	
REFERENCE 2 (bases 1 to 573)	
AUTHORS Pourkazemi,M., Salamroodi,M. and Khoshkholgh,M.	
TITLE Direct Submission	
JOURNAL Submitted (31-MAY-2012) Guilan University, Genetic, Sangar, Rasht,	
Guilan +98, Iran	
CDS	<1..>573 /codon_start=1 /product="growth hormone" /protein_id="AFN70708.1" /db_xref="GI:395759942" /translation="ESWAYPMIPLSSLFTNAVLRAQYLHQLAADIYKDFERTYVPDEQ RHSSKNSPSAFCYSETIPAPTGKDEAQQRSDEVLLQFSLALIQSWISPLQSLSRVFTN SLVFSTSDRVFEKLDLEEGIVALMRDLGEGGFGSSTLLKLTVDKFDVNLNRNDDALFK NYGLLSCFKMDMHKVETYLKVMKCRRFVESN"
ORIGIN	1 GAGTCTTGGG CCTACCCTAT GATTCCACTA TCCAGTCTTT TCACAAACGC TGTGCTCAGA 61 GCACAGTACC TACACCAGCT TGCTGCAGAC ATTTACAAAG ATTTGAGCG TACCTATGTT 121 CCAGATGAGC AACGTCCTC CAGCAAAAAC TCCCCGTCAG CATTCTGCTA CTCTGAGACC 181 ATCCCTGCTC CCACTGGCAA AGATGAGGCC CAACAGCGAT CAGACGTGGA GCTGCTTCAG 241 TTTTCCCTGG CTCTCATCCA GTCCTGGATT AGTCCCCTGC AGTCCCTGAG CCGTGTTC 301 ACCAATAGCC TGGTGTTTCC CACCTCCGAC CGAGTGTTTG AGAAACTGAA AGATCTGGAG 361 GAAGGCATTG TGGCTCTCAT GAGGGATCTG GGGGAAGGCG GTTTCGGAAG TTCTACTTTG 421 CTGAAGCTCA CTTATGATAA GTTTGATGTC AACCTAAGAA ACGATGATGC TTTGTTTAAA 481 AATTATGGGC TTTTAAGCTG TTTTAAGAAA GATATGCACA AAGTAGAGAC GTACCTGAAA 541 GTGATGAAAT GCAGACGTTT TGTGGAGAGC AAC

۷-۸-۴- ثبت ژن رشد تاسماهی روسی

ژن رشد شناسایی در تاسماهی روسی نیز برای ثبت و تایید آن به بانک جهانی ژن NCBI فرستاده شد. این ژن با شماره دسترسی JX124220.1 بر روی سایت بانک ژن قابل دسترسی می باشد (جدول ۴۱).

جدول ۴۱- ثبت ژن هورمون رشد تاسماهی روسی به همراه شماره دسترسی، کدون آغاز و پایان ژن رشد، توالی آمینو اسیدی و نوکلئوتیدی آن.

<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> growth hormone gene	
LOCUS	JX124220 DNA linear VRT
DEFINITION	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> growth hormone gene, partial cds.
ACCESSION	JX124220
VERSION	JX124220.1 GI:395759939
KEYWORDS	.
SOURCE	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (Russian sturgeon)
ORGANISM	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae; Acipenser.
AUTHORS	Pourkazemi,M., Salamroodi,M. and Khoshkholgh,M.
TITLE	Identification the growth hormone gene sequence in Acipenseridae family
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 582)
AUTHORS	Pourkazemi,M., Salamroodi,M. and Khoshkholgh,M.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (31-MAY-2012) Guilan University, Genetic, Sangar, Rasht, Guilan +98, Iran
CDS	<1..>582 /codon_start=1 /product="growth hormone" /protein_id="AFN70707.1" /db_xref="GI:395759940" /translation="SPKESGAYPMIPLSSLFTNAVLRAQYLHQLAADIYKDFERTYVP DEQRHSSKNSPSAFCYSETIPAPTGKDEAQQRSDELLQFSLALIQSWISPLQSLSRV FTNSLVFSTSDRVFEKLDLEEGIVALMRDLGEGGFGSSTLLKLT YDKFDVNLNRNDDA LFKNYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESN"
ORIGIN	1 TCCCTAAAG AGTCTGGGGC CTACCCTATG ATTCCACTAT CCAGTCTTTT CACAAACGCT 61 GTGCTCAGAG CACAGTACCT ACACCAGCTT GCTGCAGACA TTTACAAAGA TTTCGAGCGA 121 ACCTATGTTT CAGATGAGCA ACGTCACTCC AGCAAAAACCT CCCCCTCAGC ATTCTGCTAC 181 TCTGAGACCA TCCCTGCTCC CACTGGCAAA GATGAGGCC AACAGCGATC AGACGTGGAG 241 CTGCTTCAGT TTTCCCTGGC TCTCATCCAG TCCTGGATTA GTCCCCTGCA GTCCCTGAGC 301 CGTGTTTTCA CCAATAGCCT GGTGTTT CAGC ACCTCCGACC GAGTGTTTGA GAAACTGAAA 361 GATCTGGAGG AAGGCATTGT GGCTCTCATG AGGGATCTGG GGGAAGGCGG TTTCGGAAGT 421 TCTACTTTGC TGAAGCTCAC TTATGATAAG TTTGATGTCA ACCTAAGAAA CGATGATGCT 481 TTGTTTAAAA ATTATGGGCT TTTAAGCTGT TTTAAGAAA ATATGCACAA AGTAGAGACG 541 TACCTGAAAG TGATGAAATG CAGACGTTTT GTGGAGAGCA AC

۸-۸-۴- مقایسه توالی ژن رشد تاسماهی ایرانی با تاسماهی روسی

توالی ژن رشد دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از نرم افزار Clustalw مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد توالی تاسماهی ایرانی با تاسماهی روسی در ۱۰ جایگاه مختلف از نظر نوکلئوتیدی با یکدیگر تفاوت دارد.

این تفاوت در جایگاه نوکلئوتیدی به شماره های ۱۲۳، ۱۳۵، ۱۴۱، ۱۴۷، ۱۶۵، ۱۹۲، ۲۳۴، ۳۰۹، ۳۱۵ و ۳۳۰ می باشد که در تاسماهی ایرانی به ترتیب جایگاه از راست به چپ باز های A، C، T، A، T، T، C و T بوده است که در تاسماهی روسی به ترتیب جایگاه به T، T، A، G، T، G، C، G و C تغییر یافته است (جدول ۴۲).

جدول ۴۲- جایگاه های نوکلئوتیدی بر روی ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی و روسی که با یکدیگر از نظر توالی تفاوت دارند.

جایگاه	تاسماهی ایرانی	تاسماهی روسی
۱۲۳	A	T
۱۳۵	C	T
۱۴۱	T	A
۱۴۷	A	G
۱۶۵	C	T
۱۹۲	A	G
۲۳۴	T	C
۳۰۹	T	G
۳۱۵	T	C
۳۳۰	C	T

۹-۸-۴- استفاده از آنزیم های قطع محدود جهت یافتن مارکر مولکولی تمایز تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی

به منظور تمایز تاسماهی ایرانی و روسی از توالی ژن هورمون رشد دو گونه در جایگاه هایی که دارای اختلاف در توالی نوکلئوتیدی بودند به عنوان یک مارکر استفاده گردید، بدین منظور جایگاه برش ۳۵۴ نمونه از آنزیم های محدود کننده با جایگاه هایی که ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی و روسی با هم اختلاف دارند مقایسه شد (جدول ۴۳). نتایج نشان داد آنزیم قطع کننده ای که بتواند در جایگاه های نوکلئوتیدی مورد اختلاف ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی و روسی عمل نماید وجود ندارد. بررسی ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از نرم افزار NEBcutter V2.0 نشان می دهد که هیچ جایگاه برشی مورد اختلافی مابین دو گونه وجود ندارد.

جدول ۴۳- نام، منبع جداسازی و جایگاه برش تعدادی از آنزیم های قطع کننده

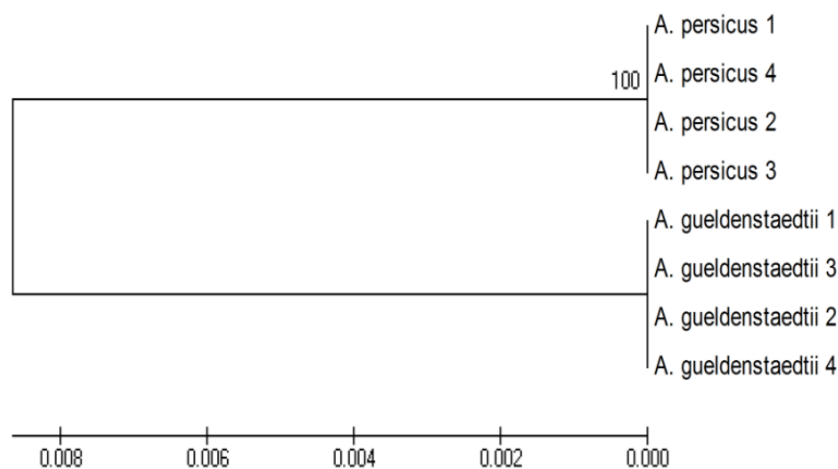
آنزیم	منبع جدا سازی	توالی هدف	نحوه برش
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
EcoRII	<i>Escherichia coli</i>	5'CCWGG 3'GGWCC	5'--- CCWGG---3' 3'---GGWCC ---5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
NotI	<i>Nocardia otitidis</i>	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'
HinfI	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'GANTCA 3'CTNAGT	5'---G ANTC---3' 3'---CTNA G---5'
Sau3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---5'
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
HgaI	<i>Haemophilus gallinarum</i>	5'GACGC 3'CTGCG	5'---NN NN---3' 3'---NN NN---5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
EcoRV	<i>Escherichia coli</i>	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
EcoP15I	<i>Escherichia coli</i>	5'CAGCAGN ₂₅ NN 3'GTCGTCN ₂₅ NN	5'---CAGCAGN ₂₅ NN ---3' 3'---GTCGTCN ₂₅ NN---5'
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'
SalI	<i>Streptomyces albus</i>	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
ScaI	<i>Streptomyces caespitosus</i>	5'AGTACT 3'TCATGA	5'---AGT ACT---3' 3'---TCA TGA---5'
SpeI	<i>Sphaerotilus natans</i>	5'ACTAGT 3'TGATCA	5'---A CTAGT---3' 3'---TGATC A---5'

آنزیم	منبع جدا سازی	توالی هدف	نحوه برش
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---GCATG C---3' 3'---C GTACG---5'
StuI	<i>Streptomyces tubercidicus</i>	5'AGGCCT 3'TCCGGA	5'---AGG CCT---3' 3'---TCC GGA---5'
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

۱۰-۸-۴- مقایسه توالی ژن هورمون رشد تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با روش Neighbor-

Joining

مقایسه ژن هورمون رشد ۴ نمونه تاسماهی ایرانی با ژن هورمون رشد چهار نمونه تاسماهی روسی بر اساس تعیین میزان رابطه خویشاوندی نشان داد که نمونه های تاسماهی ایرانی در خوشه هایی جدا از نمونه های تاسماهی روسی قرار گرفتند. بر اساس روش Neighbor-Joining رابطه خویشاوندی مابین دو گونه بسیار نزدیک می باشد و تنها با داشتن ۱۰ نوکلئوتید اختلاف در توالی ژن هورمون رشد، دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی در کلاستر هایی جدا قرار گرفتند (تصویر ۷۶) (مقایسه ذیل).



تصویر ۷۶- دندروگرام تاسماهی ایرانی و روسی بر اساس روش Neighbor-Joining

P ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60
 G ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGTCTCCCCTAAA 60

P GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120
 G GAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTTTCACAAACGCTGTGCTCAGA 120

P GCACAGTACCTACACCAGTTGCTGCAGACATTTACAAAGATTTCGAGCGTACCTATGTT 180
 G GCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGACATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTT 180
 ** *****

P CCAGATGAGCAACGTCCTCCAGCAAAAACCTCCCCGTCAGCATTCTGCTACTCTGAGACC 240
 G CCAGATGAGCAGCGTACTCCAGCAAAAACCTCCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACC 240

P ATCCCTGCTCCCCTGGCAAAGATGAGGCCCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300
 G ATCCCTGCGCCACCGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300

P TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTC 360
 G TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAGCCGTGTTTTC 360

P ACCAATAGCCTGGTGTTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420
 G ACCAATAGCCTGGTGTTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTTTGAGAAACTGAAAGATCTGGAG 420

P GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480
 G GAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTGGGGGAAGGCGTTTCGGAAGTTCTACTTTG 480

P CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540
 G CTGAAGCTCACTTATGATAAGTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAA 540

P AATTATGGGCTTTTAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600
 G AATTATGGGCTTTTAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600

P GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
 G GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645

مقایسه توالی چهار نمونه تاسماهی روسی به همراه توالی اسید آمینه آن

۱۱-۸-۴- مقایسه توالی ژن هورمون رشد تاسماهی روسی با توالی ژن هورمون رشد شناسایی

شده قبلی

بلاست ژن هورمون رشد نمونه تاسماهی روسی با ژن هورمون رشد تاسماهی روسی که توسط Yom Din و همکاران (۲۰۰۸) شناسایی شده نشان می دهد هر دو توالی با ۱۰۰٪ همولوژی کاملاً مشابه یکدیگر می باشند (شکل ۵). هر دو توالی از طول ۶۴۵ نوکلئوتیدی تشکیل شده و هیچ تفاوت نوکلئوتیدی ندارند.

A.gueldenstaedtii ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGT 50
A.gueldenstaedtiiYomDin
ATGGCATCAGGTCTGCTTCTGTGTCCAGTGCTGCTGGTTATATTGCTGGT 50

A.gueldenstaedtii CTCCCCTAAAGAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTT 100
A.gueldenstaedtiiYomDin
CTCCCCTAAAGAGTCTGGGGCCTACCCTATGATTCCACTATCCAGTCTTT 100

A.gueldenstaedtii TCACAAACGCTGTGCTCAGAGCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGAC
150
A.gueldenstaedtiiYomDin
TCACAAACGCTGTGCTCAGAGCTCAGTACCTACATCAGCTAGCTGCGGAC 150

A.gueldenstaedtii ATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTTCCAGATGAGCAGCGTCACTC
200
A.gueldenstaedtiiYomDin
ATTTACAAAGATTTTGAGCGTACCTATGTTCCAGATGAGCAGCGTCACTC 200

A.gueldenstaedtii CAGCAAAAACCTCCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACCATCCCTGCGC
250
A.gueldenstaedtiiYomDin
CAGCAAAAACCTCCCCGTCAGCATTCTGCTACTCCGAGACCATCCCTGCGC 250

A.gueldenstaedtii CCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG
300
A.gueldenstaedtiiYomDin
CCACCGGCAAAGATGAGGCTCAACAGCGATCAGACGTGGAGCTGCTTCAG 300

A.gueldenstaedtii TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAG 350
A.gueldenstaedtiiYomDin
TTTTCCCTGGCTCTCATCCAGTCCTGGATTAGTCCCCTGCAGTCCCTGAG 350

A.gueldenstaedtii CCGTGTTTTACCAATAGCCTGGTGTTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTTTTG
400
A.gueldenstaedtiiYomDin
CCGTGTTTTACCAATAGCCTGGTGTTTCAGCACCTCCGACCGAGTGTTTTG 400

A.gueldenstaedtii AGAAACTGAAAGATCTGGAGGAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTG
450
A.gueldenstaedtiiYomDin
AGAAACTGAAAGATCTGGAGGAAGGCATTGTGGCTCTCATGAGGGATCTG 450

A.gueldenstaedtii GGGGAAGGCGGTTTTCGGAAGTTCTACTTTGCTGAAGCTCACTTATGATAA
500
A.gueldenstaedtiiYomDin
GGGGAAGGCGGTTTTCGGAAGTTCTACTTTGCTGAAGCTCACTTATGATAA 500

A.gueldenstaedtii GTTTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAAAATTATGGGC
550

A.gueldenstaedtiiYomDin
GTTTGTGATGTCAACCTAAGAAACGATGATGCTTTGTTTAAAAATTATGGGC 550

A.gueldenstaedtii TTTTAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA
600

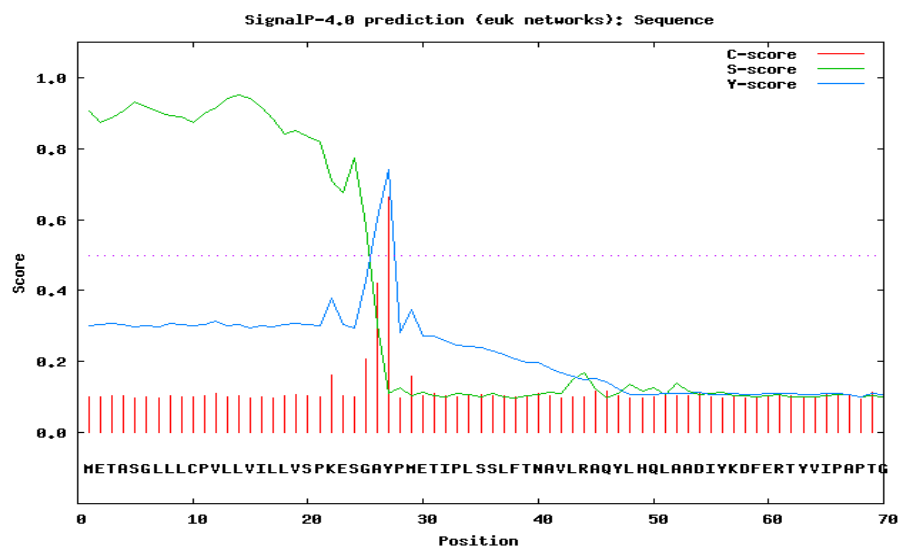
A.gueldenstaedtiiYomDin
TTTTAAGCTGTTTTAAGAAAGATATGCACAAAGTAGAGACGTACCTGAAA 600

A.gueldenstaedtii GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645
A.gueldenstaedtiiYomDin GTGATGAAATGCAGACGTTTTGTGGAGAGCAACTGTACTCTGTAG 645

مقایسه توالی ژن هورمون رشد تاسماهی روسی این تحقیق با ژن هورمون رشد تاسماهی روسی Yom Din و همکاران (۲۰۰۸).

۱۲-۸-۴- تعیین موقعیت سیگنال پپتید ژن رشد

سیگنال پپتید ها توالی های کوتاه هیدروفوب قطبی هستند که معمولا در ابتدای بسیاری از ژن های سنتز کننده هورمون رشد قرار دارند از این حیث می توانند به عنوان شاخص بسیار خوبی برای شناسایی ژن رشد به کار روند. با استفاده از نرم افزار SignalP 4.0 موقعیت سیگنال پپتید از ابتدای توالی تا اسید آمینه ۲۴ پیش بینی گردید. محل پایان سیگنال پپتید با خط تیره بر روی توالی مشخص شده است. همانگونه که در نمودار مشخص است جایگاه پایانی سیگنال پپتید توسط نرم افزار Signalp-4.0 بر اساس پیک نمودار مابین جایگاه ۲۳ و ۲۵ تعیین شده است (نمودار ۴ و جدول ۴۵). ۲۴ آمینواسید اول در ابتدای ژن رشد سیگنال پپتید می باشد که به صورت برجسته در جدول ۴۴ مشخص گردیده است. چهار اسید آمینه آخر از ۲۱۱ الی ۲۱۴ نیز جایگاه گلیکوزیلاسیون می باشد که در انتهای ژن هورمون رشد به صورت برجسته نشان داده شده است (جدول ۴۴).



نمودار ۴- تعیین موقعیت سیگنال پپتید در تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از نرم افزار Signalp-4.0

جدول ۴۴- توالی اسید آمینه ژن هورمون رشد در تاسماهی ایرانی و روسی

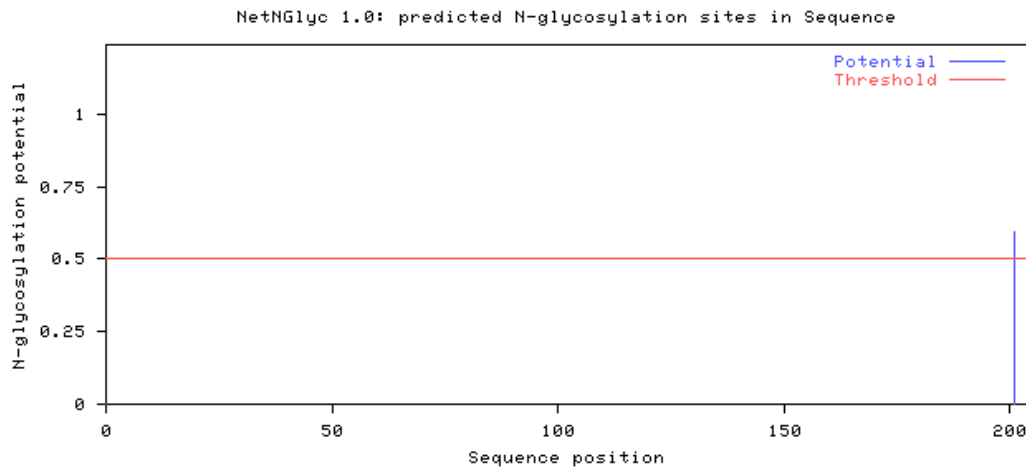
1 MASGLLLCPVL	11 LVILLVSPKE	21 SGA--YPMIPLS	31 SLFTNAVLRA
41 QYLHQLAADI	51 YKDFERTYVP	61 DEQRHSSKNS	71 PSAFCYSETI
81 PAPTGKDEAQ	91 QRSDVELLQF	101 SLALIQSWIS	111 PLQSLSRVFT
121 NSLVFSTSDR	131 VFEKLDLEE	141 GIVALMRDLG	151 EGGFGSSTLL
161 KLTYDKFDVN	171 LRNDDALFKN	181 YGLLSCFKKD	191 MHKVETYLKV
201 MKCRRFVES--N	211 CTL		

جدول ۴۵- اسامی آمینو اسید ها و حروف انحصاری آن

شماره	آمینو اسید	حرف انحصاری	شماره	آمینو اسید	حرف انحصاری
1	Alanine	A	11	Leucine	L
2	Arginine	R	12	Lysine	K
3	Asparagine	N	13	Methionine	M
4	Aspartic acid	D	14	Phenylalanine	F
5	Cysteine	C	15	Proline	P
6	Glutamic acid	E	16	Serine	S
7	Glutamine	Q	17	Threonine	T
8	Glycine	G	18	Tryptophan	W
9	Histidine	H	19	Tyrosine	Y
10	Isoleucine	I	20	Valine	V

۱۳-۸-۴- تعیین جایگاه گلیکولیزاسیون

گلیکوزیلاسیون به محل اتصال یک مولکول قند به اتم نیتروژن یک توالی آمینو اسیدی در یک پروتئین گفته می شود و جایگاه آن معمولا در انتهای ژن قرار دارد. این اتصال معمولا از نظر ساختاری و عملکردی بسیاری از پروتئین های یوکاریوتی مهم می باشد. فرایند گلیکوزیلاسیون در بسیاری از جانداران یوکاریوتی و برخی از باکتری ها صورت می گیرد. جایگاه گلیکوزیلاسیون با استفاده از نرم افزار NetNGlyc 1.0 شناسایی و در انتهای توالی اسید آمینه ژن رشد با خط تیره مشخص گردیده است. نرم افزار NG 1.0 چهار اسید آمینه N C T L را به عنوان جایگاه گلیکوزیلاسیون تاسماهی ایرانی و روسی در انتهای ژن هورمون رشد شناسایی نمود. همانطور که از روی نمودار مشخص است جایگاه گلیکوزیلاسیون در انتهای توالی و در محل برخورد دو خط افقی (توالی ژن رشد) و خط عمودی (محل قرار گیری جایگاه گلیکوزیلاسیون) شناسایی شده است (نمودار ۵).



نمودار ۵- شناسایی موقعیت گلیکوزیلاسیون با استفاده از نرم افزار NetNGlyc 1.0

۹-۴- نتایج روش پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism or SNP)

۹-۴-۱- توالی یابی

DNA تمامی نمونه‌ها در قالب ۵ جمعیت (۲ جمعیت خزر شمالی، دو جمعیت خزر جنوبی و دریای آزوف) با همدیگر ادغام، کدگذاری (barcode) و سپس توالی یابی شد. در مجموع ۹۷ میلیون قطعه ۱۰۰ جفت بازی (حدود ۲۰ گیگا جفت باز) ایجاد گردید و داده‌ها و توالی‌های آن بدست آمد. پس از فیلتر نمودن و کنترل کیفیت از ۹۷ میلیون رشته ۱۰۰ نوکلئوتیدی تعداد ۷۷ میلیون رشته برای آنالیز بیوانفورماتیک مناسب بودند که بشرح ذیل خلاصه می‌شود.

قرائت کل (جفت)	کنترل کیفیت اول	کنترل کیفیت دوم
۹۷/۲۹۰/۰۹۴	۸۴۵۵۳۵۴۴ (%۸۶/۹۱)	۷۷۴۲۲۰۷۰۶۰ (%۷۹/۵۸)

۹-۴-۲- خصوصیات SNP

قرائت توالی‌ها برای ۱۳ نمونه براساس علامت بارکد مورد استفاده قرار گرفت که حدوداً ۱/۳ الی ۱۵/۳ میلیون قرائت برای هر نمونه بود (جدول ۴۶). این توالی‌ها متعاقباً در تگ‌های RAD کلاستر شدند تا نشانگرهای SNP کاندید برای قرائت جلو (فوروارد) مشخص شود.

تقسیم بندی SNPها براساس ۴ طبقه و یا گروه ذیل انجام گرفت: SNP هائیکه بتواند:

- تفاوت بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی را نشان دهد.
- تفاوت بین تاسماهی روسی دریای خزر و دریای آزوف را نشان دهد.
- تفاوت درون گونه تاسماهی سبیری (رودخانه Ob و Lena) را نشان دهد.
- تفاوت بین نمونه‌های مختلف تاسماهی آدریاتیک (جدول ۴۶).

برای سه مورد اول (۱ تا ۳) SNP های متعدد بدست آمد که تفاوت و تمایز را بطور کامل بین دو گونه، یا جمعیت نشان می داد که می تواند بعنوان مارکر و نشانگر جهت کاربردهای آتی مورد استفاده قرار گیرد. حتی چند مارکر که تمایز بین افراد مختلف یک گونه را نشان می داد هم بدست آمد که برحسب معیار و شاخص های شدیدتری جداسازی شدند.

جدول ۴۶- تعداد قرائت برحسب نمونه و تعداد مارکر SNP کاندید برحسب کاربرد در این پروژه

نمونه ها	تکرار بار کد / تعداد خانواده	تعداد قرائت	مبنا تمایز یا موضوع تفکیک	تعداد SNP جداسازی شده
تاسماهی ایرانی خزر شمالی	۱	۱۹۹۶۵۶۹	تمایز گونه ای	۳۱
	۲	۷۷۵۵۶۷۵		
تاسماهی روسی خزر جنوبی تاسماهی روسی دریای آزوف	۱	۲۳۳۴۸۸۶	تمایز جمعیت	۲۸
	۲	۲۳۶۲۶۲۲		
	۱	۴۵۱۶۸۹۹		
	۲	۱۹۴۴۲۹۷		
تاسماهی سبیری رودخانه له نا تاسماهی سبیری رودخانه آب	۱	۱۲۹۹۰۵۱	تمایز جمعیت	۴۲
	۲	۱۴۹۹۷۶۱		
	۳	۷۱۸۹۱۲۴		
	۱	۵۸۰۰۵۷۷		
	۲	۴۱۱۹۵۶۵۱		
	۳	۲۹۲۸۷۲۴		

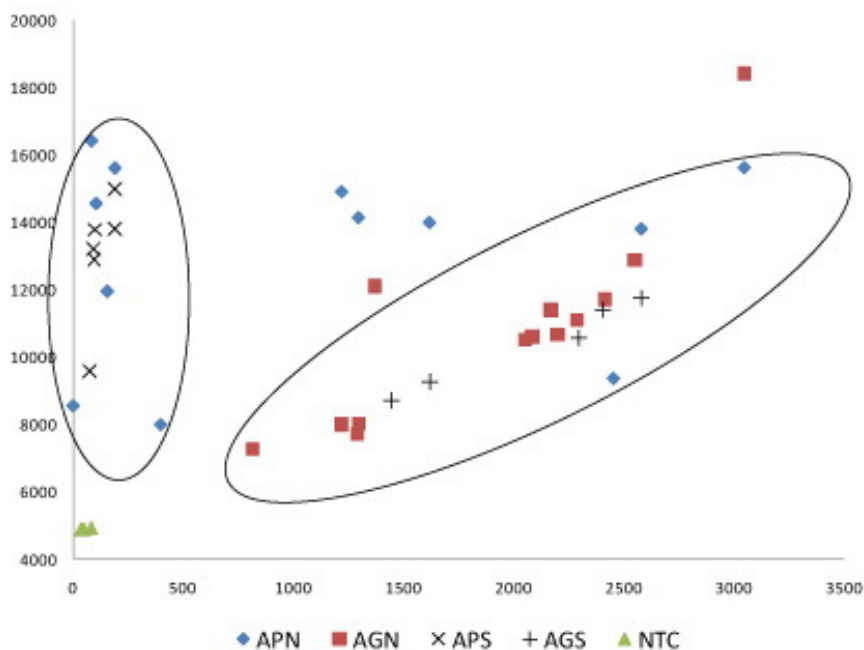
تعداد SNP ها بر مبنای و معیار فیلترهای انتخابی در طی دوره جداسازی SNP ها شناسایی گردیدند. با افزایش و یا کاهش محدوده یا دامنه، بویژه میزان تمایز نوکلئوتیدها این مقدار در داخل هر یک از نشانگرها تأثیرگذار بود و تعداد SNP های شناسایی شده متغیر بود. اما این ارتباط یک رابطه مستقیم نبود و نمی توان از آن برای اعتبار دادن یک SNP استفاده کرد.

۳-۹-۴- تهیه نقشه SNP و مقایسه داده های توالی های مرجع

جهت تهیه نقشه توالی تگ های RAD از طریق رجوع به توالی های DNA موجود که قبلاً با استفاده از توالی cDNA ۴۵۴ رفرنس تلاشی انجام گرفت و نتایج نشان داد که به میزان ۱/۲٪ از تگ های RAD نقشه برداری شدند و ۴۵۴ عدد توالی مورد شمارش قرار گرفت و ۱/۳٪ توالی شمارش شده با تگ RAD همخوانی داشتند.

۴-۹-۴- توسعه و کاربرد نتایج

وضعیت ژنوتیپی ۵ کاسپار مورد ارزیابی قرار گرفت برای این امر ترکیبی از نمونه‌ها مورد سنجش قرار گرفت که شامل نمونه‌های شاهد و آزمایشی خزر شمالی و نمونه‌های مورد بررسی خزر جنوبی برای دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی بود. نتیجه ارزیابی فوق بصورت نقاط پراکنده با نمونه‌هایی که بر روی محور X و Y نشان داده شده است که این نقاط فلورستی است که به دو ال SNP متصل هستند. نتایج ۵ نمونه با همدیگر مخلوط کرده که ۳ نمونه کارکرد ولی ۲ نمونه بعلت ضعف تبدیل مواد شیمیایی کاسپار بی نتیجه بود. از سه نمونه مثبت کار کرده فقط یک نمونه دسته یا خوشه بندی قوی برای دو گونه مورد بررسی را نشان داد (شکل ۶). دو مورد باقیمانده تمایز اندکی بین دو جمعیت نشان داد. در این مرحله نتایج ادغام نمونه‌ها چندان تعجب برانگیز نیست بلکه نشانگرهای کاندید، ژنوتیپ را نشان می دهند که منجر به معرفی SNP واقعی می گردد.



شکل ۶- نتایج ارزیابی ژنوتیپ کاسپار برای SNP به شماره ۵۳۷۷۸# بعنوان یک مارکر کاندید جهت تمایز تاسماهی روسی از تاسماهی ایرانی. APN = تاسماهی ایرانی خزر شمالی، AGN = تاسماهی روسی خزر شمالی، APS = تاسماهی ایرانی خزر جنوبی، AGS = تاسماهی روسی خزر جنوبی، NTC = شماره نمونه‌های شاهد. پراکنش نقاط ۲ خوشه بندی اصلی را نشان می دهد یکی فقط خوشه بندی مجزا و تفکیک شده تاسماهی ایرانی خزر شمالی و خزر جنوبی و دسته بندی عمدتاً تاسماهی روسی خزر شمالی و خزر جنوبی را نشان می دهد. حضور نمونه‌های تاسماهی ایرانی خزر شمالی در خوشه تاسماهی روسی ممکن است به این دلیل باشد که تفرق آن در این مارکر هنوز ناقص بوده و کامل نشده است و یا تناقضی که بین تمایز مورفولوژیکی و مولکولی وجود دارد.

۵- بحث و نتیجه گیری

۱-۵- سیتوکروم b، مایکروستلایت، AFLP، ND5، 16srDNA

روشهای گوناگونی برای استخراج DNA در ماهیان وجود دارد، از قبیل استفاده از کیت های استخراج DNA، فنل-کلروفرم، استات آمونیوم (Mc Quown et al., 2000)، CTAB (Grewe et al., 1994) و ... که هر یک از این روشها دارای مزایا و معایب خاص خود می باشند. (Pourkazemi, 1996) روش فنل-کلروفرم تغییر یافته از روش DNA (Hillis and Moritz., 1990) را برای ماهیان خاویاری تعدیل و مورد استفاده قرار داد. در این مطالعه به جهت بالا بودن کمیت و کیفیت DNA استخراجی به دو روش فنل کلروفرم و روش استات آمونیوم برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده برای تمامی آزمایشات مناسب بود و هیچ مشکلی برای آزمایشات PCR و یا توالی یابی ایجاد نکرد. در عین حال محققین دیگری نیز از روش های فوق برای استخراج DNA استفاده نمودند (Doukakis et al., 1999) و (Mugue et. al., 2008).

جدول ۴۷- روشهای مختلف استفاده شده در استخراج DNA

روش استخراج	گونه	Reference
فنل-کلروفرم	<i>Acipenser gueldenstatii, A. persicus, A. stellatus</i> <i>A. nudiventris, Huso huso</i>	Pourkazemi et. al., 1996
فنل-کلروفرم	<i>Acipenser baerii, Acipenser stellatus</i>	Doukakis et al. 1999
کیت	<i>Acipenser scaphirhynchus</i>	McQuown et al., 2000
کیت	<i>Acipenser, Huso and Scaphirhynchus sp.</i>	Ludwig et al., 2000
فنل-کلروفرم	<i>Acipenseridae</i>	Mugue et. al., 2008
فنل-کلروفرم	<i>Acipenseriformes</i>	Birstein et al., 1997
CTAB	<i>Lethrinus miniatus</i>	Herverden et. al., 2009
فنل-کلروفرم	<i>Cichlid fishes</i>	Mayer et al., 1998
فنل-کلروفرم	<i>Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser persicus</i>	خوش خلق، ۱۳۸۵

در چند سال اخیر روشهایی که در جهت شناسایی تاسماهیان و خاویار آنها انجام شده است همواره با نقایصی روبرو بوده اند. بعنوان مثال در روش نمایش میکروسکوپ الکترونی (SEM) که توسط Debus و همکاران در سال 2002 انجام شد، شناسایی گونه هایی که اووسیت مشابه داشتند به خاطر کدر شدن در فرآوری خاویار میسر نبود که بتوان با استفاده از ساختار میکروپیلی آنها را از همدیگر متمایز نمود. از این رو تلاشها بیشتر به سمت تکنیکها

و مارکرهای قابل اعتمادتر توسعه یافت، که شامل تکنیکهای سلولی و مولکولی بود. چرا که شناسایی و تشخیص گونه‌های تاسماهیان بر اساس اختلاف در ویژگی‌ها سلولی این گونه‌ها نظیر پروتئین و DNA بود. روشهای پروتئینی بدو روش صورت می‌گرفت: روش ایزو الکتريک فوکوسینگ (IEF) که توسط Keyvanfar و همکاران در سال 1988 انجام شد که این روش قدرت تمایز ضعیفی بین گونه‌ها را داشت و در رابطه با روشهای فرآوری و نمونه برداری خیلی ضعیف بود.

روش دیگر الکتروفورز پروتئین از نوع آنزیمی و غیر آنزیمی بود (Chen et al., 1996)، که نتایج بهتری را نسبت به IEF نشان داد هر چند به دلیل محدودیت مطالعات پروتئینی و نیاز به بافت تازه و زنده کارآمد نبود. بعلاوه به علت محدودیت‌های این روش بویژه بار الکتريکی اسیدهای آمینه (محدود) نمی‌توانست تمام تنوع ژنتیکی را آشکار سازد. تقریباً استفاده از DNA این مشکلات را برطرف نموده است. به دلیل نرخ پایین تکامل در بین تاسماهیان کاربرد آنها را در شناسایی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای را با مشکلاتی همراه کرده است (Krieger et al., 2000).

با این حال از روشهایی مانند کروماتوگرافی مایع-گاز که میزان ترکیب اسید چرب خاویار را اندازه‌گیری می‌کند برای تعیین پرورشی بودن یا وحشی بودن گونه ماهی استفاده گردید یا برای تعیین سن خاویار از روشهای میکروبیولوژی استفاده می‌شد (Wirth et al., 2002).

با بررسی شاخص‌های مجموعه‌شناسی جهت شناسایی تاسماهی ایرانی (A. persicus Borodin, 1897) از تاسماهی روسی (A. gueldenstaedtii Brandt, 1833)، از نظر مورفولوژی، عمده‌ترین تفاوت آنها در شکل پوزه و رنگ آمیزی ویژه آنهاست. (Vlasenko et al., 1989a,b) که این موارد تحت تاثیر رشد و محیط هستند. برخلاف روشهای قدیمی، مجموعه‌شناسی در سنین پایین هم‌قادر به شناسایی و تفکیک این دو گونه بود (2009). در این بررسی مشاهده شد که بر اساس یافته‌های مجموعه‌شناسی تاسماهی روسی به A. naccarii نزدیک‌تر است تا تاسماهی ایرانی. این نتایج با یافته‌های سنتی مورفولوژی مغایر بود ولی با داده‌های کاریولوژی و mtDNA مشابه بود. (Vasil'ev, 1985; Tagliavini et al., 1999; Birstein et al., 2000; Ludwig et al., 2001). با وجود روشهای جدید مورفولوژی هنوز داده‌های ژنتیکی برای بررسی روابط فیلوژنیک از قدرت بالاتری برخوردار هستند (Vasil'eva, 2009). شناسایی صحیح تاسماهیان که از نظر مورفولوژی مشابه هستند، نیاز به توسعه روشهای مورفولوژی و هماهنگی آنها با داده‌های ژنتیک ضروری است. در غیر این صورت داده‌های ژنتیکی ممکن است دچار اشتباهاتی یا مشکلاتی شود برای مثال بروز مشکلاتی که در بررسی گونه ۱۶ پلوئیدی (A. mikadoi (16-ploidy) (Birstein, 1993) یا وجود دو گونه هم‌نژاد (یا خواهری) تاسماهی روسی پیش آمده است (Birstein et al., 2000).

از سویی تا به حال مارک‌هایی که توانسته اند اختلاف‌های بهتری را در شناسایی گونه‌های تاسماهیان نشان دهند همگی از نوع DNA هسته بودند از قبیل ساتالایتها، میکروستالایتها، RAPD و AFLP (Carmona et al., 2009).

برای مطالعات تاکسونومی و تمایز درون و بین گونه‌ای بویژه در گونه‌های نزدیک به هم، به مارکری نیاز است که نرخ بالای تغییرات توالی را نشان دهد. که این موضوع در مورد تاسماهیان زیاد ساده نیست زیرا ژنوم آنها نرخ جهش کمتری نسبت به ژنوم دیگر مهره داران دارند (Krieger et al., 2000). ژنهای میتوکندری درجات مختلفی از تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای را نشان می‌دهند. از طرفی آنالیز توالی کل میتوکندری وقت گیر و پرهزینه است. بنابراین باید مناطق و یا ژنهایی انتخاب شود که تنوع درون و بین گونه‌ای را در سطح بالایی نشان دهد. در بین ژنوم مهره داران از سیتوکروم b برای تخمین اختلاف بین گونه‌ها و زیرگونه‌ها استفاده می‌شود (Avisé, 2000). در دومین کارگاه آموزشی "تشخیص تاسماهیان در بازار تجارت" که در برلین (۲۹ سپتامبر تا ۱ اکتبر ۲۰۰۶) برگزار شد تصمیم قاطع برای تشخیص گونه‌ها، خصوصاً گونه‌های نزدیک به هم، ژن سیتوکروم b بود (بر گرفته از Ludwig, 2008). Rastorguev و همکاران (2008) با توالی یابی کل ژنوم میتوکندری، براساس کارآمد بودن ژنهای میتوکندری در بازسازی فیلوژنی تاسماهیان آنها با به ۴ دسته تقسیم کردند: ۱- خیلی خوب (ND5-cyt b)، ۲- خوب (COI, ND4, ATP6)، ۳- متوسط (ATP8, COII, COIII, ND1, ND2, ND3, ND4L)، ۴- ضعیف (ND6). Rehbein و همکاران (2008) با مقایسه روشهای SSCP, RFLP و توالی یابی سیتوکروم b جهت تشخیص تاسماهیان در بازار، مشاهده کردند که این روشها نتایج تقریباً مشابه ارائه می‌دهند. با این تفاوت که توالی یابی سیتوکروم b از قدرت بالاتری نسبت به دو روش دیگر برخوردار بود. در این بررسی نیز از ژنهای میتوکندری، Cyt b انتخاب شد.

جدول ۴۸- مقایسه اختلاف ژنتیکی بدست آمده در تاس ماهی ایرانی و روسی

Reference	ژن	بین گونه‌ای
Birstein et al., 2002	Cytochrome b	٪۰/۳۱
Birstein et al., 2002	Control region	٪۰/۳۲
Birstein et al., 2002	12S rRNA	٪۰/۱۶
Birstein et al., 2002	16S rRNA	٪۰/۰۰
Birstein et al., 2002	NADH5	٪۰/۰۰
Pourkazemi et al., 2000	ND5	٪۲/۲

با مقایسه آرایش نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم b در تاسماهی ایرانی و روسی مشخص گردید که در یک جایگاه (نوکلئوتید شماره ۴۵۴) اختلاف بین گونه‌ای وجود دارد و در ۴ جایگاه دیگر تغیر درون گونه‌ای مشاهده شد

که در همگی از نوع جانشینی (transition) می باشد. در هیچ جایگاهی از ژن سیتوکروم b در این دو گونه تغییری از نوع indel مشاهده نشد. این اختلاف کم احتمالاً ناشی از فاصله ژنتیکی آنها است. چرا که با مقایسه توالی زیرگونه های *Acipenser oxyrhynchus* بدون هیچ گونه تغییر از نوع indel، تنها در سه جایگاه متفاوت مشاهده شد. در حالی که با مقایسه توالی ژن سیتوکروم b، *Acipenser sturio* و *Acipenser oxyrhynchus* میزان اختلاف نوکلئوتیدی آنها را ۳۱-۳۳ باز همراه با ۳ indel گزارش کردند (Birstein, et. al., 2000).

در مطالعه دیگری Ludwig و Kirschbaum (۱۹۹۸) با استفاده از ژن DNA ۱۲S، میزان تفاوت ژنتیکی را ۱/۸٪ محاسبه کردند و میزان ناچیز اختلاف تکاملی بین تاسماهی ایتالیایی و تاسماهی اروپایی (*A. sturio*) به دلیل وجود هیبرید بین این دو گونه دانستند. از طرفی اختلاف بین گونه آنها ۱/۱ - ۰/۵٪ تخمین زده شد. که نشان می داد اختلاف بین گونه ای تاسماهی ایرانی و روسی کمی بیشتر از اختلاف درون گونه ای آنهاست. Pourkazemi و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از ژن ND5 میتوکندری میزان تفاوت ژنتیکی بین تاسماهی ایرانی و روسی را ۲/۲٪ محاسبه کردند.

نتایج بررسیهای فیلوژنیک ژن سیتوکروم b با ۱۵ نمونه تاسماهی ایرانی و ۱۵ نمونه روسی نشان داد که این نمونه ها هیچکدام کلاستر جدا تشکیل نمی دهند اما از نظر حفظ شدگی این ژن بسیار حفظ شده می باشد بطوریکه نمونه *Acipenser baerii* که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته بود بسیار مشابه نمونه های ایرانی و روسی بود و کلاستر جدا تشکیل نداد. گرچه Krieger و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از ژن 18S rRNA به وجود تنوع درون گونه ای بین تاسماهیان پی بردند. ولی پیچیدگی زیادی در تنوع ژنتیکی درون گونه ای در بین تاسماهیان وجود دارد.

پایین بودن مقادیر Fst و Rst بیانگر میزان بالای جریان ژنی بین دو گونه و عدم مهاجرت در بین دو جمعیت است (Braginets et al., 2003)، این احتمال می رود که میزان کم Fst و Rst بدست آمده در این بررسی (۰/۰۶۲) و (۰/۰۲۳) ناشی از جریان ژنی بوجود آمده بین دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی است. چرا که Birstein و همکاران (2005) وجود اختلاط ژنومی بین این دو گونه را گزارش نمودند. میزان Fst محاسبه شده در این بررسی کمی کمتر از نتایج خوش خلق (۱۳۸۵) بود که احتمالاً ناشی از کاهش تعداد نمونه های بررسی شده باشد. با بررسی فاصله و شباهت ژنتیکی بر مبنای معیار فاصله ژنتیکی (Nei, 1972)، نتایج نشان داد که شباهت ژنتیکی کمی بیشتر از مطالعات قبلی (خوش خلق، ۱۳۸۵) می باشد. در این بررسی فاصله و شباهت ژنتیکی به ترتیب ۰/۲۶۷ و ۰/۷۶۶ محاسبه شد.

در جمع بندی این تحقیق می توان اعلام نمود که تنوع ژنتیکی درون و بین گونه ای بسیار بالایی با استفاده از روش میکروستلایت در گونه های تاسماهی ایرانی و روسی آشکار گردید و این امر تفکیک ژنتیکی دو گونه را بسیار دشوار ساخته و امکان دستیابی به مارکر مولکولی جهت تمایز دو گونه میسر نساخت.

در این تحقیق نتایج حاصله از مطالعات تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی به روش های ND5, 16sDNA, AFLP تفاوت معنی داری در جداسازی دو گونه نشان نداد. بعبارت دیگر نشانگری که بتوان با استفاده از آن دو گونه مورد بررسی را از همدیگر متمایز نمود یافت نگردید. علت آن میتواند بدلیل تنوع درون گونه ای بالا، محدود بودن میزان توالی های بدست آمده و یا قدرت و توانایی بالای روش های بکار گرفته شده در بروز تنوع ژنتیکی میباشد.

۲-۵- بحث RAPD

در سالیان اخیر روشهایی که برای شناسایی تاس ماهیان و نیز خاویار آنها انجام شده است همواره با کمبودها، موانع و مشکلاتی روبرو بود. بطور مثال استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای شناسایی انواع خاویار که توسط (Debus et al., 2002) انجام شد، شناسایی گونه هایی که اووسیت مشابه داشتند به خاطر کدر شدن در فرآوری خاویار امکان پذیر نبود که بتوان با استفاده از ساختار میکروپیلی، آنها را از همدیگر تشخیص داد و متمایز کرد. از این رو تلاشها بیشتر به سمت تکنیکها و مارکرهای قابل اعتمادتر توسعه یافت، که شامل تکنیکهای سلولی و مولکولی بود. روشهای پروتئینی به دو صورت انجام می شود: روش ایزو الکتريک فوکوسینگ (IEF) که توسط (Keyvanfar et al., 1998) انجام شد که این روش البته قدرت تمایز ضعیفی بین برخی گونه ها را ایجاد نمود و نیز در رابطه با روشهای فرآوری و نمونه برداری دارای کاستی بود.

روش دیگر الکتروفورز پروتئین از نوع آنزیمی و غیر آنزیمی بود (Chen et al., 1996)، که نتایج بهتری را نسبت به IEF نشان داد هر چند به دلیل محدودیت در مطالعات پروتئینی و نیاز به بافت تازه و زنده کارآمد نبود. بعلاوه به علت محدودیت های این روش بویژه بار الکتريکی اسیدهای آمینه، نمی توانست تمام تنوع ژنتیکی را آشکار سازد.

(Krieger et al., 2000) اظهار داشتند که به طور نسبی استفاده از DNA مشکلات ذکر شده را برطرف نموده است و البته به دلیل نرخ پایین تکامل در بین تاسماهیان کاربرد روش های پروتئینی را در شناسایی بین گونه ای و درون گونه ای را با مشکلاتی همراه کرده است. با این حال از روشهایی مانند کروماتوگرافی مایع-گاز که میزان ترکیب اسید چرب خاویار را اندازه گیری می کند برای تعیین منشاء آنها از لحاظ پرورشی یا وحشی بودن گونه ماهی استفاده گردید (Wirth et al., 2002).

(Vlasenko et al., 1989) با بررسی شاخص های مجمله شناسی، جهت تمایز تاسماهی ایرانی از تاسماهی روسی از نظر مورفولوژی، عمده ترین تفاوت آنها در شکل پوزه و رنگ آمیزی ویژه آنها دانست که این موارد تحت تاثیر رشد و محیط زندگی هستند.

برخلاف روشهای سنتی، مجموعه شناسی در سنین پایین هم قادر به شناسایی و تفکیک این دو گونه بود، در بررسی فوق مشاهده شد که بر اساس شاخص های مجموعه شناسی تاسماهی روسی به *A. naccarii* نزدیک تر است تا تاسماهی ایرانی. اما داده های بدست آمده تایید کننده تفکیک این دو گونه نبود. (Vasil'eva, 2009).

این نتایج با یافته های حاصل از روشهای سنتی مورفولوژی مغایر بود ولی با داده های کاریولوژی و mtDNA مشابه بود. (Vasil'ev., 1985) (Tagliavini et al., 1999; Birstein et al., 2000; Ludwig et al., 2001) با وجود روشهای جدید مورفولوژی هنوز دادهای ژنتیکی برای بررسی روابط خویشاوندی از قدرت بالاتری برخوردار هستند (Vasil'ev., 2009). شناسایی صحیح تاسماهیان که از نظر مورفولوژی مشابه هستند، نیاز به توسعه روشهای مورفولوژی و هماهنگی آنها با داده های ژنتیک ضروری است.

از سویی تا کنون مارکرهایی که توانسته اند تمایز بهتری را در شناسایی گونه های تاسماهیان نشان دهند همگی از نوع DNA هسته ای بودند از قبیل Microsatellite، RAPD و AFLP (Carmona et al., 2009). البته با این وجود از DNA میتوکندریایی در نواحی مختلف آن، برای شناسایی و درجه خویشاوندی در تحقیقات علمی به کرات مورد استفاده گردید که در این تحقیق به علت اهمیت مسئله به ذکر این منابع پرداخته شده است. علاوه بر روشهای مبتنی بر توالی ژنوم میتوکنندری و یا استفاده از روش PCR-RFLP ژنهای میتوکنندری تعدادی از محققین از روش RAPD استفاده نمودند.

(Liu and Cordes., 2004) در مقاله مروری خود در مورد روش RAPD بیان داشتند که می توان با استفاده از تکنیک PCR به مشخص نمودن بخش های ناشناخته DNA توسط جفت آغازگرهای ۸-۱۰bp پرداخت و از آنجا نیکه این آغازگرها توالی کوتاهی دارند و دمای پهلویگیری (Annealing) نسبتا پایینی دارد (۴۰-۳۶°C)، احتمال می رود که واکنش زنجیره پلیمرز محصول زیادی تولید نماید. هر محصول باند تولید شده (احتمالا) به نمایندگی از یک جایگاه لوکوسی متفاوت است. از آنجائیکه بیشتر مهره داران ژنوم آنها توالی یابی نشده، احتمال آن وجود دارد که تمام لوکوس ها به طور تصادفی انتخاب شوند. پلی مورفیسم های تولید شده نشانگر ملکولی RAPD می تواند به احتمال تعویض جانشینی پایه ای در آغازگر رخ دهد یا تغییراتی که بین مناطق مختلف ژنومی وجود دارد باعث ایجاد این پلی مورفیسم گردد. در واقع نشانگر ملکولی RAPD قدرت بالقوه نسبتا بالایی برای تشخیص پلی مورفیسم (تولید ۲۰-۵ باند) با استفاده از یک پرایمر را دارد و با استفاده از تعداد بیشتری از پرایمرهای نشانگر ملکولی RAPD می توان به ثبت قسمت عمده ای از ژنوم با استفاده از باندهای تولید شده رسید. ویژگی هایی که از طریق روش RAPD بررسی می شوند، به دلیل فراهم آوردن اطلاعات خاص جمعیت، برای مطالعات ژنتیکی مفید می باشد (هاشم زاده سقرلو، ۱۳۸۴).

جهش می تواند به عنوان وجود یک قطعه از DNA قلمداد شود. از این رو وجود یا عدم وجود یک توالی خاص را می توان به عنوان وضعیت شاخص یا آلل یک جایگاه ژنی قلمداد نمود، که می توان نقش یک نشانگر ژنتیکی را ایفا کند (هاشم زاده سقرلو، ۱۳۸۴). در روش RAPD جهت جداسازی و ایجاد نشانگرهای گونه های

جدید مورد بررسی، نیازی به داشتن آگاهی قبلی از نوع توالی نیست چرا که در این روش تنها از یک پرایمر منفرد به عنوان نقاط آغاز و خاتمه عمل مضاعف سازی استفاده می شود (هاشم زاده سقرلو، ۱۳۸۴). قطعات DNA تکثیر شده به وسیله نشانگر مولکولی RAPD به جهت کاربردشان در مطالعات جمعیتی، شناسایی گروه های پیوستگی، تهیه نقشه ژنوم و به عنوان منبع بالقوه ای از اثر انگشت ژنتیکی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در صورتی که مشکلات فنی مربوط به قابلیت تکرار دقیق نتایج برطرف شود و نحوه توارث آشکار و روشهای آماری تحلیل اطلاعات توسعه بیشتری یابد، نشانگر مولکولی RAPD به ابزار قوی و پرکاربردی برای محققین شیلاتی مبدل خواهد شد (هاشم زاده سقرلو، ۱۳۸۴).

(Rezvani, 1997) روش RAPD را روشی کارآمد و سریع در بین روشهای معرفی نمود و اعلام کرد که برای استفاده از این روش نیازی به صرفه هزینه های سنگین در مورد اطلاع پیدا کردن ژنوم موجود مورد نظر نیست و حتی وقت، و صرف هزینه های جانبی از قبیل طراحی پرایمر و... در این روش کمتر از روش های دیگر می باشد.

علاوه بر موارد فوق با آگاهی یافتن از تنوع ژنتیکی گونه ها و میزان شباهت بین جمعیت ها از طریق این تکنیک می توان گونه های بومی را از طریق مدیریت صحیح حفظ و به بازسازی ذخایر آنها کمک کرد. همچنین به تعیین نشانگرهای ژنتیکی می توان به آنالیز ساخت جمعیتی آبزیان، پرورش آنها، سیستماتک و طبقه بندی آنها پرداخت و همچنین اثرات صید، صیادی و آلودگی ها را نیز بر روی تنوع ژنتیکی آنها بدست آورد و اطلاعات زیادی را در مورد ژنتیک گونه های در حال انقراض یا کمیاب تهیه نمود (Rezvani, 1997).

(Comincini et al., 1998) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD باندهای پلی مورفیک را در ۶ گونه از ماهیان خاویاری (*Acipenser ruthenus*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser transmontanus*, *Acipenser (Huso huso)* *baerii*, *Acipenser naccarii*) را بررسی نمودند و بر طبق نتایج این محققین دو گونه (*Acipenser huso*) *gueldenstaedtii*, *Huso* را در یک کلاستر و چهار گونه دیگر در کلاستر جداگانه قرار گرفتند. نتایج فوق قدری با تقسیمات تاکسونومی گونه ها مغایرت دارد به همین دلیل این نتایج بر پایه داده های رده بندی موجود مشکل است.

(Iturra et al., 1998) مارکرهای مولکولی کروموزوم های جنسی را در ماهیان قزل آلای رنگین کمان با استفاده از روش RAPD مطالعه نمودند و موفق به شناسایی ۲ مارکر با باندهای پلی مورفیک در نرهای سویه Scottish Lassen شد.

(Garcia et al 1996) با استفاده از نشانگر RAPD توانستند مارکر ژنتیکی را برای یکی از جمعیت های میگوی وانامی (*Penaeus vannamei*) شناسایی نماید. سپس این محقق توانست با استفاده از کلون کردن و توالی یابی و نیز با استفاده از روش Microsatellite تنوع ژنتیکی بین جمعیت های این گونه را بدست آوردند.

(Van-Eenaam et al 1998) بروی مکانیسم تعیین جنسیت ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontanus*) با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD تحقیق نمود و توانست مارکر بین جنسهای نر و ماده را شناسایی نماید و از طریق روشهای سیتوژنتیک و Transmission نیز یافته های بیان شده را به اثبات برسانند.

(Rezvani et al., 1997) با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD، ۵ گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر شامل تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، فیل ماهی، شیپ و ازون برون را مورد بررسی قرار دادند و ۲۲ مکان ژنی متغیر در بین ۵ گونه یافت کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گونه تاس ماهی روسی شباهت خویشاوندی نزدیکی با تاس ماهی ایرانی داشت.

طبق بررسی های انجام شده در مطالعات با اهداف متفاوت با استفاده از روش نشانگر ملکولی RAPD، تعداد پرایمرهای استفاده شده بین ۳۰۰-۴ عدد بوده است و در این بررسی تعداد پرایمر استفاده شده ۱۰۱ عدد بود که جزء مطالعات با پرایمر تعداد زیاد به شمار می رود و نشان دهنده این است که از تعداد کافی و لازم آغازگر نشانگر ملکولی رپید برای تفکیک و تمایز بین گونه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و گونه تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) است.

نتایج بدست آمده در این تحقیق را با این سوال که آیا تاسماهی ایرانی بعنوان یک گونه مستقل از تاسماهی روسی را میتوان با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD مورد تحلیل و بررسی قرار داد؟

همانطور که ذکر گردید تعداد آغازگر RAPD مورد استفاده در این بررسی ۱۰۱ عدد بود و با توجه به نتایج بدست آمده می توان این آغازگرها را به ۳ دسته تقسیم بندی نمود که به شرح ذیل می باشد: (۱) تعداد ۵۳ آغازگر هیچگونه تکثیر و تولید محصول PCR نداشتند. عدم تولید و یا تکثیر ژن یا بخشی از ژنوم در واکنش PCR دو علت اساسی است، یا توالی توالی آغازگر هیچگونه ناحیه مکملی در DNA گونه هدف نداشته و در نتیجه نتوانست در جایگاه مناسبی پهلوگیری نماید و در نتیجه ژن تکثیر نشد (Welsh and Mc Clelland., 1990) و (Williams et al., 1990) یا آغازگر توالی مکمل را داشت ولی شرایط PCR چه از لحاظ دما، زمان یا از لحاظ تعداد سیکل و یا مواد و اجزا تشکیل دهنده PCR مناسب نبود. برای تنظیم دما در ابتدای تحقیق، برای بدست آوردن بهترین دمای اتصال که مسئله بسیار مهم در تکثیر محصول PCR می باشد مبادرت به استفاده از برنامه دامنه حرارتی از دمای ۴۰-۳۰ گردید که بهترین دمای بدست آمده ۳۱ درجه سانتیگراد بدست آمد و در مرحله بعد نیز هر کدام از آغازگرها در ۲ دمای اتصال دیگر ۳۳ و ۳۵ درجه سانتیگراد تکرار گردیدند و محصول PCR تولید نشد. همچنین بهترین زمان برای دو رشته ای کردن DNA (Denatration)، زمان مناسب برای پهلوگیری آغازگر به DNA تک رشته ای (Annealing) و زمان مناسب برای تکثیر (Extension) بدست آمد. برای بدست آوردن مناسب ترین غلظت مواد در واکنش PCR مبادت به انجام آزمون و خطا برای غلظت در تمامی مواد PCR گردید اما ۵۳ آغازگر مربوطه الگوی تولید باند و محصول PCR نداشتند (Sambrook et al., 1989). (۲) تعداد ۳۹ آغازگر از مجموع ۱۰۱ آغازگر محصول PCR تولید نمودند و الگوی تولید باند DNA بروی ژل پلی اکریل آمید بودند اما

باند‌های تولید شده به نحوی نبودند که در ۵ نمونه از یک گونه (تاس ماهی ایرانی و یا تاس ماهی روسی) وجود داشته باشد و در ۵ نمونه از گونه دیگر (تاس ماهی ایرانی و یا تاس ماهی روسی) تولید نشده باشد و بالعکس. این احتمال نیز وجود دارد که حتی با وجود تکثیر، آغازگر بروی تمام نقاطی از ژنوم که می‌توانسته است پهلو بگیرد و احتمالاً باند متمایز نیز تولید نماید پهلو گیری ننموده است و فقط هر یک از این آغازگرها تولید باند های مشابه در دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی نمودند که این احتمال به علت ماهیت این نشانگر ملکولی است که دارای تکثیر تصادفی است و در هر سری تکرار یک آغازگر می‌توان نتایج متفاوتی بدست آورد (Welsh and Mc Clelland., 1990) و (Williams et al., 1990) به همین علت اینگونه بیان گشت که حتی در آغازگری که در دو گونه تولید باند یکسان نمود. این احتمال نیز وجود دارد که در سری بعدی تکرار این آغازگر احتمال تولید باند های متمایز می‌باشد. همچنین در این ۳۹ آغازگر باند هایی تولید و تکثیر شدند که به طور مثال فقط در ۲ نمونه از ۵ نمونه یک گونه تولید شد و در گونه دیگر هیچ باند مشابهی تولید و تکثیر نگردید اما این ۲ نمونه نمی‌تواند به عنوان باند متمایز محسوب گردد اولاً این تمایز برای تمام نمونه ها صدق نمی‌کرد و فقط در تعدادی متفاوت بود به عبارت دیگر تمایز درون گونه ای بیش از تمایز بین گونه ای است و نمی‌توان به عنوان مارکر از آن استفاده نمود.

۳) ۹ آغازگر بودند که محصول PCR تولید نمودند و الگوی باند DNA متفاوت و متمایزی داشتند. اندازه DNA در گونه های مورد بررسی در محدوده های مختلف تولید گردید بطوریکه در گونه دیگر باندهای DNA فوق مشاهده نشد. برای اطمینان از صحت آزمایش بررسی ها، واکنش PCR بین ۱۵-۳ مرتبه تکرار گردید به عنوان نمونه آغازگر رپید شماره ۲۷، ۱۵ مرتبه تکرار شد و در هیچیک از دفعات تکرار نتیجه اولیه حاصل نگردید. علت این امر همانگونه که در بررسی های مختلف محققین گزارش گردید عدم تکرار پذیری بالای این نشانگر ملکولی می‌باشد (Liu., and Cordes., 2004) و (Welsh and Mc Clelland., 1990) و (Williams et al., 1990) نتایج این تحقیق مشابه با نتایج دیگران از لحاظ عدم تکرار پذیری بود.

از ۱۰۱ آغازگر تعداد ۹ آغازگر باند DNA پلی مورفیک و متمایز بین دو گونه تولید نمودند که پس از شناسایی باند های DNA متمایز، جداسازی باند، تکثیر مجدد، کلون کردن، کلونی PCR، استخراج پلاسمید، توالی یابی و پرایمر اختصاصی طراحی گردید. برای اطمینان از تمایز دو گونه، تعداد ۱۰۰ نمونه (۵۰ نمونه تاس ماهی ایرانی و ۵۰ نمونه تاس ماهی روسی) مجدداً PCR شد که پس از بهینه سازی PCR در ۵۰ نمونه گونه تاس ماهی روسی باند DNA در محدوده ۵۰۰ جفت باز را تولید نمود که در ۵۰ نمونه تاس ماهی ایرانی در جایگاه دیگری به اندازه ۱۰ الی ۲۰ جفت باز کمتر از این محدوده تولید کرد. یکی از مزایا و نتایج مثبت این تحقیق این است که محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شد. در ژل پلی اکریل آمید هر چه درصد اکریل آمید بالاتر باشد صحت نتایج با اطمینان بالاتری مشاهده می‌گردد که در این تحقیق نیز محصول PCR ۵ نمونه از ۵۰ نمونه هر دو گونه، بروی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ ران گردید تا احتمالاً اگر باندی که در تاس ماهی روسی

تولید گردیده و به عنوان تمایز محسوب شده است اگر با شدت کمتری در گونه تاس ماهی ایرانی تکثیر شده باشد و در ژل پلی اکریل آمید ۶٪ مشخص نگردیده در ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ خطای احتمالی مشخص گردد که با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ همان نتایج ژل پلی اکریل آمید ۶٪ بدست آمد، بدین صورت که باندی در محدوده ۵۰۰ جفت باز برای ۵ نمونه تاس ماهی روسی تولید گردید، در تاس ماهی ایرانی مشاهده نشد. با توجه به نتایج بدست آمده می توان اعلام نمود که مارکر ملکولی جهت تمایز دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی شناسایی شده که می توان از مارکر ملکولی فوق در جهت شناسایی خاویار تاس ماهی ایرانی A. persicus در بازار جهانی استفاده نمود.

۹ آغازگر که باندهای متمایز نشان دادند نیز دارای تعداد زیادی باندهای مونومورفیک و مشابه بودند که نشاندهنده شباهت بسیار بالای این دو گونه است. همچنین از بین ۹ آغازگر که باندهای متمایز نشان دادند، پس از انجام مراحل کلونینگ، توالی یابی و طراحی پرایمر از توالی های بدست آمده، تنها یک پرایمر طراحی شده توانست در تمامی ۵۰ نمونه از گونه تاس ماهی روسی تولید باند متمایز نماید که این نتیجه بدست آمده بازهم نشاندهنده شباهت بسیار بالا بین دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی است.

پیش از این نیز محققین دیگری (Borodin, 1897)، (Artyukhin, 1979)، (نصری چاری، ۱۳۷۲)، (Keyvanfar et al., 1988)، (Chen et al., 1996)، (Artyukhin, 2006) و (Vasil'eva, 2009) علی رغم اینکه از نظر مورفولوژیکی و ظاهری دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی تفکیک نمودند با استفاده از روشهای دیگر از قبیل تکنیکهای سلولی و ملکولی خصوصاً نشا نگرهای ملکولی ژنتیکی به دنبال اعلام تفکیک این دو گونه از یکدیگر بودند اما موفق به یافتن مارکر ملکولی تا به حال نشده اند و بسیاری از آنان عدم تفکیک دو گونه مذکور را اعلام داشته اند که در ادامه برخی از این نتایج محققین آورده شده است.

(Pourkazemi, 1996) در مطالعات فیلوژنی ۵ گونه تاس ماهی دریای خزر (*A. persicus*, *A. gueldenstaedtii*)، *H. huso*، *A. nudiventris*، *A. stelletus*) با کلون سازی و توالی یابی ژنهای ND5 و D-loop، میزان ۱۰۰٪ شباهت توالی را در D-loop مشاهده کردند. از طرفی با ترسیم درخت فیلوژنی UPGMA با استفاده از ژن ND5، مشاهده کردند که در بین ۵ گونه تاس ماهی دریای خزر، تاس ماهی ایرانی و روسی در یک کلاستر (bootstrap=۶۷) قرار می گیرند.

(Pourkazemi et al., 2000) با توالی یابی ژن ND5 نشان دادند که در مقایسه توالی DNA این دو گونه مشخص گردید که میزان ۲/۲ درصد تفاوت در ژن ND5 آنها وجود دارد. با توجه به مدت زمان لازم برای ایجاد یک موتاسیون (یا تغییر یک عدد باز آلی)، می توان اعلام نمود که دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی بیش از یک میلیون سال پیش از همدیگر انشقاق یافتند.

(Birstein et al., 2002) با بررسی بر روی ژن سیتوکروم b نشان دادند که تاس ماهی ایرانی همراه با تاس ماهی ایتالیایی (*A. naccarii*) در یک کلاستر قرار می گیرند (bootstrap=۱۰۰٪) و یا در پارسیمونی که Ludwig et al.,

(2001) با استفاده از ژن سیتوکروم b ارائه کردند، تاس ماهی روسی با تاس ماهی ایتالیایی در یک کلاستر قرار گرفتند (bootstrap= %۱۰۰) و تاس ماهی ایرانی جدا از این کلاستر قرار داشت.

(Doukakis et al., 2005) با بررسی ۳ ژن میتوکندری (Cyt b, NADH5, D-loop) تاسماهی روسی، دو دودمان میتوکندری مشاهده کردند که یک شاخه تاسماهی ایرانی و تاسماهی ایتالیایی را شامل می شد، در حالی که دیگر شاخه مربوط به تاسماهی سیبری *A.baerii* بود. بررسی مولکولی فوق نشان داد که شباهت مولکولی مطابق با شباهت مورفولوژیک بود، چرا که تاسماهی ایتالیایی و روسی را گونه های شبیه به هم می دانند.

(Birstein et al., 2005) اظهار کردند که جمعیت تاس ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* موجود در دریای خزر رابطه دودمانی نزدیکی با سه گونه تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، تاس ماهی آدریاتیک *Acipenser naccarii* تاس ماهی سیبری *Acipenser baerii* دارد و همچنین بیان داشتند که تاس ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* از نظر پروفایل mtDNA رابطه دودمانی ناشناخته ای با شبه تاس ماهی سیبری *Acipenser baerii* like دارد. همچنین این محققین با استفاده از شواهد مورفولوژیکال (مورفومریستیک و مریستیک) و آنالیز نتایج ژنتیکی بدست آمده از ناحیه کنترل (Control region) و ژن cyt b این دودمان ناشناخته را مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند که ۳ حالت ژنتیکی وجود دارد (۱) تاس ماهی روسی خالص *Acipenser guldenstaedtii* pure- (۲) شبه تاس ماهی سیبری *baeri like Russian sturgeon* (۳) حالت ژنتیکی نادر که پروفایل mtDNA آن خیلی شبیه به تاس ماهی آدریاتیک *Acipenser naccarii* است.

(Artyukhin, 2006) با بررسی ۲۸ صفت مورفولوژی و آنالیز پارسیمونی (Parsimony) مربوطه مشاهده کرد که تاس ماهی ایرانی در کلاستری جدا از تاس ماهی روسی قرار دارد (bootstrap= %۸۷). از طرفی بدلیل برخی اختلافات که این نتایج با پارسیمونی حاصل از داده های مولکولی داشت نتوانست این دو نتیجه بدست آمده را با هم تلفیق کند.

(Peng et al., 2007) با تعیین توالی ژنوم میتوکندری تاسماهیان و پاروپوزه ماهیان با استفاده از ژن سیتوکروم b درخت فیلوژنی ترسیم کردند که زمان انشقاق گونه ها در آن مشخص گردید. نتایج آنها حاکی از آن بود که اجداد تاسماهی ایرانی در حدود ۱۰/۸ میلیون سال پیش از اجداد تاسماهی روسی جدا شده اند، در حالی که تاسماهی ایتالیایی در ۵/۳ میلیون سال پیش از همتای روسی خود جدا گردید. در بررسی فوق تاس ماهی روسی را به تاس ماهی ایتالیایی نزدیک و نسبت به تاس ماهی ایرانی دورتر اعلام کردند.

(Rehbin et al., 2008) با استفاده از ۳ روش ژنتیکی RFLP, SSCP و توالی یابی منطقه cyt b اقدام به شناسایی خاویار گونه های *Huso huso*, *Acipenser stellatus*, *Acipenser baerii*, *Acipenser gueldenstadtii*, *Acipenser persicus* پرداختند و بیان داشتند که این ۳ روش نتایج مشابهی باهم ارائه کردند اگرچه برای تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* روش توالی یابی ژن cyt b قادر به شناسایی خاویار این گونه بود ولی روشهای RFLP, SSCP قادر به شناسایی خاویار تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* نبودند. همچنین بیان داشتند که نتایج توالی ژن cyt b را

می توان برای تشخیص گونه ای مورد استفاده قرار داد. در نهایت بیان گردید برای قطعیت و اطمینان، به تعداد نمونه های بیشتر و اطمینان از منشا جغرافیایی و زیستی نمونه ها می باشد.

(Ruban et al., 2008) با مقایسه نتایج دیگر محققین در زمینه داده های مورفولوژیکی خصوصا نتایج مورفولوژیکی (Berg, 1934) و همچنین نتایج ژنتیکی به دست آمده از دیگر محققین و با نتیجه گیری از داده های مورفولوژیکی و ژنتیکی به دست آمده و تفسیر بین این داده ها بیان داشتند که نتایج و داده هایی که مبنی بر حمایت از اعلام تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* به عنوان یک گونه مستقل از تاس ماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii* باشد وجود ندارد. البته لازم به ذکر است که این محقق فقط به ذکر منابعی پرداخته است که عدم تفکیک این دو گونه را بیان داشته اند و نیز نتایج محققین را به طور کامل بازگو نکرده اند و فقط قسمت هایی از نتایج که مبنی بر عدم تفکیک این دو گونه بوده است را بیان داشته و از ذکر نام محققانی که با بررسی های مورفولوژیکی و ژنتیکی احتمال تمایز این دو گونه را بیان داشته اند خودداری شده است (Borodin, 1897), (Artyukhin, 1979) (نصری چاری، ۱۳۷۲)، (Keyvanfar et al., 1988)، (Chen et al., 1996)، (Artyukhin, 2006) و (Vasil'eva, 2009) و (Rehbin et al., 2008).

(Ruban et al., 2011) با آنالیز ۲۸ شاخص مورفولوژیک با استفاده از داده های (Berg, 1934) و نیز آنالیز داده های ژنتیکی ناحیه D-loop و توالی ناحیه مجاور ژن tRNA (956bp) نتیجه گرفتند که تشابه بالائی بین نمونه های دو گونه تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) وجود دارد که نشان دهنده عدم وجود کلاسترهای جداگانه در این دو گونه است و با تفسیر نتایج مورفولوژیکی و ژنتیکی بیان داشتند که تاس ماهی ایرانی نمی تواند یک گونه مستقل با عنوان تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) معرفی گردد.

در جمع بندی نهایی در این تحقیق میتوان اعلام نمود که استفاده از روش RAPD بعنوان نشانگر ملکولی RAPD میتواند جهت شناسایی و تفکیک دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی از یکدیگر بکار گرفته شود. در این تحقیق با کلون و توالی یابی نشانگر ملکولی RAPD موفق به یافتن مارکر ملکولی تمایز دو گونه شده که بخوبی میتوان دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی را از یکدیگر تفکیک نمود و از این مارکر ملکولی می توان در جهت شناسایی خاویار تاسماهی ایرانی *A. persicus* در صادرات این محصول استفاده نمود. جهت اطمینان کامل یا باید بررسی های جامع تری انجام پذیرد تا نشانگر شاخص جداسازی گردد و یا از روشهای نوین مولکولی که در ذیل به آن اشارم میشود در تکمیل این تحقیق انجام پذیرد.

در عین حال در پاسخ به این سؤال که آیا مارکر ملکولی جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاس ماهی روسی وجود دارد؟ بله، طبق نتایج بدست آمده می توان اعلام نمود که مارکر ملکولی جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاس ماهی روسی وجود دارد و روش RAPD قادر به تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاس ماهی روسی می باشد.

۳-۵- بحث GH

ژن رشد به عنوان یک ژن ساختاری نقش مهمی را در رشد بسیاری از گونه های مهره دار ایفا می کند. این ژن در تولید مثل، رشد توده بدنی و سازگاری اسمزی در ماهیان یوری هالین نیز موثر است. ژن سنتز کننده هورمون رشد از تحول تدریجی در طی زمان و تکامل محفوظ مانده است و می تواند اطلاعات مفیدی در زمینه تغییرات پروتئینی و عملکرد هورمون رشد ارائه دهد (Yom Din et al., 2008). از این رو می توان بامطالعه توالی و ساختار ژن هورمون رشد اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکاملی مهره داران بدست آورد.

ژن هورمون رشد برای اولین بار در سال ۱۹۴۴ در انسان شناسائی و تخلیص شد (Li and Evans, 1944) و در سال ۱۹۷۷ این ژن در باکتری E.coli بیان و پروتئین نو ترکیب آن به دست آمد (Sanger et al, 1977). پس از آن در گونه های مختلف جانوری از جمله موش، خوک، گاو، گوسفند و ماهی این ژن کلون و شناسائی گردید (Zhu at al., 1992). اولین کلونینگ ژن آبزیان در سال ۱۹۸۸ مربوط به ژن هورمون رشد قزل آلای رنگین کمان بود که به طور کامل نواحی کد کننده و غیر کد کننده این ژن شناسائی شد پس از آن ژن هورمون رشد در ماهیان آزاد شناسائی گردید (Agellon et al., 1988). هم اکنون توالی این ژن حداقل در ۳۰ گونه از ماهیان دنیا شناسائی گردیده است که اکثرا مربوط به ماهیان کشورهای اروپائی و امریکا میباشد (جدول ۴۹).

جدول ۴۹- نام علمی، شماره دسترسی در NCBI و محققینی که ژن رشد گونه های ماهیان را تا کنون شناسایی نمودند.

ردیف	گونه	شماره دسترسی	منابع
1	<i>Onchorinchus masou</i>	X59762	Shoji et al, 1991
2	<i>Danio rerio</i>	AY286447	Falcon et al, 2003
3	<i>Cyprinus carpio</i>	M27000	Koren et al, 1989
4	<i>Spaurus aurata</i>	U01301	Martinez Barbera, 1993
5	<i>Tricogaster trichopterus</i>	AF157633	Doron et al, 1999
6	<i>Anguilla japonica</i>	M24066	Saito et al, 1988
7	<i>Anguilla anguilla</i>	AY148493	Goldberg et al, 2003
8	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	X60475	Chang et al, 1991
9	<i>Carassius aurata</i>	DQ350437	Chen et al, 2006
10	<i>Calta calta</i>	AY053361	Ravinder and Majumdar, 2001
11	<i>Clarias gariepinus</i>	AF416488	Nasaruddin and Majumdar, 2001
13	<i>Salmo salar</i>	M21573	Johansen et al, 1989
14	<i>Onchorinchus mykiss</i>	M24683	Rentier-Delrue et al, 1989
15	<i>Carassius cuvieri</i>	AF389237	Hao et al, 2001
16	<i>Heteropneustes fossilis</i>	AF147792	Anathy et al, 2001
17	<i>Paramisgurus dabryanus</i>	DQ350432	Chen et al, 2006
18	<i>Rattus norvegicus</i>	V01237	Seeburg et al, 1977
19	<i>Ovis aries</i>	S50877	Guron et al, 1992
20	<i>Sus scorfa</i>	NM213869	Nieves-Martinez et al, 2009
21	<i>Homo sapiens</i>	V00520	Adelman et al, 1981
22	<i>Silurus meridionalis</i>	AF530481	Ping et al, 2002
23	<i>Silurus asotus</i>	AY157496	Song, P, 2002
24	<i>Rhamdia quelen</i>	EF101341	Vaz et al, 2010
25	<i>Pimephales promelas</i>	AY643399	Filby and Tyler, 2007
26	<i>Cirrhinus mrigala</i>	AF140281	Thayanithy et al, 2001
27	<i>Gymnocypris przewalskii</i>	AY707317	Cao et al, 2009
28	<i>Ictiobus bubalus</i>	AY375301	Clements et al, 2003
29	<i>Labeo rohita</i>	AF416490	Rajesh and Majumdar, 2001
30	<i>Morulus calbasu</i>	AY691181	Rajesh and Majumdar, 2004

توالی ژن هورمون رشد در گونه های مختلف از طول متفاوتی برخوردار می باشد به عنوان مثال این ژن در انسان ۱۹۶۴ bp (Adelman et al, 1981)، گربه ماهی ۱۰۸۷ bp (Ping et al, 2002) و ماهی آزاد ۴۳۹۷ bp (Johansen et al, 1989) می باشد. در این بررسی مشخص گردید ژن رشد در تاس ماهی ایرانی و روسی با توالی ۶۴۵ bp یک ژن پیوسته فاقد نواحی اینترون در جایگاه خود بر روی DNA ژنومی می باشد. ژن رشد در تاس ماهی ایرانی و روسی از کدون آغاز تا کدون پایان به صورت پیوسته بوده و از نظر همولوژی ۱۰۰ درصد با توالی mRNA خود مطابقت دارد. اکثر ژن های یوکاریوتی توسط حداقل یک یا چند نواحی غیر کد شونده به صورت گسسته بر روی DNA ژنومی قرار می گیرند که به این نواحی غیر کد شونده اصطلاحاً اینترون می گویند.

ژن سنتز کننده هورمون رشد در ماهیان به دو گروه تقسیم میشود. گروه اول شامل راسته کپور ماهی شکلان و گربه ماهی شکلان است که ژن رشد آن ها از ۵ اگزون و ۴ اینترون تشکیل شده است. گروه دوم شامل راسته آزاد ماهی شکلان، سوف ماهی شکلان و راسته تترا اودنتیده ها است که ژن هورمون رشد آن ها از ۶ اگزون و ۵ اینترون تشکیل شده است. تفاوت بین تعداد اگزون و اینترون ها در این گونه های ماهیان می تواند به دلیل انشقاق این گونه ها از دوران بسیار قدیم طی دوره تکاملی آن ها باشد (Vaz et al, 2010). آنالیز توالی بدست آمده از هورمون رشد بیانگر این است که در بین نواحی اگزونی تاسماهی ایرانی و تاس ماهی روسی هیچ اینترونی وجود ندارد. این ژن ها را اصطلاحاً اینترونلس می نامند. بنابراین نمیتوان ژن رشد مربوط به تاس ماهی ایرانی و روسی را در درون دو گروه تقسیم شده قرار داد. ژن های فاقد اینترون یکی از ویژگی های جانداران پروکاریوت می باشد. پروکاریوت ها اغلب دارای DNA حلقوی و بدون اینترون در ساختار ژنوم خود هستند. این ویژگی به آن ها کمک می کند تا به سرعت بتوانند در درون بدن میزبان رشد و ژن های مورد نیاز خود را بیان نمایند. باکتری نمونه ای از پروکاریوت هاست که از این ویژگی به خوبی برای تکثیر و بیان ژن های خود استفاده می نماید. با توجه به این، مطالعات انجام شده بر روی ژن های فاقد اینترون در یوکاریوت ها بسیار اندک بوده و مربوط به یک دهه اخیر می باشد و اغلب مربوط پستانداران نظیر انسان و موش می باشد (Gatermann et al, 1989; Bhandari et al, 1991; Makeyev et al, 1999; Sugiyama et al, 1999). تا کنون نزدیک به ۹۰۱ ژن فاقد اینترون در انسان شناسایی شده است و بسیاری از محققین عقیده دارند که ژن های فاقد اینترون از پروکاریوت ها به ارث رسیده اند (Venter 2001).

یک ژن که توالی cDNA آن با یکدیگر کاملاً همسان است کاندیدای بسیار خوبی برای یک ژن اینترونلس می باشد و معمولاً ژن های پروکاریوتی خارجی را شامل می شود که در طی دوره تکامل درون ژنوم یوکاریوت ها جای گرفته اند (Bhandari et al, 1991). ژن های اینترونلس در یوکاریوت ها به دلیل ساختار پروکاریوتی اطلاعات مهمی در زمینه مطالعات تکاملی و ژنتیکی ارائه می دهند و مطالعه این ژن ها می تواند کمک زیادی به الگوهای تکاملی ژن ها ارائه دهد.

مطالعاتی که تا کنون بر روی ژن رشد انجام شده، همگی به وجود اینترون مابین نواحی کد شونده اشاره نمودند. از میان این مطالعات می توان به شناسایی توالی نوکلئوتیدی ژن رشد ماهی تیلا پیا (*Oreochromis nilotica*) توسط Ber و همکاران (1992) اشاره نمود. در این بررسی ژن هورمون رشد ماهی تیلا پیا از طریق تکنیک cDNA جداسازی و مشخص گردید طول ژن رشد ماهی تیلا پیا ۱۸۸۸ bp بود و همانند سایر آزاد ماهیان دارای ۶ اگزون و ۵ اینترون می باشد و با داشتن یک اینترون و اگزون بیشتر، همولوژی کمی با ژن رشد سایر پستانداران دارد. این بررسی نشان می دهد آغاز شکل گیری اینترون ۵ به دلیل کوتاه بودن توالی آن در ژن رشد ماهی تیلا پیا پس از انشعاب ماهیان و چهارپایان بوده است و ماهی تیلا پیا در مرحله میانی تکامل ژن رشد قرار دارد. ژن رشد ماهی تیلا پیا علی رغم داشتن یک اگزون و اینترون بیشتر نسبت به ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) دارای

توالی کوتاه تری نسبت به آن است. تمامی اینترون ها با دو نوکلئوتید GT شروع و در انتها با دو نوکلئوتید AG با پایان می رسیدند. نسخه اولیه ژن هورمون رشد در این ماهی علی رغم داشتن اینترون های طولانی، کوتاه تر از دیگر ژن های هورمون رشد شناخته شده سایر ماهیان است. نتایج بیانگر این است که ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی دارای کوتاه ترین توالی در مقایسه با توالی ژن هورمون رشد سایر مهره داران است که یک دلیل مهم آن می تواند قدمت طولانی این گونه ها و کمترین تغییر در ساختار ژن رشد طی دوران تکامل خود باشد.

در بررسی دیگری که توسط Moriyama و همکاران (۲۰۰۶) بر روی ژن هورمون رشد لامپری دریایی (*Petromyzon marinus*) انجام شد نشان داد که ژن رشد این ماهی ۱۳۶۰۴ bp طول داشته و طویل ترین ژن رشد شناخته شده در میان تمام مهره داران است. اطلاعات ژن هورمون رشد لامپری دریایی نشان می دهد این ژن شباهت زیادی به ژن رشد سایر پستانداران و پرندگان دارد و اگزون ۱، ۳ آمینو اسید اول سیگنال پپتید و اگزون ۲ ادامه سیگنال پپتید تا آمینو اسید ۳۴ را ترجمه می کند. اگزون های ۳ و ۴ به ترتیب ۴۲ و ۴۴ آمینو اسید و اگزون پنجم ۶۱ آمینو اسید به همراه ناحیه را ترجمه می نماید. همچنین با مطالعه قسمت های غیر کد شونده مشخص شد ژن رشد این ماهی دارای نواحی مایکروستلایت و میکروستلایت بر روی توالی خود می باشد.

این ژن در لامپری دریایی از ۵ اگزون و ۴ اینترون تشکیل شده است. همچنین بیان داشتند که هورمون رشد یک هورمون اجدادی در طی تکامل مولکولی هورمون های خانواده هیپوفیز می باشد و مکانیسم درون ریز آن در اولین مراحل تکامل مهره داران شکل گرفته است. ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با داشتن یک توالی پیوسته فاقد هر گونه اینترون در توالی خود بودند و مقایسه توالی mRNA به دست آمده برای ژن هورمون رشد این دو گونه با توالی ژنومی آن همولوژی ۱۰۰٪ را نشان دادند.

مطالعه دیگری توسط Male و همکاران (۱۹۹۲) به منظور شناسایی توالی کامل ژن کد کننده هورمون رشد در ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) از طریق کلونینگ ژنی انجام شد و مشخص گردید این ژن درای ۶۵۰۰ نوکلئوتید شامل ۳۹۰۰ نوکلئوتید در ناحیه اینترون و اگزونی و حدود ۲۰۰۰-۶۰۰ نوکلئوتید در نواحی کناری 5' - 3' می باشد. همچنین بیان نمودند این ژن از ۱۶ اگزون تشکیل شده و پلی پپتیدی با ۲۱۰ اسید آمینه را تولید می کند.

مطالعاتی که تا کنون بر روی ژن رشد تاس ماهیان صورت گرفته بسیار اندک بوده و تنها بر روی mRNA ژن رشد این ماهیان می باشد. تمامی بررسی هایی که تا کنون صورت گرفته است همگی حضور اینترون مابین نواحی کد شونده ژن رشد را اعلام داشتند اما هیچ مطالعه ای بر روی توالی DNA ژن هورمون رشد صورت نگرفته است.

از این میان نتایج مطالعه Cao و همکاران (۲۰۱۱) بر تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد ژن رشد این ماهی دارای توالی ۹۵۴ bp می باشد که ۱۶ bp در ناحیه 5' و ۲۹۶ bp در ناحیه 3' خود دارد و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را ترجمه می کند که با نتایج به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مطابقت دارد.

همچنین مطالعه Yasuda و همکاران (1992) روی ژن هورمون رشد تاس ماهی روسی نشان داد که این ژن دارای دو فرم GH1 و GH2 می باشد. همچنین بیان نمود هر دو فرم از ۱۹۰ اسید آمینه تشکیل شده اند و دارای دو باند دی سولفید در جایگاه های ۱۶۳-۵۲ و ۱۸۸-۱۸۰ می باشند.

نتایج بیانگر این است توالی ژن هورمون رشد به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی و روسی دارای طول بازی کاملاً برابری با توالی mRNA ژن رشد شناسایی شده برای همین گونه می باشد. شباهت % ۱۰۰ توالی mRNA با توالی ژنوم هورمون رشد ماهی ایرانی و روسی می تواند یک دلیل مهم برای اینترنلس بودن این ژن باشد.

مقایسه توالی ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با سایر جانداران

مقایسه توالی ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با ۲۲ گونه مهره دار نشان می دهد که ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی یک توالی حفظ شده بوده و بالاترین شباهت را از نظر توالی با پستانداران و سپس ماهیان استخوانی دارد. مقایسه توالی ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با ژن رشد ۲۲ گونه مهره دار نشان داد که این گونه بالاترین همولوژی را با ژن رشد پستانداران مثل انسان (% ۷۴)، موش صحرايي (% ۷۱)، گراز وحشی (% ۷۱) سپس با مارماهی شکلان (% ۶۳) و در انتها با ماهیان استخوانی نظیر کپور معمولی (% ۶۵)، ماهی لوچ (% ۵۹)، کپور ژاپنی (% ۶۱) دارد و کمترین شباهت ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با ژن هورمون ماهی سه خاره (% ۳۷) (*Trichogaster trichopterus*) ثبت شد.

جدول ۵۰- آنالیز توالی اسید آمینه ژن رشد در تاس ماهی ایرانی و روسی با سایر گونه ها

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	<i>A.persicus</i>	214	2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	100.0
1	<i>A.persicus</i>	214	3	<i>H.molitrix</i>	210	45.0
1	<i>A.persicus</i>	214	4	Sheep	217	64.0
1	<i>A.persicus</i>	214	5	<i>Anguilla</i>	209	63.0
1	<i>A.persicus</i>	214	6	<i>D.rerio</i>	156	44.0
1	<i>A.persicus</i>	214	7	<i>T.trichopterus</i>	204	37.0
1	<i>A.persicus</i>	214	8	<i>Silurus</i>	200	41.0
1	<i>A.persicus</i>	214	9	<i>R.quelen</i>	200	40.0
1	<i>A.persicus</i>	214	10	<i>P.promelas</i>	210	44.0
1	<i>A.persicus</i>	214	11	<i>H.sapiens</i>	217	48.0
1	<i>A.persicus</i>	214	12	<i>R.norvegicus</i>	216	65.0
1	<i>A.persicus</i>	214	13	<i>C.cuvieri</i>	210	46.0
1	<i>A.persicus</i>	214	14	<i>O.mykiss</i>	210	42.0
1	<i>A.persicus</i>	214	15	<i>S.salar</i>	210	42.0
1	<i>A.persicus</i>	214	16	<i>S.scorfa</i>	216	67.0
1	<i>A.persicus</i>	214	17	<i>S.meridionalis</i>	200	41.0
1	<i>A.persicus</i>	214	18	<i>C.gariepinus</i>	200	41.0
1	<i>A.persicus</i>	214	19	<i>P.dabryanus</i>	210	44.0
1	<i>A.persicus</i>	214	20	<i>H.fossilis</i>	200	40.0
1	<i>A.persicus</i>	214	21	<i>O.masou</i>	210	42.0
1	<i>A.persicus</i>	214	22	<i>S.aurata</i>	204	38.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	3	<i>H.molitrix</i>	210	45.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	4	Sheep	217	64.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	5	<i>Anguilla</i>	209	63.0

2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	6	<i>D.rerio</i>	156	44.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	7	<i>T.tricopterus</i>	204	37.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	8	<i>Silurus</i>	200	41.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	9	<i>R.quelen</i>	200	40.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	10	<i>P.promelas</i>	210	44.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	11	<i>H.sapiens</i>	217	48.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	12	<i>R.norvegicus</i>	216	65.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	13	<i>C.cuvieri</i>	210	46.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	14	<i>O.mykiss</i>	210	42.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	15	<i>S.salar</i>	210	42.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	16	<i>S.scorfa</i>	216	67.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	17	<i>S.meridionalis</i>	200	41.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	18	<i>C.gariepinus</i>	200	41.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	19	<i>P.dabryanus</i>	210	44.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	20	<i>H.fossilis</i>	200	40.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	21	<i>O.masou</i>	210	42.0
2	<i>A.gueldenstaedtii</i>	214	22	<i>S.aurata</i>	204	38.0

نتایج تحقیق Hongyan و همکاران (۲۰۰۹) بر روی توالی cDNA ژن رشد تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) به روش RT-PCR نشان داد ژن رشد در این ماهی ۶۴۵ bp طول داشته و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را کد گذاری می کند و مشخص نمودند سیگنال پپتید ژن رشد در تاس ماهی چینی از ۲۴ اسید آمینه تشکیل شده است. همچنین مقایسه توالی آمینو اسیدی این گونه با دیگر گونه های مهره دار را انجام داده و بیان داشتند که ژن رشد تاس ماهی روسی بیشترین همخوانی را با پستانداران (۷۰-۶۶٪) داشته، سپس مارماهی شکلان و دوزیستان (۶۱٪) و کمترین همخوانی (۳۹-۴۷٪) را با سایر ماهیان استخوانی دارد که با نتایج به دست آمده از ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی در این مطالعه مطابقت دارد. تاس ماهیان به دلیل ویژگی های منحصر به فرد خود مدل بسیار خوبی برای مطالعات تکاملی می باشند (Cao et al, 2011). به همین دلیل مطالعه ژن های حفظ شده نظیر ژن رشد در ماهیان خاویاری می تواند اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکامل این ماهی ارائه دهد. آنالیز فیلوژنی بیانگر این است که تاسماهی ایرانی و روسی گونه های بسیار قدیمی بوده و از نظر ساختاری به پستانداران نزدیکتر از سایر گونه های ماهی می باشند و شباهت بالای توالی پروتئین ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با دیگر گونه های پستاندار نشان می دهد که این ژن از یک ژن رشد اجدادی مشترک منشا می گیرد.

در این تحقیق برای نخستین بار توالی ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی و توالی پروتئین آن ها شناسایی شد. نتایج به دست آمده نشان داد ۲۴ اسید آمینه اول در ابتدای توالی ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی سیگنال پپتید می باشد و جایگاه پلی آدنیلایسیون ۴۹ بالاتر از کدون پایان در انتهای 3' توالی شناسایی شد. نتایج این بررسی نشان داد جایگاه پلی آدنیلایسیون تاس ماهی ایرانی و روسی مشابه با جایگاه پلی آدنیلایسیون گونه های آزاد ماهیان، AATAAA، می باشد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد سیگنال پپتید تاس ماهی ایرانی و روسی یک ناحیه هیدروفوب بوده و همولوژی زیادی با سیگنال پپتید ژن رشد دیگر ماهیان دارد. مطالعات مختلف نشان می دهد طول سیگنال پپتید در گونه های مختلف متفاوت می باشد به طوریکه *Sciara* و

همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه بر ژن هورمون رشد ماهی نقره ای پهلوی (*Odontesthes bonariensis*) سیگنال پپتید این ماهی را ۱۷ اسید آمینه گزارش نمودند و کوتاه تر از سیگنال پپتید آزاد ماهیان (۲۲ aa) و انسان (۲۶aa) می باشد. نتایج حاصل از مطالعه Marins و همکاران (۲۰۰۳) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره ای پهلوی (*Odontesthes argentinensis*) نشان داد ۱۷ اسید آمینه اول این ژن سیگنال پپتید و دارای دو جایگاه پلی آدنیلایسیون در انتهای 3' توالی پروتئین خود می باشد و بیان داشتند سیگنال پپتید این ماهی بر اساس نوع اسید آمینه تشکیل دهنده آن بسیار هیدروفوب و غیر قطبی است که مشابه نتایج به دست آمده برای سیگنال پپتید تاس ماهی ایرانی و روسی بود. بررسی دیگری توسط Peyush و همکاران (۲۰۰۰) بر ژن هورمون رشد ماهی فلاندر (*Verasper moseri*) نشان داد که این ماهی دارای سیگنال پپتیدی با ۱۷ اسید آمینه در ابتدا توالی و یک جایگاه پلی آدنیلایسیون در انتهای 5' توالی خود می باشد. نتایج مطالعه Ber and Daniel (۱۹۹۲) بر ماهی (*Tilapia nilotica*) نشان داد این ماهی دارای یک جایگاه پلی آدنیلایسیون AATAAA در انتهای 3' خود می باشد که مشابه با جایگاه پلی آدنیلایسیون در گونه های آزاد ماهیان بوده و با جایگاه پلی آدنیلایسیون کپور ATTAATA تفاوت دارد که مطابق با نتایج به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی و روسی می باشد.

بررسی توالی اسید آمینه ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی نشان داد این پروتئین دارای چهار اسید آمینه سیستئین در ساختار خود می باشد. نتایج حاصل از مطالعه Venugopal و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی ژن هورمون رشد سه کپور ماهی هندی رو هو (*Labeo rohita*)، مریگال (*Cirrhina mrigala*) و کاتلا (*Catla catla*) نشان داد که ماهیان فوق دارای ۴ اسید آمینه سیستئین در توالی خود می باشند که در شکل گیری دو باند دی سولفید مولکول هورمون رشد نقش دارد. همچنین مطالعه Sekine و همکاران (۱۹۸۵) در مقایسه توالی آمینو اسیدی ژن رشد ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*)، انسان (*Homo sapiens*) و موش (*Rattus norvegicus*) نشان داد که هر سه گونه دارای چهار اسید آمینه سیستئین در جایگاه های مشابه میباشند و بیان داشت که چهار اسید آمینه سیستئین در نگهداری فرم فعال ژن هورمون رشد نقش موثری دارد و همانند بسیاری از توالی های اسید آمینه ژن رشد پستانداران حفظ شده است. در مقابل نتایج تحقیق Chang و همکاران (۱۹۹۲) بر سه ماهی کپور سر گنده (*Hypophthalmichthys nobilis*)، کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) نشان داد که پروتئین ژن رشد این ماهیان دارای پنج اسید آمینه سیستئین در توالی خود می باشند. نتایج حاصل از مقایسه موقعیت چهار اسید آمینه سیستئین در ژن رشد تاس ماهی ایرانی با سایر گونه های مهره دار نشان می دهد که همگی در جایگاه های مشابهی بر روی توالی پروتئین قرار گرفته اند و به شدت حفظ شده اند. چهار اسید آمینه سیستئین دو باند دی سولفیدی را شکل میدهد که در ساختار مولکول پروتئین ژن رشد شرکت می کند و نقش بسیار مهمی در حفظ فعالیت های هورمون رشد ایفا می کند (Paladini et al, 1983). نتایج نشان می دهد از آنجاییکه موقعیت چهار اسید آمینه سیستئین بر روی توالی پروتئین ژن رشد تاس ماهی ایرانی کاملاً برابر با جایگاه قرار گیری چهار سیستئین در توالی ژن رشد پستانداران است می توان این

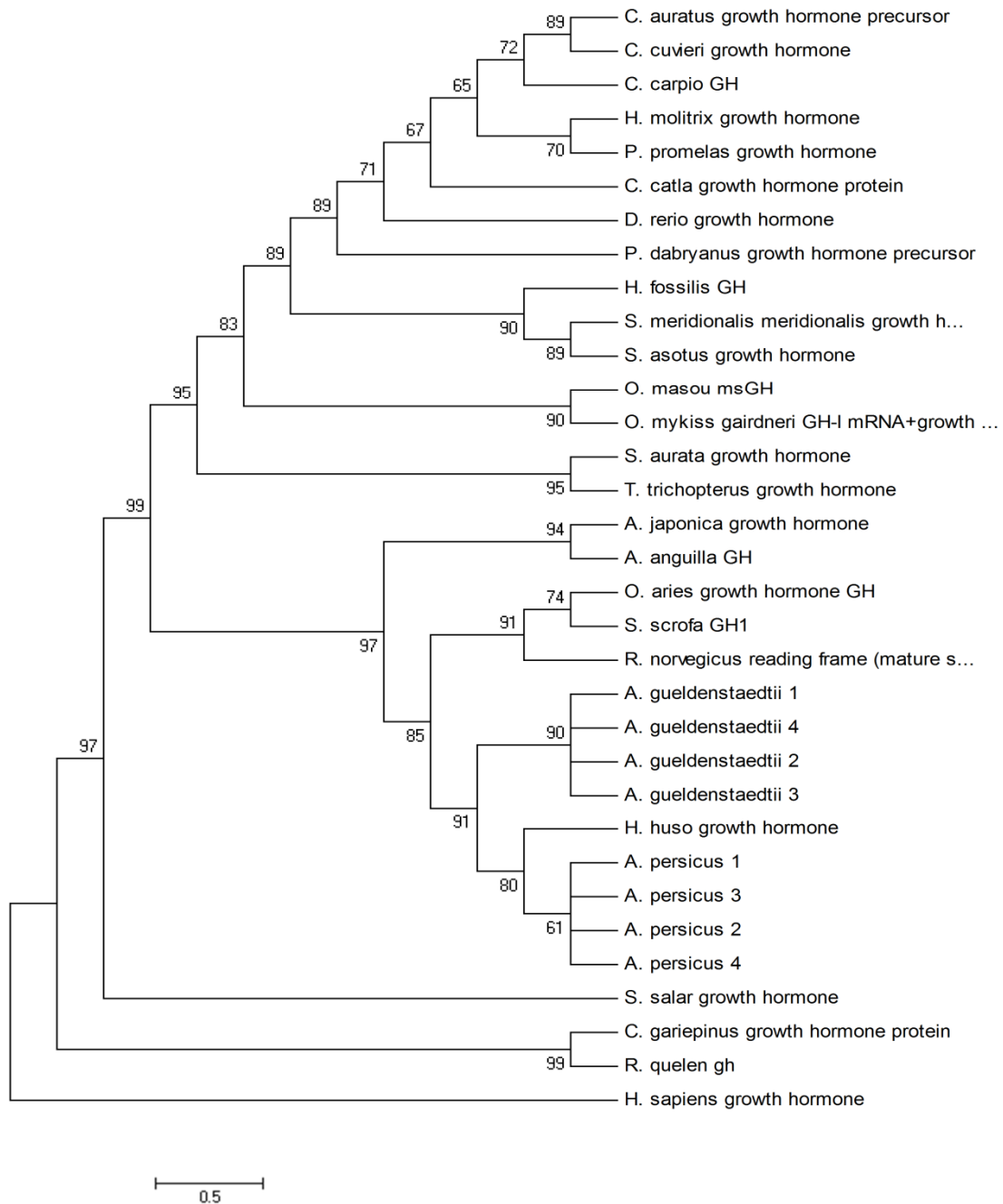
فرضیه را بیان داشت که باند های دی سولفید در تاس ماهی ایرانی همانند پستانداران نقش بیولوژیکی مشابهی را ایفا میکنند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت ۱۸۷ می باشد. بررسی Marins و همکاران (۲۰۰۳) بر ژن هورمون رشد ماهی نقره ای پهلو (*Odontesthes argentinensis*) نشان داد که این ماهی تنها دارای یک جایگاه گلیکوزیلاسیون در موقعیت Asn²⁰¹ می باشد. در مقابل نتایج مطالعه Pinheiro و همکاران (۲۰۰۸) بر ماهی آب شیرین پاکو (*Piaractus mesopotamicus*) نشان داد که ژن هورمون رشد این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون (Glyco¹²³ and Glyco¹⁷⁵) بر روی توالی پروتئین خود می باشد. همچنین Sekine و همکاران (۱۹۸۵) با بررسی ژن رشد ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) دریافتند که این ماهی دارای دو جایگاه گلیکوزیلاسیون (Asn-131 and Asn 185) می باشد و بیان داشتند این جایگاه یک ویژگی ساختاری برای ژن هورمون رشد ماهیان می باشد و در ژن رشد پستانداران مشاهده نمی شود. نتایج Rentier و همکاران (۱۹۸۹) نشان داد آخرین سیستمین در انتهای توالی پروتئین ژن رشد و همیشه در ساختار جایگاه گلیکوزیلاسیون شرکت دارد که مطابق با نتایج به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی و روسی می باشد.

Artyukhin (2006) با بررسی ۲۸ صفت مورفولوژیک و آنالیز پارسیمونی نشان داد که تاس ماهی ایرانی و روسی در کلاستر های جداگانه از هم قرار می گیرند اما این نتایج با نتایجی که از آنالیز های مولکولی به دست آمد تطبیق نداشت و تفاوتی ما بین تاس ماهی ایرانی و روسی مشاهده نکرد. همچنین مطالعات Ruban و همکاران (2011) با استفاده از ۲۸ شاخص مورفولوژیک و بررسی های مولکولی ناحیه D-loop و توالی ناحیه مجاور ژن tRNA مشخص نمودند که شباهت بسیار بالایی بین تاس ماهی ایرانی و روسی وجود دارد و تاس ماهی ایرانی نمی تواند به عنوان یک گونه مستقل معرفی گردد.

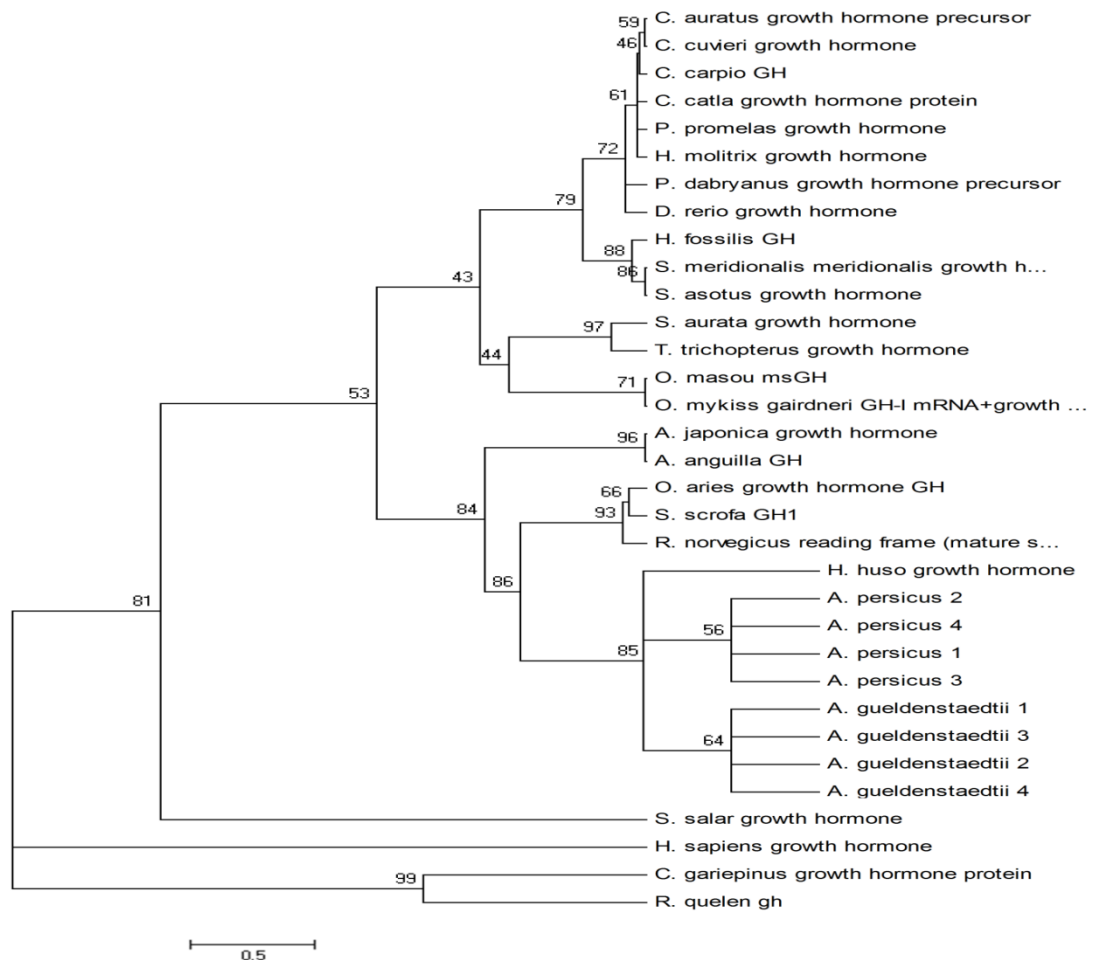
نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از دندروگرام UPGMA برای ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی به روش دو پارامتری کیمورا (Kimura2-parameter) نشان می دهد ۴ نمونه تاسماهی ایرانی با همدیگر و ۴ نمونه تاسماهی روسی با همدیگر در یک کلاستر قرار می گیرند که بیانگر تشابه کامل نمونه های درون گونه ای و تمایز نسبی بین گونه ای است (تصویر ۴-۱). در این روش گونه هایی که فقط با یک گره از هم جدا شدند به عنوان گونه مجاور یا نزدیک در نظر گرفته می شوند. در عین حال سه گونه تاسماهی ایرانی ، فیلماهی و تاسماهی روسی در یک کلاستر قرار گرفتند. در این دندروگرام اختلاف فاصله ای بین تاس ماهی ایرانی و روسی بسیار کم و نمونه های هر گونه در کلاستر هایی با فاصله یک گره قرار گرفتند. نکته مهم اینکه توالی ژن رشد فیل ماهی حد واسط تاس ماهی ایرانی و روسی قرار گرفته است (تصویر ۴-۱). نتایج این دندروگرام نشان می دهد اگرچه فاصله تکاملی بین نمونه های تاس ماهی ایرانی و روسی بسیار پایین و در حد صفر می باشد اما این دو گونه در دو کلاستر جدا قرار گرفته اند. با استفاده از طول شاخه ها می توان میزان خویشاوندی بین گونه

های مورد آزمایش را مشاهده نمود. در دندروگرام UPGMA نزدیکترین گونه به تاس ماهی ایرانی و روسی مارماهی مهاجر و مارماهی ژاپنی و سپس پستانداران نظیر گوسفند، انسان و موش صحرائی مشخص نمود. دورترین گونه ها از نظر خویشاوندی ماهیان استخوانی مثل ماهی سیم و سه خاره با فاصله ۰/۰۸۶۲ در کلاستر های جداگانه قرار گرفتند (تصویر ۷۷).



تصویر ۷۷- مقایسه فیلوژنی توالی ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی (هر یک با ۴ نمونه) با سایر گونه های استخوانی با استفاده از دندروگرام UPGMA و مدل Kimura-2Parameter.

نمودار فیلوژنی Neighbor-Joining نشان داد که ۴ نمونه تاس ماهی ایرانی در یک کلاستر و ۴ نمونه تاس ماهی روسی هم در یک کلاستر ولی مجزا از یکدیگر قرار گرفتند (تصویر ۲-۴). فیل ماهی گونه دیگری از ماهیان خاویاری بود که همراه با توالی های تاس ماهی ایرانی و روسی در یک کلاستر قرار گرفتند. گونه های مجاور آن ها هم کاملاً مشابه دندروگرام UPGMA بودند. در روش Neighbor-Joining نزدیک ترین گونه از نظر خویشاوندی به تاس ماهی ایرانی و روسی ابتدا فیل ماهی و سپس پستانداران مثل گراز، انسان، موش صحرائی و گوسفند ثبت شد. دورترین فاصله برای ماهیان استخوانی مثل ماهی کپور ژاپنی و ماهی سیم ثبت گردید (تصویر ۷۸). بنابراین می توان بیان نمود که بر اساس توالی ثبت شده از توالی ژن هورمون رشد گونه های مختلف، قرابت ژنتیکی گونه های خاویاری تشابه با پستانداران بیشتر از گونه های آبی می باشد.



تصویر ۷۸- مقایسه فیلوژنی تاس ماهی ایرانی و روسی و همچنین سایر گونه های استخوانی با استفاده از توالی ژن رشد با استفاده از دندروگرام Neighbor-Joining و مدل Kimura-2 Parameter. برای تاس ماهی ایرانی و روسی هر یک ۴ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفته است.

ژن هورمون رشد به دلیل طول کوتاه و توالی حفظ شده می تواند اطلاعات بسیار خوبی در زمینه منشا و زمان انشقاق دو گونه تاس ماهی ایرانی و روسی ارائه دهد. ژن رشد تاس ماهی ایرانی در ۱۰ نوکلئوتید با ژن رشد

تاسماهی روسی تفاوت دارد و با احتساب ۰.۵ میلیون سال برای جهش در هر نوکلئوتید می توان اعلام نمود که این دو گونه حدود ۵ میلیون سال پیش از همدیگر متمایز شدند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق برای تاس ماهی ایرانی و روسی می توان اعلام نمود ژن هورمون رشد در تاس ماهی ایرانی و روسی دارای توالی ۶۴۵ bp می باشد که فاقد اینترون است. گرچه شناسایی ژن هورمون رشد در دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی موفقیت بزرگی برای مطالعات بیوتکنولوژی می باشد ولی مارکر مولکولی برای شناسایی و تمایز دو گونه معرفی نشد. نتایج بیانگر این است که ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی علی رغم تفاوت در ۱۰ جایگاه نوکلئوتیدی، قادر به ارائه جایگاه برش متفاوت مابین دو گونه نیست.

در جمع بندی میتوان اعلام نمود که ژن هورمون رشد بعنوان یک مارکر ژنتیکی برای مطالعات مقایسه تکاملی گونه های مختلف ماهی به دلیل برخورداری از طول کافی، توالی های حفاظت شده و همچنین وجود حداقل تشابه ساختمانی به کار میرود (Chen et al., 2003; Pinheiro et al., 2008). آنالیز ساختاری اولیه پپتید ها و ژن هورمون رشد نشان می دهد که ژن این هورمون از نسخه اولیه اجدادی خود در طی زمان دچار تغییر شده است بنابراین این ژن یک مدل بسیار خوبی برای مطالعه روابط ساختاری - عملکردی، سیر تکامل و تنظیم بیان می باشد (Sekine et al., 1985). بعلاوه مطالعه روی ژن هورمون رشد می تواند اهمیت بنیادی و کاربردی داشته باشد (Kocour and Kohlman, 2011). ژن هورمون رشد در طی دوران تکامل به شدت حفظ شده و اطلاعات ارزشمندی برای ارزیابی آنالیز گونه های مهره دار ارائه می دهد (Chiou et al., 1990; Johansen et al., 1989; Agellon et al., 1988).

بررسی Oakley and Philips (1999) بر نواحی اینترونی ژن هورمون رشد آزاد ماهیان مشخص نمود ماهی آزاد اقیانوس آرام شامل جنس *Onchorhynchus* و ماهی آزاد اطلس شامل جنس *Salmon*، جنس های خواهری نزدیک به هم نیستند. همچنین بیان نمودند مطالعات گذشته بر روی ماهیان آزاد این دو جنس نشان از شباهت های مورفولوژیک و نزدیکی این دو جنس با یکدیگر داشت ولی مقایسه مولکولی این دو جنس بر پایه ژن رشد این فرضیه را رد نمود. نتایج حاصل از این تحقیق به خوبی نشان می دهد که از ژن هورمون رشد می توان برای مقایسه فیلوژنی گونه های نزدیک به هم استفاده کرد.

در این بررسی نتایج بیانگر این است که ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی از کدون آغاز تا کدون پایان در ناحیه اگزونی خود دارای توالی ۶۴۵ bp می باشند و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را ترجمه می کنند. اطلاعات در زمینه مکانیسم های مولکولی رشد و تولید مثل تاس ماهیان اندک است اما مشخص است که هورمون رشد فاکتور مهمی در کنترل این فرایندها می باشند (Cao and Zhou, 2011). در زمینه ژن هورمون رشد تاس ماهیان اطلاعات بسیار کمی وجود دارد و تاکنون مطالعه ای بر روی توالی DNA ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی صورت نگرفته است.

از این میان نتایج مطالعه Cao و همکاران (2011) بر تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد که ژن رشد این ماهی دارای توالی ۹۵۴ bp می باشد که ۱۶ bp در ناحیه 5' و ۲۹۶ bp در ناحیه 3' خود دارد و پروتئینی با ۲۱۴ اسید آمینه را ترجمه می کند که مشابه با پروتئین به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی و روسی است. در تحقیق مشابهی مطالعه Hongyan و همکاران (۲۰۰۹) بر ژن هورمون رشد تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نشان داد که این ژن دارای توالی ۶۴۵ bp بوده و پروتئین آن از ۲۱۴ اسید آمینه تشکیل شده است همچنین با مقایسه پروتئین ژن رشد با پروتئین ژن رشد سایر گونه های مهره دار بیان نمودند ژن هورمون رشد تاس ماهی چینی بیشترین همولوژی را با پستانداران و کمترین شباهت از نظر توالی را با ماهیان استخوانی حقیقی دارد که مشابه نتایج به دست آمده برای تاس ماهی ایرانی است. در بررسی دیگری که توسط Yom Din و همکاران (2008) بر ژن هورمون رشد تاس ماهی روسی صورت گرفت نشان داد که توالی نوکلئوتیدی این ژن در تاس ماهی روسی ۹۸۰ bp طول داشته و با کدون آغاز در جایگاه ۳۹ شروع شده و در جایگاه ۶۸۳ متوقف می شود. سپس برای بررسی عملکرد این ژن، میزان بیان آن ها را در تاس ماهیان روسی جوان نر و ماده ارزیابی و اثبات نمودند تفاوت معنی داری بین تاس ماهیان نر و ماده برای بیان ژن رشد تا سن پنج سالگی وجود ندارد. همچنین مقایسه توالی آمینو اسیدی این گونه با دیگر گونه های مهره دار را انجام داده و بیان داشتند که ژن رشد تاس ماهی روسی بیشترین همخوانی را با پستانداران (۷۰-۶۶٪) داشته، سپس مارماهی شکلان و دوزیستان (۶۱٪) و کمترین همخوانی (۳۹-۴۷٪) را با سایر ماهیان استخوانی دارد که با نتایج به دست آمده از ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی در این مطالعه مطابقت دارد.

مقایسه توالی ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی نشان می دهد در حد فاصل توالی باز های ۱ تا ۱۲۰ و ۳۰۰ تا ۶۴۵ با ۱۰۰٪ همولوژی میان دو گونه کاملاً حفظ شده (Conserve) بوده و نواحی بین باز ۱۲۰ تا ۳۰۰ با داشتن ۱۰٪ باز متفاوت بعنوان منطقه High Variable دیده می شود. بنابراین می توان از منطقه High Variable جهت مطالعات جمعیت شناسی به خوبی استفاده نمود. تاس ماهیان به دلیل ویژگی های منحصر به فرد خود مدل بسیار خوبی برای مطالعات تکاملی می باشند (Cao and Zhou, 2011). به همین دلیل مطالعه ژن های حفظ شده نظیر ژن رشد در ماهیان خاویاری می تواند اطلاعات مفیدی در زمینه روند تکامل این ماهی ارائه دهد. آنالیز فیلوژنی بیانگر این است که تاسماهی ایرانی و روسی گونه های بسیار قدیمی بوده و از نظر ساختاری به پستانداران نزدیکتر از سایر گونه های ماهی می باشند و شباهت بالای توالی ژن رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با دیگر گونه های پستاندار نشان می دهد که این ژن از یک ژن رشد اجدادی مشترک منشا می گیرد.

آنالیز توالی DNA نشان می دهد که ژن هورمون رشد از یک ژن اجدادی مشترک منشا شده است. ژن هورمون رشد از نظر ساختاری و عملکرد شباهت زیادی به مهره داران دارد اما اطلاعات بسیار کمی در زمینه ماهیان استخوانی منتشر شده است. اهمیت هورمون رشد بعنوان پتانسیل پایه رشد و تسریع کننده سرعت رشد در تعدادی

از جانوران و بخصوص در ماهیان مشخص شده است. از این رو شناسائی و تخلیص ژن هورمون رشد در چند دهه اخیر یکی از موضوعات مهم تحقیقات در دنیا می باشد.

در پاسخ به این سؤال که آیا با استفاده از ژن هورمون رشد، می توان جایگاه فیلوژنی تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی را تعیین کرد؟ پاسخ آن آری است زیرا که در این تحقیق جایگاه فیلوژنی تاس ماهی ایرانی و روسی با استفاده از ژن هورمون رشد تعیین شد که با فیلماهی هر سه در یک کلاستر قرار گرفتند. ولی ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی بعلاوه همولوژی و قرابت ژنتیکی بالا و همچنین بعلاوه داشتن کوتاه ترین توالی ژن رشد شناسایی شده میان مهره داران نمیتواند به عنوان یک مارکر برای تفکیک دو گونه به کار رود. تعداد اگزون ها و اینترون های ژن رشد در دو گونه تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی مشابه ماهیان استخوانی نبوده زیرا ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی با داشتن یک اگزون پیوسته شباهت بسیار کمی با ژن رشد سایر ماهیان استخوانی که توالی آن به ثبت رسیده است، دارد.

۴-۵- بحث SNP

از نقطه نظر روش کار و متدولوژی کشف و شناسایی SNP که مراحل اولیه تکاملی خود را طی می کند این دستاورد یک موفقیت ارزشمند محسوب می شود که با تشکیل بانک و کتابخانه RAD و بدنبال آن توالی یابی DNA از افراد و جمعیت های مختلف که توالی بسیار زیادی شناسایی گردید و بینهایت می تواند مورد استفاده قرار گیرد. طبق بررسی های انجام شده این اولین گزارش و تحقیق بکارگیری روش RAD بر روی ماهیان خاویاری بوده و مزیت دیگر اینکه اطلاعات ژنومی ارزشمندی برای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بدست آمد که توالی آن اکنون موجود است و می تواند در بررسی و تحقیق های آتی مورد استفاده قرار گیرد.

یکی دیگر از مشکلات بکارگیری این روش انجام آزمایشات بر روی نمونه هایی بود که اساساً تتراپلوئید بودند که عملاً بعنوان یک ریسک بزرگ برای پروژه محسوب می شد زیرا بطور کلی نرم افزارهای طراحی شده برای انجام آنالیزهای ژنتیکی با استفاده از روش RAD بر روی گونه های دیپلوئید که ۲ اللی هستند طراحی شده بعبارت دیگر دید تفرق الیها بصورت حداکثر ۲ تایی است و بر همین اساس الیها و ژنوتیپ ها در سیستم مورد شناسایی قرار می گرفت. بعضاً در سیستم فیلترینگ دستگاه توالی یابی بعنوان خط تلفی می شود. لذا در مرحله آنالیز داده ها با استفاده از داده های SNP یک برنامه آنالیز بیوانفورماتیک اختصاصی "SturSNIP" اختصاصاً برای ماهیان خاویاری (تتراپلوئید) طراحی و تدوین شد که این بخش بعنوان یکی از قسمتهای بسیار جدی این تحقیق محسوب می شد.

علاوه بر معضل پلی پلوئیدی بودن گونه های مورد بررسی، بطور بسیار جدی مشخص گردید که آنالیز داده های حاصل از توالی RAD ممکن است برای تکثیر به روش PCR بسیار حساس باشد. بطوریکه در مرحله آخر تشکیل بانک یا کتابخانه ژنومی، جایی که DNA بارکد بطور انتخابی کپی می شوند می تواند یک تمایل (bias) در مرحله

نهایی توالی داده‌ها داشته باشد که می‌تواند بر روی فراوانی داده‌های توالی و یا میزان مشاهده شده آن اثر بگذارد و در نهایت بر روند اعتباری SNPها اثر بگذارد. بنظر می‌رسد که تعداد SNPهای کاندید را که بعنوان مارکر در پروژه شناسایی شده بودند کاهش دهد.

علیرغم مشکلات و دشواریهای موجود در جداسازی SNP از گونه‌های تتراپلوئید و همچنین آنالیز بیوانفورماتیک آنها، خوشبختانه نشانگرهای SNP جداسازی شده تمایز و تفاوت کاملاً روشنی بین دو گونه تاسماهی روسی و ایرانی و همچنین جمعیت تاسماهی روسی در دریای خزر و آزوف و حتی جمعیت تاسماهی سیبری (رودخانه‌های آب و له نا) نشان داد.

اعتبار اولیه نشانگرهای SNP، صحت ژنوتیپ‌های کاندید SNP در یک مرحله را با استفاده از شیمی ژنوتیپ کاسپار در حضور SNPهای واقعی در نمونه‌های مورد بررسی بر مبنای منشاء جمعیت‌ها نمایان ساخت. عدم امکان تبدیل دو SNP کاندید در Kaspar assay ممکن است بدلیل شیمی مواد و یا بدلیل SNP غلط و اشتباهی باشد. جهت تشخیص این امر، ضرورت دارد تا لوکوس SNP کاندید مجدداً توالی‌یابی تا نوکلئوتیدهای آن مورد بررسی قرار گیرد. احتمال می‌رود در آینده از توالی نوکلئوتیدهای موجود جهت اعتبار و شناسایی مارکرهای کاندید قبل از ژنوتایپینگ آن استفاده شود.

مناسبتین مارکر SNP در این تحقیق، SNP به شماره ۵۳۷۷۸# بود که علامت مشخصی برای تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی نشان داد که یکی از مهمترین اهداف این پروژه بود.

این نشانگر می‌تواند گام اول و مهمی جهت ابداع و توسعه مارکر مولکولی برای تمایز گونه‌ای باشد. در این تحقیق ۱۴/۴ میلیارد نوکلئوتید از ۴ گونه از ماهیان خاویاری (تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، تاسماهی سیبری، تاسماهی آدریاتیک) تعیین توالی گردید. این توالی می‌تواند برای مطالعات آتی در زمینه‌های تاکسونومی، ساختار جمعیت، اکولوژی، مدیریت و حفاظت ذخایر و ردیابی محصولات تولیدی از تاسماهیان مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج و دستاوردهای این تحقیق و با عنایت به کاربردن بودن آن دستاوردهای آن، می‌توان در آینده پروژه‌های متعددی در راستای حداکثر استفاده از مجموعه داده‌ها و توالی‌های بدست آمده به روش RAD اجرا نمود.

یکی از محدودیت‌های اصلی برای استفاده از داده‌های موجود، محدودیت در اتصالاتی توالی‌ها به نحوی که تگ‌های صحیحی همانند آنچه که در ابتدا در ژنوم گونه قبل از قطع آنزیمی بودند می‌باشد، که هم از نظر تکنیکی و هم از لحاظ عملی بسیار دشوار است ولی در صورت دستیابی به حجم بیشتری از توالی دو گونه‌های رفرنس این امر امکان‌پذیر می‌گردد. هرچه توالی‌های بیشتری از ژنوم گونه‌های مورد بررسی به روش RAD بدست آید، ابهام نحوه و محل اتصال توالی‌های بدست آمده در قالب RAD tag کمتر خواهد شد و می‌توان نشانگرهای SNP تک لوکوسی شناسایی و معرفی نمود. مطمئناً انجام این امر نیاز به اعتبار پژوهشی بیشتر خواهد بود. لذا توصیه می‌گردد که چندین برابر بیشتر از توالی‌ها موجود، توالی ژنومی برای هر یک از گونه‌های

خاویاری به روش RAD بدست آید. همچنین ابداع و توسعه برنامه های نرم افزاری بیوانفورماتیک برای گونه های تتراپلوئید شرایط برای آنالیز بهتر داده ها فراهم خواهد نمود. این مرهم بنوبه خود اعتبار پژوهشی مستقلی را طلب می کند.

با توجه به نتایج بدست آمده و SNP معرفی شده برای تمایز گونه های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی، ضروری است که اقدامات بعدی جهت اطمینان کامل انجام پذیرد از جمله:

بررسی مجدد از طریق توالی دوباره DNA هدف با روش قدیمی توالی یابی به روش سنگر (Sanger) و طراحی و تست تعداد زیادتر از SNP با استفاده از Kasper chemistry و یا روشهای متعدد و متداول موجود

نتایج این تحقیق بخوبی نشان داد که اولاً امکان جداسازی مارکر SNP از ماهیان خاویاری و حتی ماهیان تتراپلوئید وجود دارد. ثانیاً علیرغم ناکامی سایر روشها در تمایز مولکولی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی نتایج این تحقیق نشان داد که دو گونه مورد بررسی کاملاً مستقل از همدیگر بوده و در دو کلاستر مستقل و مجزا دسته بندی شدند.

ثالثاً جهت اهداف کاربردی تر بویژه تشخیص خاویار دو گونه، نیاز به تحقیق بیشتر جهت جداسازی SNP های متعدد و توالی بخش های دیگری از ژنوم این دو گونه است. با توجه به تتراپلوئیدی بودن گونه های فوق، در نتیجه گیری کلی می توان اعلام کرد که در ارزیابی مقایسه ای ژنوم دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی، نیاز به ابداع برنامه بیوانفورماتیک اختصاصی جهت آنالیز داده های RAD میباشد. بی تردید تحقق این امر مهم بدون حمایت مالی جدید و همکاری مشترک امکان پذیر نخواهد بود.

پیشنهادها

- ۱) در این تحقیق، بهترین نتایج روش SNP بود، لذا پیشنهاد میگردد تکنیک SNP بعنوان یکی از مفیدترین و موثرترین روشهای نوین و در حال حاضر ژنتیک مولکولی جهت مطالعات تاکسونومی و جمعیت شناسی، علاوه بر تاسماهیان برای طیف وسیعی از آبزبان اقتصادی کشور مورد استفاده قرار گیرد.
- ۲) در مطالعات بعدی جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی پیشنهاد میشود از روشهای (mtDNA Cytb, ND5, AFLP, 16sDNA, Microsatellite) که قادر به تفکیک دو گونه مزبور نبودند استفاده نگردد.
- ۳) روش (RAPD) موقعی میتواند مفید واقع شود که همانند این تحقیق اولاً با تعداد بیش از ۱۰۰ پرایمر PCR انجام پذیرد و ثانياً بعد از یافتن باند DNA متمایز، کلون و توالی یابی شود. سپس پرایمر مناسب از توالی بدست آمده طراحی گردد و بر روی تعداد حداقل ۳۰-۴۰ نمونه آزمایش گردد.
- ۴) از آنجاییکه ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی یک آگزون پیوسته فاقد اینترون بر روی توالی DNA می باشد پیشنهاد می گردد که به صورت همزمان توالی mRNA و DNA این گونه ها شناسایی و با یکدیگر مقایسه شوند.
- ۵) با توجه به اینترونلس بودن ژن هورمون رشد دو گونه خاویاری پیشنهاد می شود ژن هورمون رشد دیگر گونه های خاویاری نیز شناسایی و توالی آن ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.
- ۶) از تعداد نمونه های بیشتر ژن هورمون رشد تاس ماهی ایرانی و روسی برای مقایسه فیلوژنی با سایر گونه های مهره دار استفاده گردد.
- ۷) از آن جایی که ژن رشد یک توالی حفاظت شده می باشد پیشنهاد می شود با استفاده از روش های جدید ساختار ژن رشد مورد بررسی و با سایر گونه هایی که ژن رشد آن ها تا کنون شناسایی شده مقایسه گردند.
- ۸) با توجه به دستیابی به توالی ژن رشد، انجام مطالعات جهت تعیین بیان ژن رشد در مراحل مختلف نمو و رشد سنی این دو گونه و سایر گونه های خاویاری ضروری است.

پیوست

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA

بمنظور سنجش کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده از روش های اسپکتروفتومتری و الکترو فورز ژل آگارز استفاده گردید که جزئیات آن به شرح زیر می باشد:

روش اسپکتروفتومتری

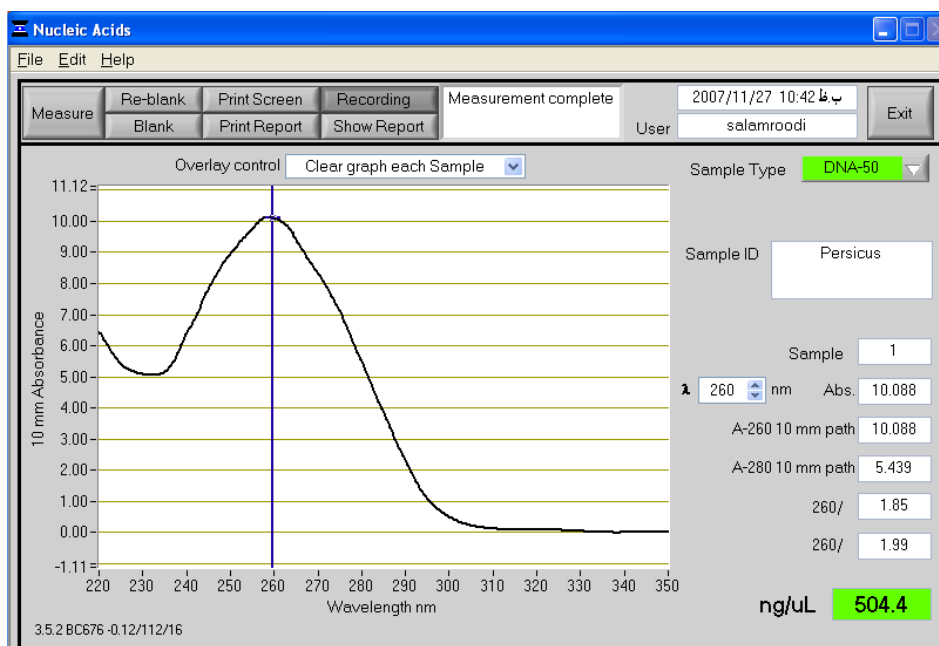
به منظور تعیین کمیت DNA نمونه های استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 1000 استفاده شد (تصویر ۷۹). از آن جایکه میزان جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر و جذب پروتئین در محدوده طول موج ۲۸۰ نانومتر می باشد بر اساس نسبت جذب این دو می توان به میزان خلوص DNA استخراج شده دست یافت. در صورتی که این نسبت کمتر از ۱/۸ باشد نشان دهنده آلودگی RNA و اگر بالاتر از ۲ باشد آلودگی پروتئین در نمونه استخراج شده وجود دارد و بهتر است از نمونه های مناسب تر برای PCR استفاده گردد (تصویر ۸۰).



تصویر ۷۹- دستگاه نانودراپ

ابتدا با استفاده از آب مقطر دستگاه نانو دراپ کالیبره شد و پس از ورتکس کردن نمونه ها در دور پایین، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی را روی جایگاه یا سل پایین ریخته، سل بالا بروی سل پائین قرار داده شد و غلظت آن ثبت گردید. برای هر نمونه حداقل ۳ بار این مراحل صورت گرفت و میانگین اعداد بدست آمده را به عنوان

غلظت DNA استخراج شده محاسبه گردید. در تصویر ۸۰ نمونه ای از اندازه گیری کیفیت DNA با استفاده از نرم افزار نانودراپ نشان داده شده است.



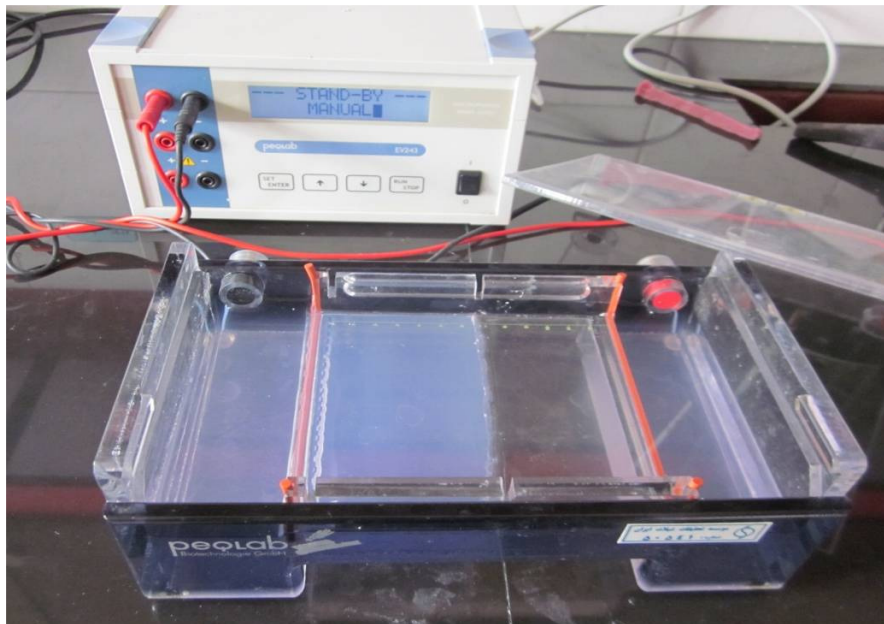
تصویر ۸۰- مشاهده ضریب جذب DNA در رایانه با استفاده از دستگاه نانودراپ

الکتروفورز ژل آگارز

مواد مورد استفاده: پودر آگارز، بافر TAE با غلظت $10 \times$ ، اتیدیوم بروماید ۱٪ بافر سنگین کننده (Loading buffer)، آب مقطر.

وسایل و تجهیزات مورد استفاده: نمونه بردارها و سینی ژل و شانه های آن، الکتروفورز افقی و منبع تامین کننده جریان الکتریسته (ساخت شرکت Amersham Pharmacia)، دستگاه مستند سازی ژل (Wilber lomat Gel Doc) همراه با برنامه نرم افزاری Biocape.

در روش الکتروفورز، DNA استخراج شده را بر روی ژل آگارز ۱٪ قرار داده و با استفاده از یک میدان الکتریکی می توان بر اساس خواص فیزیکی مانند وزن مولکولی و بار الکتریکی DNA ها را تفکیک کرد (تصویر ۸۱).



تصویر ۸۱- دستگاه الکتروفورز افقی همراه با منبع جریان الکتریکی

روش کار به شرح زیر می باشد:

- ۱- تانک الکتروفورز ژل را بر روی یک سطح خشک و تراز قرار داده شد.
- ۲- سینی مخصوص ژل را در سطحی افقی قرار داده و شانه در درون شیار مخصوص خود در انتهای سینی ژل قرار داده شد تا حداقل یک الی دو میلی متر با کفی سینی ژل فاصله داشته باشد.
- ۳- برای تهیه ژل آگارز یک درصد مقدار ۳ میلی لیتر بافر TAE (10x) را در ارلن ریخته و ۰/۳ گرم آگارز به آن اضافه گردید و با آب مقطر حجم آن به ۳۰ میلی لیتر رسانده شد.
- ۴- محلول را روی شعله حرارت داده تا آگارز حل شده و مایع کاملاً شفافی به دست آید. سپس ارلن در دمای آزمایشگاه قرار می گیرد تا سرد شود.
- ۵- زمانی که دمای محلول به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسید مقدار ۲-۳ میکرولیتر ایتیدیوم بروماید ۱٪ به آن اضافه و محلول کاملاً به هم زده شد.
- ۶- سپس به آرامی و با دقت آگارز مذاب را در سینی ژل ریخته و اجازه می دهیم تا فرآیند پلیمریزاسیون ژل آگارز انجام گردد.
- ۷- پس از سرد شدن ژل، آن را به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار داده و پس از مدتی شانه به آرامی از درون ژل خارج گردید.
- ۸- مقدار پنج میکرولیتر از DNA ژنومی همراه با دو الی سه میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط و با دقت به هر یک از چاهکهای ژل ریخته شد.

۹- پس از انتقال تمامی DNA ها به درون چاهک ها، تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۷۵ ولت و ۴۵ میلی آمپر تنظیم گردید .

۱۰- بعد از مدت ۳۰ دقیقه و حرکت بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر، دستگاه مولد برق را خاموش و برای مشاهده DNA ها، ژل داخل دستگاه ژل داک قرار داده شد و کیفیت DNA از لحاظ خلوص، آلودگی فنلی، پروتئین و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

منابع

- آرتوخین، ی. ی. (۱۹۸۳). تمایز جمعیت‌های تاسماهی ایرانی و امکان تکثیر مصنوعی آنها در منطقه ولگا، ترجمه یونس عادل. مرکز تحقیقات شیلات گیلان. بندرانزلی.
- امتیازی، گ. کریمی، م. (۱۳۸۰). مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک. چاپ سوم. انتشارات مانی. ۴۸۸ص.
- باقری، ک. پورکاظمی، م. خوش خلق، م. ر. حسن زاده صابر، م. (۱۳۸۸). کاربرد مارکرهای ملکولی (Microsatellite and mtDNA) در تفکیک تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه منابع طبیعی صومعه سرا- دانشگاه گیلان. ۱۰۹ص.
- پرواریوخوا، یو. ن. (۱۳۷۴). مطالعه ژنتیک جمعیتی در استفاده صنعتی از تاسماهیان. مجموعه سخنرانی‌ها. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. رشت.
- پورکاظمی، م. (۱۳۸۵). ژنتیک مولکولی جمعیت ماهی قره برون و ازون برون حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از مایکروستلایت. ۱۳۸۵. گزارش نهایی پروژه. سازمان پژوهش‌های علمی کشور (کمیسیون بیوتکنولوژی) برنامه ملی تحقیقات. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان. ۵۸ صفحه.
- پورکاظمی، م. (۱۳۸۶). طرح جامع ارزیابی ساختار ژنتیکی تاسماهیان دریای خزر. گزارش نهایی پروژه. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۸۳ صفحه.
- پورکاظمی، م. بردران نویری، ش. نوروز فشخامی، م. ر. (۱۳۸۳). مروری بر شناسایی جمعیت ونژادهای تاسماهیان دریای خزر. موج سبز. بهار ۱۳۸۳. صفحه ۲۵-۲۱.
- توکلی، م. پرافکنده حقیقی، ف. خوشقلب، م. کیمرام، ف. تقوی، الف. (۱۳۸۹). ارزیابی ذخایر تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در حوضه جنوبی دریای خزر طی سالهای ۸۸-۸۷. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۱، سال نوزدهم، صفحه ۸-۱.
- تیزکار، ب. (۱۳۷۶). مقایسه نرماتیوهای تکثیر و پرورش ماهی قره برون صید شده از دریا و رودخانه سفیدرود. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی نور. ۱۵۸ صفحه.
- چکمه دوز قاسمی، ف. (۱۳۸۴). مقایسه روشهای استخراج DNA در آبزیان و دستورالعمل کاربردی آن. پایان نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علمی- کاربردی علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان، دانشگاه جامع علمی- کاربردی، ۵۳ص.

- حدادی مقدم، ک. نگارستان، ح. پزند، ذ. بهروزخوش قلب، م. ر. چوبیان، ف. جوشیده، ه. (۱۳۸۲). گزارش نهایی طرح تحقیقاتی "بررسی تغذیه ماهیان خاویاری در سنین مختلف حیات آنها و تا عمق ۱۰ متری دریای خزر (استان گیلان)"، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۶۹ ص.
- خوش خلق، م. ر (۱۳۸۵). مقایسه ساختار ژنتیکی تاس ماهی ایرانی (*A.persicus*) در سواحل جنوبی و تاس ماهی روسی (*A.gueldenstaedtii*) در سواحل جنوبی و شمالی دریای خزر با استفاده از روش (microsatellite)، رساله دکترا. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- صفری، م. (۱۳۸۵). بررسی ساختار جمعیت ماهی شپ (*A.nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش میکروستلایت. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ ص.
- قرایی، ا.؛ پورکاظمی، م؛ رضوانی، س و ب. مجازی امیری (۱۳۸۴). مقایسه شباهت و فاصله ژنتیکی تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از روش RAPD، مجله علمی شیلات ایران. سال چهارم. شماره ۲. ص ۹۱-۱۰۱.
- قربانی، نصر آبادی، ر. حاجی مرادلو، ع. (۱۳۸۰). مقایسه تجزیه و تحلیل مورفولوژیک ماهیان خاویاری نورسقره برون و چالباش در سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، سال هشتم، شماره چهارم، صفحه ۱۹۱-۲۰۴.
- کیوان شکوه، س. (۱۳۸۱). بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی (*Huso huso*) با استفاده از روش PCR-RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی نو. دانشگاه تربیت مدرس. ۵۵ ص.
- کیوان، امین. (۱۳۸۲). ماهیان خاویاری ایران، سیستماتیک، بیولوژی، تکثیر مصنوعی، ارزیابی و ترمیم ذخایر، بهره برداری. انتشارات: نقش مهر، ۴۲۴ ص.
- لالویی، ف. (۱۳۷۵). بررسی چگونگی مهاجرت ماهیان خاویاری به رودخانه های تجن و گرگانرود. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۴، سال پنجم، زمستان ۱۳۷۵. صفحه ۳۰-۱۷.
- مایر، ا. (۱۳۷۰). جمعیت ها، گونه ها و تکامل. جلد ۱ و ۲. ترجمه جمشید درویش، انتشارات نشر نما.
- مایر، ا. (۱۳۸۵). مبانی سیستماتیک جانوری. ترجمه: امید میر شمسی کاخکی، جمشید درویش. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد
- مقیم، م و حسن نیا، م. (۱۳۷۶). بررسی ذخیره ماهی دراکول (*Acipenser stellatus*) در سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. شماره سوم. سال ششم.
- مقیم، م. (۱۳۸۱). ارزیابی ذخایر و بررسی برخی پارامترهای جمعیتی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در سواحل ایرانی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. سال یازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۱. صفحه ۱۱۸-۹۸.

- مقیم، م. (۱۳۸۲). ارزیابی ذخایر و پویایی جمعیت تاس ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر (آب های ایران). مجله علمی شیلات ایران. شماره ۴. صفحات ۹۷-۱۱۸.
- نصری چاری، ع. (۱۳۷۲). بررسی مقایسه ای پارامترهای مورفوبیولوژیک چالباش و قره برون سواحل جنوبی دریای خزر در جهت نظریه استقلال قره برون بعنوان گونه تاس ماهی ایرانی (*A.persicus*)، پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران.
- نقوی، م.؛ قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق.، (۱۳۸۶). نشانگرهای مولکولی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۴ص.
- هاشم زاده سقرلو، ا. ۱۳۸۴. اصول و روشهای مطالعات ژنتیکی ماهیان. انتشارات: نقش مهر، ۴۴۸ ص.
- **Adams, B.A., Lescheid, D.W., Vickers, E.D., Crim, L.W., Sherwood, N.M. 2002.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in sturgeon, whitefish, grayling, flounder and halibut: cDNA sequence, exon skipping and evolution. *Regulat. Peptides*, 109: 27–37.
- **Adelman, J.P., Hayflick, J.S., Vasser, M., Seeburg, P.H. 1983.** In vitro deletional mutagenesis for bacterial production of the 20,000-dalton form of human pituitary growth hormone. *DNA*, 2 (3): 183-193.
- **Agellon, L.B., Davies, S.L., Chen, T.T. Powers, D.A. 1989.** Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Prec. Natl. Acad*, 85: 5136-5140.
- **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997.** Gapped Blastand PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*25:3389–3402.
- **Arnheim, N. ; Syrange, C. and Erlich, H., 1985.** Use of Pooled DNA Samples to detect linkage disequilibrium of Polymorphic restriction fragments and human disease : studies of the HLA class 11 loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,82,6970-6974.
- **Artyukhin, E. N., 1974.** On the Status of Late Spring Sturgeon in the Volga River, in Abstracts of Account Session TSNIORKh Dedicated to the 10th Anniversary of the Institute , pp. 7–9.
- **Artyukhin E.N. 1979.** Persian sturgeon in the rivers of the North Caspian and prospects of its exploitation in sturgeon economy. In: " Biological bases for development of sturgeon economy in water bodies of USSR. P. 105-114.
- **Artyukhin, E. N., 1995.** On biogeography and relationships within the genus *Acipenser*. *Sturgeon Q.* 3: 6–8.
- **Artyukhin, E.N. & Z.G. Zarkua. 1986.** On the problem of taxonomic rank of the sturgeon from the Rioni River (the Black Sea Basin). *Voprosy Ikhtiologii* 26: 61-67(in Russian).
- **Artyukhin, E.N. 1997.** The current status of commercial sturgeon species in the Volga River-Caspian Sea Basin. In: *Sturgeon Stocks and Caviar Trade Workshop (Proceedings of the Sturgeon Stocks and Caviar Trade Workshop, Bonn, 9 October–10 October, 1995)*. V.J. Birstein, A. Bauer and A. Kaiser Pohlmann, eds. IUCN, Gland, Cambridge, Bonn, 23: 9–12.
- **Artyukhin, E.N. 2006.** Morphological Phylogeny of the Order Acipenseriformes. *J. Appl. Ichthyol.* 22 (Suppl. 1), 66-69.
- **Artyukhin, E.N. and Z.G. Zarkua. 1986.** On the problem of taxonomic rank of the sturgeon from the Rioni River (the Black Sea Basin). *Voprosy Ikhtiologii* 26: 61-67(in Russian).
- **Avise, J. C. (2000).** *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University, Cambridge, England
- **Awata, S., Munehara, H., Kohda, M., 2005.** Social system and reproduction of helpers in a cooperatively breeding cichlid fish (*Julidochromis ornatus*) in Lake Tanganyika: field observations and parentage analyses. *Behav Ecol Sociobiol* 58, 506-516
- **Azizur Rahman, M., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., Maclean, N. 1998.** Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research*, 7: 357-369.
- **Bardacki, F., Skibinski, D.O.F., 1994.** Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73, 117– 123.

- **Barroso, R.M., Wheeler, P.A., LaPtr, S.E., Drea, R.E., Thorgaard., 2008.** QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) × Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) trout cross. *Aquaculture Volume 277, Issues 3-4, Pages 156-163.*
- **Bartfai, R. ; Egedi, S. ; Yue, G. H. ; Kovacs, B. Urbanyi, B. and Tomas. G., 2003.** Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. *Reproductive Genomics Group. Aquaculture* 219, 157-167.
- **Bass. A. L., Dewar. H., Thys T., Streelman. J. T., and Karl. S. A. 2005.** Evolutionary divergence among lineages of the ocean sunfish family, Molidae (Tetraodontiformes). *Marine Biology* , July 2005
- **Belyaeva VN, Kazanchev EN, Raspopov VM. 1989.** The Caspian Sea: Ichthyofauna and commercial resources. Moscow, Nauka, 236 pp.
- **Ber, R., Daniel, V. 1992.** Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene*, 113: 245-250.
- **Berg, L.S. 1934b.** *Acipenser gueldenstaedti persicus*, a sturgeon from the SouthCaspian Sea. *Annual Magazine of Natural History, Series 10*, 317-319.
- **Berg, L.S. 1940.** Zur Systematik der Acipenseriden. *Zool. Anz.* 27: 665-667.
- **Berg, L.S. 1948a.** On the position of Acipenseriformes in the system of fishes. *Trudy Zoologicheskogo Instituta 7: 7-57* (in Russian).
- **Bhandari, B., Roesler, W.J., DeLisio, K.D., Klemm, D.J., Ross, N.S., Miller, R.E. 1991.** A functional promoter flanks an intronless glutamine synthetase gene. *J. Biol. Chem*, 266(12): 7784-7792.
- **Birstein VJ, Doukakis P, DeSalle R. 2000.** Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Conserv Genet* 1:81-88.
- **Birstein VJ, Poletaev AI, Goncharov BF. 1993.** The DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry* 14:377-383.
- **Birstein, V. J. and P. Doukakis., 2001.** Molecular Identification of Sturgeon Species: Science, Bureaucracy, and the Impact of Environmental Agreements,” in *Monitoring Migratory Animals* (Publ. Fed. Agency for Nature Conservation (BfN), Bonn, 2001), pp. 47-63.
- **Birstein, V. J. and R. DeSalle. 1998.** Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Mol. Phylo. Evol* 9:141-155.
- **Birstein, V. J. Doukakis, P. and DeSalle, R. 1999.** Molecular phylogeny of Acipenserinae and black caviar species identification. *J. Appl. Ichthyol.* 15 (1999), 12-16.
- **Birstein, V. J., Ruban, G., Ludwig, A., Doukakis, P. & DeSalle, R. 2005.** The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: How many cryptic forms does it contain? *Systematics and Biodiversity* 3, 203-218.
- **Birstein, V.J. and W.E. Bemis. (1997).** How many species are there in the genus *Acipenser*? *Env. Biol. Fish.*
- **Birstein, V.J., Bemis, W.E., Waldman, J.R. 2002.** The threatened status of acipenseriform species: A summary. *Stur. Bio. Cons*, 17: 427-435.
- **Birstein, V.J., Doukakis, P., Sorkin, B. and R. Desalle. 1998.** Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar. *Conservation Biology.* 12(4):766-775.
- **Birstein, V.J., P. Doukakis, R. DeSalle 2002.** Molecular phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchidae. *Copeia* 2, 287-301.
- **Borodin, N. A. 1897.** “Materials on Sturgeon Biology,” *Tr. Otdela Ichthyol. Akad. Nauk* 2, 261-272 (1897).
- **Borodin, N. A. 1926.** “*Acipenser persicus*, a Sturgeon from the Caspian Sea,” *Ann. Mag. Nat. Hist., Ser. 20* 9, 26-28(1926).
- **Borowsky, R.L. ; McClelland, M. Cheng. R. and welsh. J., 1995.** Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: the xiphophorus modle. *Mol. Biol. Evol.*, 12. 1022-1032.
- **Botstein, D., White, R.L., Skolnick, m., Davis, R.W., 1980.** Construction of a genetic linkage map in map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- **Braginets, O. P., N. Minakawa, C. M. Mbogo, and G. Yan. 2003.** Population genetic structure of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:2003. 303-308
- **Brown. J. R., Beckenbach. K., Beckenbach. A. T. , and Smith. M. J. 1996.** Length Variation, Heteroplasmy and Sequence Divergence in the Mitochondrial DNA of Four Species of Sturgeon (*Acipenser*). *Genetics* 142: 525-335
- **Callejas, C. Ochando, M.D., 2002.** Phylogenetic relationships among Spanish Barbus Species (pisces,cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 89, 36-43.
- **Callejas.C. pchando, M..D., 2001.** Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian peninsula. *Jornal of Fish Biology* volume 59 Issue 6, pp 1589-1599.

- **Callejas.C. pchando, M..D., 2001.** Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian peninsula. *Jornal of Fish Biology* volume59Issue6,pp1589-1599.
- **Cao, H., Zhou, R. J., Wei, Q. W., Li, C. J., Gui, J. F. 2011.** Molecular characterization of the growth hormone in Chinese sturgeon and its expression during embryogenesis and early larval stages. *J. Appl. Ichthyol*, 27(2): 501–504.
- **Cardenas, L. Hernandez, C. E. Poulin, E. Magoulas, A. KornWeld, I. and Ojeda, F. P. Origin. 2005.** diversification, and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (2005) 496–507
- **Carmona, R. Domezain, A. Gallego, M. G. Rodriguez, J. A. Ruiz-Rejon, M. 2009.** Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. *Fish and Fisheries Series* 29.
- **Chalmers, K. J. ; Waugh. R. ; Sprent, J.I. ; Simons, A.J. and Powell,W., 1992.** Detection of genetic Variation between and within population of *Gliricidias sepium* and *G.maculata* using RAPD markers. *Heredity*.69.465.472.
- **Chang, Y., Liu, C., Huang, F., Lo, T. 1992.** The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: Bighead carp, silver carp, and grass carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87:385-393.
- **Chao, S.C., Pan, F.M., Chang, W.C. 1989.** Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1007: 233-6.
- **Chebanov, M., Billard, R. 2001.** The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aqua. Liv. Res*, 14: 375-381.
- **Chen IC, Chapman FA, Wei CI et al. 1996.** Preliminary studies on SDS-PAGE and isoelectric focusing identification of sturgeon sources of caviar. *J. Food Sci.* 61: 533–359.
- **Chen, Y., Wang, Y., He, S., Zhu, Z. 2003.** Cloning and Sequencing of the Growth Hormone Gene of Large Yellow Croaker and Its Phylogenetic Significance. *Biochem. Genetics*, 42: 365-375.
- **Chiou, C.S., Chen, H.T., Chang, W.C. 1990.** The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1087(1): 91–94.
- **Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M., 2006.** Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1–29
- **Choudhury A and Dick TA. 1998.** The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeography. *Journal of Biogeography* 25: 623–640.
- **Chrisanfova . G.C. ; Iudanny, R.I. and Slynko, V., 2004.** RAPD Fingerprinting of common Bream (*Abramis brama* L.) Roach(*Rutilus rutilus* L.) and their F1 Hybrids (*A.brama* × *R. rutilus* and *R. rutilus* × *A. brama*). *Russian journal of Genetic* volume 40, Number10, pp.1182-1186.
- **Cnaani, A., Zilberman, N., Tinman, S., Hulata, G., Ron, M., 2004.** Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F(2) tilapia hybrid. *Mol. Genet. Genomics* 272, 162–172
- **Comincini, S.; Lanfredi, M.; Rossi, R.; Fontana, F., 1998.** Use ofRAPD markers to determine the genetic relationships among sturgeons (Acipenseridae, Pisces). *Fish. Sci.* 64, 35–38.
- **Congiu, L. Fontana, F. Patarnello, Rossi T.R.and L. Zane. 2002.** The use of AFLP in sturgeon identification. *J. Appl. Ichthyol.* 18 (2002), 286–289
- **Congiu, L. Rossi, R., Colom., G., 2002.** Population analysis of the sand smelt *Atherina boyeri* (teleostei. Atherinidae), from Italian coastal lagoons by random amplified polymorphic DNA. *Marine Ecology*,1.229:279-289.
- **Dahle, G. ; Rahmun, M., and Eriksen, A.G., 1997.** RAPD fingerprinting used for dis criminaty among three population of *Hilsa shad* (*Tenualosa hlisha*) fisheries Res ., 32,pp. 203-269.
- **Dannewitz, J., Maes, G.E., Johansson, L.,Wickstrom, H., Volckaert, F. A.M., Jarvi, T., 2005.** Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proc. Royal Soc. Lond., B* 272, 1129–1137
- **Debus, L.; Winkler, M.; Billard, R., 2002.** Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons. *Int. Rev. Hydrobiol.* 87, 585–603.
- **Derome. N., Chen. W., Dettai. A., Bonillo. C. and Lecointre. G. 2002.** Phylogeny of Antarctic dragonfishes (Bathyaconidae, Notothenioidei, Teleostei) and related families based on their anatomy and two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 139–152
- **DeSalle, R.; Birstein, V. J., 1996:** PCR identification of black caviar. *Nature* 381, 197–198
- **DeWoody J, Avise J. 2001.** Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems. *J Hered* 92:167–172

- **Dinesh, K.R. ; Pang, V.P. ; Lim, T.M. ; Chua, L. and Tan, T.W., 1994.** DNA Amplification fingerprinting in the Guppy (*Poecilia reticulata*) . Asian fisheries Society, pp. 504-507.
- **Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L., Chan, W.K., Phang, V.P.E., 1993.** RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool. Sci.* 10, 849– 854.
- **Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L., Chan, W.K., Phang, V.P.E., 1996.** Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquac. Int.* 4, 19– 30.
- **Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L., Chan, W.K., Phang, V.P.E., 1993.** RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool. Sci.* 10, 849– 854.
- **Dixon, T.J., Coman, G.J., Arnold, S.J., Sellars, M.J., Lyons, R.E., Dierens, L., Preston, N.P., Li, Y., 2008.** Shifts in genetic diversity during domestication of Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, monitored using two multiplexed microsatellite systems. Article in press
- **Doadrio. I. and Perdiges. A.** 2005. Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis, cobitidae*) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37 (2005) 484–493
- **Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991.** ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19, 4008.
- **Dong, S., Kong, J., Meng, X., Zhang, Q., Zhang, T., Wang, R., 2008.** Microsatellite DNA markers associated with resistance to WSSV in *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture*, Article in press.
- **Dong, Z. Hou, E., 1998.** Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp (*Poecilia reticulata*) . Asian fisheries society , pp.504 -507.
- **Doukakis P, Birstein VJ, Ruban GI, DeSalle R. 1999.** Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. *Mol Ecol* 8:S117–S127.
- **Doukakis, P. Birstein, V. J. and De Salle, R.** 2005. Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 457–460.
- **Elo, K., Ivanoff, S., Jukka, A., Vuorinen, J.A., Piironen, J., 1997.** Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 152, 55–56.
- **Fain SR, LeMay JP, Shafer JA, Hoesch RM, Hamlin BC, Straughan DJ.** 2001. DNA sequence identification of sturgeon caviars traveling in World Trade. Fourth International Symposium on Sturgeon, Oshkosh, Wisconsin, 8–13 July 2001. Extended Abstracts, LE1
- **Fang, M., X. Hu, T. Jiang, M. Braunschweig, L. Hu, Z. Du, J. Feng, Q. Zhang, C. Wu, and N. Li.** 2005. The phylogeny of Chinese indigenous pig breeds inferred from microsatellite markers. *Anim. Genet.* 36:7–13
- **Felsenstein, J. 1982.** Numerical methods for inferring evolutionary trees. *Quarte. Rev. Biol.* 57:379-404.
- **Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., Mcmeel, O., Thompson, C., Stone C., McGinnity, P., Hynes, R. A. 1995.** the application of molecular marker to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Jornal of Fish Biology.* 47(SupplementA)103-126.
- **Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., Mcmeel, O., Thompson, C., Stone C.,**
- **Fopp-Bayat, D ., Woznicki, P., 2008.** Test of Mendelian segregation among 10 microsatellite loci in the fourth generation of bester (*Huso huso* L. × *Acipenser ruthenus* L.). *Aquaculture Research* 277, 1-6
- **Fopp-Bayat, D** 2007. Genetic identification of black caviar based on microsatellite DNA analysis. *Environmental Biotechnology* 3 (2): 57-60
- **Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P.,** Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. *Aquaculture* 264, 54-58
- **Fuji, K., Hasegawa, O., Honda, K., Kumasaka, K., Sakamoto, T., Okamoto, N., 2008.** Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 272, 291-295
- **Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M.R.M., Sakamoto, T., Okamoto, N., 2006.** Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 254, 203-210
- **Funkenstein, B., Chen, T.T., Powers, D.A., Cavari, B. 1991.** Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene*, 103: 243-7.
- **Ganong, W.F. 1983.** Review of Medical Physiology, *Lan. Medic. Pub*, 323-335.
- **Garcia de Leon, F.J., Dallas, J.F., Chatain, B., Canonne, M., Versini, J.J. and Bonhomme, F. 1995.** Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae). *Mol. Biol. Biotech.* 4, 62±68
- **Garcia, D.K., Dhar, A. K., Alcivar-Warren, A., 1996.** Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two Microsatellite and differential Mrna expression in (*Penaeus vannamei*). *MOL.*

- Garrido-Ramos, M.A., Soriguer, M.C., Herrán, R., Jamilena, M., Ruiz Rejón, C., Domezain, C., Hernando, J.A., Ruiz Rejón, M. 1997. Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Mar. Biol.*, 129(1): 33-42.
- Garza, J. C., Slatkin, M., Freimer, N. B. 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.* 12: 594-603
- Gatermann, K.B., Hoffmann, A., Rosenberg, G.H., Kaufer, N.F. 1989. Introduction of functional artificial introns into the naturally intronless *ura4* gene of *Schizosaccharomyces Pombe*. *Mol. Cell. Biol.*, 9(4): 1526-1535.
- Gharaei, A.; Pourkazemi, M.; Rezvani, S.; Mojazi Amiri, B. 2005. Genetic differences; and resemblance between *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* by means of RAPD technique. *Iran. Sci. Fish. J.* 14, 91-102
- Giannasi, N., R. S. Thorpe & A. Malhotra, 2001b. The use of amplified fragment length polymorphism in determining species trees at fine taxonomic levels: analysis of a medically important snake, *Trimeresurus albolabris*. *Molecular Ecology*, 10: 419-426
- Gilbey, J., Verspoor, E., Atle Mo, T., Sterud, E., Olstad, K., Hytterod, S., Jones, C., Noble, L., 2006. Identification of genetic markers associated with *Gyrodactylus* 224alaries resistance in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ (Vol. 71, Issue 2, Pages 119-29)*
- Giovannoni, J.J. ; Wing, R.A. ; Gonal, M.W. and Tanksley, S.D., 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pool existing mapping population. *Nucleic Acids Res.* , 19, 6553-6558.
- Gomez, J.M., Loir, M., Le Gac, F. 1998. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.*, 58: 483-491.
- GonzBlez-Villaselo, L.I., Zhang, P., Chen, T.T., Powers, D. 1988. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene* 65, 239-246.
- Grande, L., and W. E. Bemis. 1991. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and Recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. *J. Vert. Paleo.*, Mem. 1, vol. 11, Suppl. 1:i-v,1-121.
- Grande, L., Bemis, W.E. 1991. Osteology and Phylogenetic Relationships of Fossil and Recent Paddlefishes (Polyodontidae) with Comments on the Interrelationships of Acipenseriformes. *J. Verteb. Pale.*, 11(1): 121-128.
- Grewe, P.M., C. C. Krueger, J. E., Marsden, C. F., Aquadro, and B. May., 1994. Hatchery origins of naturally produced lake trout fry captured in lake Ontario: temporal and spatial variability based on allozyme and mitochondrial DNA data. *Transactions of the American Fisheries Society* 123,309-320.
- Griffiths, R., 2000. Sex identification using DNA markers . In *Molecular Methods in Ecology* (Baker, A. J., ed .) . London: Black Well Science.
- Guo. X., He. S. and Zhang. Y. 2006. Phylogenetic relationships of the Chinese sisorid catfishes: a nuclear intron versus mitochondrial gene approach. *Hydrobiologia* (2007) 579:55-68
- Hadrys, H. ; Balick, M. and Schier water, B., 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology . *Molecular Ecology* , 1 , 55-63.
- Hallerman, Eric. 2003. *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland
- Hao, F., YongMing, F., Jian, L., Hui, W., Yun, L., ShaoJun, L. 2011. Black carp growth hormone gene transgenic allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀)×*Cyprinus carpio* (♂). *Lif. Sci*, 23(1): 12-19.
- Hara, M., Sekino, M., 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 217, 107-114
- Hardman. M., and Lundberg. J. G. 2006. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” catfish (*Siluriformes: Pimelodidae*) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 410-418
- Hassanien, H.A. ; ELnady, M. Obeida, and Itriby, A.H., 2008. Genetic diversity of Nile tilapia population revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) . *Res. Volume 35 Issue 6* , pages 587-593.
- Herlin, M., Delghandi, M., Wesmajervi, M., Taghhart, J.B., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2008. Analysis of the parental contribution to a group of fry from a single day of spawning from a commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) breeding tank. *Aquaculture* 274, 218-224
- Herwerden. b., William. J., Stephen. J., Newman.c., Graham. Pegga. G., Briskeya. L., Sinclair. W. 2009. A comparison of the population genetics of *Lethrinus miniatus* and *Lutjanus sebae* from the east and west coasts of Australia: Evidence for panmixia and isolation Lynne van.

- **Hillis, D. M., Moritz, C. 1990.** Molecular taxonomy. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
- **Holcik, J., 1989.** The freshwater fishes of Europe, Vol I/II. General Introduction to fishes Acipenseriformes. Aula-Verlag Wiesbaden 468: 342-362.
- **Hong-yan, L., Fan-rong, Z., Dong, Y., La i-ning, Y. 2009.** Structure and Evolutionary Analysis of *Acipenser sinensis* Growth Hormone cDNA Sequences. *J. Hydro*, 2(5): 126-134.
- **Hong, Y.M. ; Wu, C. ; Wang, Y.C. and Huang, M.C., 2006.** A novel molecular genetic marker for gender determination of pigeons, *Theriogenology* 65,1759 -1768.
- **Hung, S.S.O., Paul, B., Lutes, A., Fred, S., Trond, C., Storebakken, A. 1989.** Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub yearling at different feeding rates. *Aquaculture*, 80:147-153.
- **Iturra, P. ; Lam, N. ; Fuente, M. ; Vergara, N. and Medrano, J.F., 2001.** Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescent in situ hybridization (Fish) . *Genetica* 111: 125 -131.
- **Iturra, P., Medrano, J., Bagley, M., Lam, N., Vergara, N., Marin, J., 1998.** Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101, 209–213.
- **IUCN, 1996:** 1996 IUCN red list of threatened animals. IUCN, Gland, Switzerland.
- **Jaillon, O. ; Aury, J.M. ; Petit, J. and Stange-thomann, N., 2004.** Genome duplication in the teleost fish *Tetradon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype . *Nature* 431 : 946 -957.
- **Jennekens, I., Meyer, J. N., Horstgen-Schwark, G., May, B., Debus, L., Wedekind, H. and Ludwig, A. 2001.** A Fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 39±42
- **Jinping, C. ; Liqun, L. ; Xiawen, S. and Chongzhi, D., 2002.** Relationships of (*Leuciscus walckii*) Dybowski and tribolodone fishes in suifen River by RAPD technique . ASFA. pp1-4
- **Johansen, B., Johnsen, O.C. Valla, S. 1989.** The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 77: 317-324.
- **Johnson, N.A., Vallejo, R.L., Silverstein, J.T., Welch, T.J., Wiens, G.D., Hallerman, E.M., Palti, Y., 2008.** Suggestive Association of Major Histocompatibility IB Genetic Markers with Resistance to Bacterial Cold Water Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol* 10:429–437
- **Keck, B. P. and Near, T. J. 2005.** Assessing phylogenetic resolution among mitochondrial, nuclear, and morphological datasets in *Nothonotus darters* (Teleostei: Percidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46 (2008) 708–720
- **Ketmaier, V., Bianco, P.G., Cobolli, M., Krivokapic, M., Caniglia, R., De Mattheis, E. 2004.** Molecular phylogeny of two lineages of *Leuciscinae* cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1061-1071
- **Keyvanfar, A.; Rochu, D.; Fine, J. M., 1988.** Comparative study of sturgeon oocyte soluble proteins by isoelectric focusing. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 90, 393–396.
- **Keyvanshokoh, S. Kalbassi, M.R., 2006.** Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers : *Aquacultuer research* . Volum 37, pp.1437-1440.
- **Keyvanshokoh, S. Poutkazemi, M. Kalbassi, M.R. (2007).** The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*), *J. Appl. Ichthyol.* 23 1–2.
- **Khodorevskaya, R. P., Krasikov, Y. V. 1999.** Sturgeon abundance and distribution in the Caspian Sea. *J. Appl Ichthyol*, 15: 106-113.
- **Kirilyuk, M.M., Salnikov, A.I., Ivanov, A.I., kukuradze, A.M. 1975.** The properties of fattening and the modern state of the food supply of *Acipenseridae* in north western of the black sea under conditions of regulated run off, *Tr. VNIRO*, 107: 105-113.
- **Kiss, G.B. ; Csanadi, G. ; Kalaman, K. ; Kalo, P. and Okresz, L, 1993.** Construction of a basic linkage map for (*alfa alfa*) using RFLP , RAPD , isozyme and morphological markers. *Mol .Gen . Gent .*, 238 . 129 - 137 .
- **Kocher, T.D. & Stepien, C.A. 1997.** *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press
- **Kocour, M., Kohlmann, K. 2011.** Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*, 310: 298–304.
- **Koren, Y., Sarid, S., Ber, R., Daniel, V. 1989.** Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. *Gene*, 77: 309-315.

- **Kovacs, B. ; Egedi, S. ; Bartfai, R. and Orban, L., 2001.** Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica*, 110 : 267-276.
- **Krieger J and Fuerst PA.** 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the Order Acipenseriformes. *Molecular Biology and Evolution* 19: 891–897
- **Krieger J, Fuerts PA and Cavender T.** 2000. Phylogenetic relationship of north American sturgeons (Order Acipenseriformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 64–72.
- **Krieger, J. Hett, A. K. Fuerst, P. A. Birstein, V. J. AND Ludwig,** 2006 A. Unusual Intraindividual Variation of the Nuclear 18S rRNA Gene is Widespread Within the Acipenseridae. *Journal of Heredity* : 97(3):218–225
- **Krieger, J. Hett, A. K. Fuerst, P. A. Artyukhin, E. and Ludwig, A.** 2008. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1), 36–45.
- **Lagunova V.S.** 2001. Natural reproduction of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the lower Volga river. In: "Problems of research and sustainable use of marine natural resources". Astrakhan. P.118-124.
- **Li, C.H., Evans, H.M.** 1944. The Isolation Of Pituitary Growth Hormone. *Science*, 3(2566): 183–184.
- **Li, Y. ; Hill, J.A. ; Yue, G.H. ; Chen, F. and Orban, L., 2002.** Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetradon nigroviridis*. *Journal of Fish Biology* , 60.
- **Liu, Y.G. ; Chen, S.L. and Li, B.F., 2007.** Genetic differentiation among common and selected hatchery populations of flounder: *Animal genetic issn*.pp.65-72.
- **Liu, Z. ; Lip, A. and Dunham. R.A., 1998.** Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Lctalurus punctatus*), blue catfish (*I. farcatus*) and their F1 , F2 and backcross hybrids . *Animal genetic ISSN*.268 - 272.
- **Liu, Z. J. Cordes, J.F., 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaquiltuer* 238, 1-37.
- **Loytynoja, A., Goldman, N.** 2008. Phylogeny-Aware Gap Placement Prevents Errors in Sequence Alignment and Evolutionary Analysis. *Science*, 320(5883): 1632-1635.
- **Ludwig A, Debus I, Lieckfeldt, D.** 2002. When the American sea sturgeon swam east. *Nature* 419: 447–448.
- **Ludwig, A.** 2008. Identification of Acipenseriformes species in trade. *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1), 2–19.
- **Ludwig, A. and Kirschbaum, F.** 1998. Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon *Journal of Fish Biology* 52, 1289–1291.
- **Ludwig, A. and Kirschbaum, F.** 1998. Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon *Journal of Fish Biology* 52, 1289–1291.
- **Ludwig, A. Debus, L and Jenneckens, I.** 2002b. A Molecular Approach to Control the International Trade in Black Caviar. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 87 , 5–6 661– 674.
- **Ludwig, A., Arndt, U., Lippold, S., Benecke, N., Debus, L., King, T., Matsumura, S.** 2008. Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. *Evol. Biol.* 8:221.
- **Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky, V., and Jenneckens, I.** 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 158: 1203–1215.
- **Ludwig, A., L. Congiu, C. Pitra, J. Fickel, J. Gessner, F. Fontana, T. Patarnello, L. Zane** 2003. Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Molecular Ecology* Volume 12 Issue 12 Page 3253-3264.
- **Ludwig, A., L. Congiu, C. Pitra, J. Fickel, J. Gessner, F. Fontana, T. Patarnello, L. Zane** 2003. Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Molecular Ecology* Volume 12 Issue 12 Page 3253-3264.
- **Lukyanenko V.I., J.G. Umerova, and B.B. Karataeva.** (1974). South-Caspian sturgeon - separate species of the genus *Acipenser*. *Proc. USSR Acad. Sci.* 5: 458-461.
- **Lukyanenko, V. I., 1973.** Intraspecific Differentiation in Sturgeon and Its Significance for Rational Fisheries, in Abstracts of the Account Session of TSNIORKh, pp. 53–56.
- **Luk'yanenko, V.I., Vasil'ev, A.S., Luk'yanenko, V.V., Khabarov, M.V.** 1999. On the increasing threat of extermination of the unique Caspian sturgeon populations and the urgent measures required to save them. *J. Appl Ichthyol*, 15: 99-102.
- **Magoulas, M., and E. Zouros.** 1993. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 10:319-325
- **Mahmoud, S.S., Moloney, M.M., Habibi, H.R.** 1996. Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 139-44.

- **Makeyev, A.V., Chkheidze, A.N., Liebhaber, S.A. 1999.** A set of highly conserved RNA-binding proteins, alpha CP-1 and alpha CP-2, implicated in mRNA stabilization, are coexpressed from an intronless gene and its intron-containing paralog. *J. Biol. Chem.*, 274(35): 24849–24857.
- **Male, R., Nerland, A.H., Lorens, J.B., Telle, W., Lossius, I., Totland, G.K. 1992.** The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. *Bioch. Biophys. Acta*, 1130: 345-359.
- **Marins, L.F., Levy, J.F., Folch, J.M., Sanchez, A. 2003.** A growth hormone-based phylogenetic analysis of euteleostean fishes including a representative species of the Atheriniformes Order, *Odontesthes argentinensis*. *Gen. mol. Biol.*, 26 (3): 295-300.
- **Martignetti, J.A., Brosius, J. 2009.** Neural BC1 RNA as an Evolutionary Marker: Guinea Pig Remains a Rodent. *Nat. Acad. Scien.*, 90(20):9698-9702.
- **Maxam, A.M., and Gilbert, W., 1977.** A new method for sequencing DNA. *Froc. Natl.Acad. Sci. USA* 74, 560-564. The chemical degradation method.
- **May, B., Krueger, C. C., and Kincaid, H. L. 1997.** Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54(7): 1542–1547 (1997)
- **Mayer, W. E. Tichy, H. and Klein, J. 1998.** Phylogeny of African cichlid fishes as revealed by molecular markers. *Heredity*: 80, 702–714.
- **Mc Quown, E.C. ; Sloss, B.L. ; Sheehan, R.J. ; Rodzen, J. ; Tranah, G. and May, B., 2000.** Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon primer sequences for scaphirhynchus and Acipenser.
- **McCormick, S.D. 2001.** Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.*, 41: 781-794.
- **McGinnity, P., Hynes, R. A. 1995.** the application of molecular marker to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Jornal of Fish Biology*. 47(SupplementA)103-126.
- **McLean, J.E., Seamons, T.R., Daur, M.B., Bentzen, P., Quinn, T.P., 2008.** Variation in reproductive success and effective number of breeders in a hatchery population of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*): examination by microsatellite-based parentage analysis. *Conserv Genet* 9,295-304
- **McQuown EC, Sloss BL, Sheehan RJ, Rodzen J, Tranah G, and May B, 2000.** Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Trans Am Fish Soc* 129:1380–1388
- **McRory, J.A., Parker, D.B., Ngamvongchon, S., Sherwood, N.M. 1995.** Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol.Cel. Endoc.*, 108: 169-177.
- **Megnégneau, B. ; Debets, f. and Hoekstra, R.R., 1993.** Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplified poly morphic DNA.. *Curr. Genet.*, 23,323- 329.
- **Miggiano, E., De Innocentiis, S., Ungaro, A., 2005.** AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapes: data from a simulated floating cage breaking event. *Aquaculture International* 13: 137–146
- **Mitrofanov, V. P. ; Dukravets, G. M. and Peseridi, N. E., 1986.** The Fishes of Kazakhstan (Nauka, Alma-Ata, 1986) [in Russian].
- **Moghim, M., Kor, D., Tavakolieshkalak, M., Khoshghalb, M. B. 2006.** Stock status of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) along the Iranian coast of the Caspian Sea. *J. Appl. Ichthyl*, 22 (1): 99-107.
- **Moriyama, S., Oda, M., Takahashi, A., Sower, S.A., Kawachi, H. 2006.** Genomic structure of the sea lamprey growth hormone-encoding gene. *Gen.Comp. Endoc.*, 148: 33–40.
- **Mugue, N. S. Barmintseva, A. E. Rastorguev, S. M. Mugue, V. N. and Barmintsev V. A. 2008.** Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region in Eight Sturgeon Species and Development of a System for DNA-Based Species Identification. *Russian Journal of Genetics*, 2008, Vol. 44, No. 7, pp. 793–798.
- **Munkres, K.P., Bay, L.K., Jerry, D.R., McCormick, M.I., Herwerden, L.V., 2007.** Development and characterization of microsatellite markers for parentage analyses of the coral reef damselfish (*Pomacentrus amboinensis*: Pomacentridae). *Conserv Genet* 8, 987-990
- **Murray, B. W., McGillivray, W. B., Barlow, J. C., Beech, R. N., Sstrobeck, C., 1994.** The use of cytochrome b sequences variation in stimation of phylogeny in the vireonidae. *The Condor* 96:1037-1054
- **Naish, K.A. ; Leamon, J.P. and Skibinski, D., 1995.** Construction of genetic Linkage map of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* (tilapia) using RAPD marker. In : *Molecular Biology in Fish. Fisheries and Aquaculture. An international symposium.* Plymouth U.K.

- **Nam, B., Moon, J.Y., Kim, Y.O., Kong, H.J., Kim, W.J., Kim, K.K., Lee, S.J. 2011.** Molecular and functional analyses of growth hormone-releasing hormone (GHRH) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol, Part B*, 159: 84-91.
- **Nauta, M.J. and F.J. Weissing. 1996.** Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics* 143:1021-1032
- **Nei, M. (1972).** Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292
- **Nei, M., and S. Kumar 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford
- **Nelson, j.m. 1994.** *Fishes of the World 3 Edition*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- **Newoton, C. Graham . A., 2001 .** PCR essential data . ISBN 964 -6582 40-0.
- **Nicoll, C.S., Steiny, S.S., King, D.S. 1987.** The primary structure of coho salmon growth hormone and its cDNA. *Gen Comp Endocrinol*, 68: 387-99.
- **Nielsen. J., Fountain. M. C., Wright J. M. 1997.** Biogeographic Analysis of Pacific Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in California and Mexico Based on Mitochondrial DNA and Nuclear Microsatellites (*Molecular Systematics of Fishes*). Academic Press
- **O'Connell, M., Wright, J.M., 1997.** Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331±363
- **Oakley, T.H., Phillips, R.B. 1999.** Phylogeny of salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa. *Mol. Phylo. Evol.* 11(3):381-93.
- **Ogden R. 2011.** SturSNiP: Discovery and Characterisation of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markers for Sturgeon Product Traceability. Tender No. IPSC/2009/04/01/NC: Final report, European Commission Joint Research Centre. Institute for the Protection and Security of the Citizen. 46 pages.
- **Olivares. A. R. and Cha ´vez-Gonza ´lez. J. P. 2008.** Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol Res* DOI 10.1007/s10228-008-0040-7
- **O'Reilly, P. and Wright, J.M. 1995.** The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.* 47 (Suppl. A), 29±55
- **Paladini, A.C., Pena, C., Poskus, E. 1983.** Molecular biology of growth hormone. *Biochemistry*, 15:25-26.
- **Peng, Z. He, S and Zhang, Y. 2004.** Phylogenetic relationships of glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 979–987
- **Peng, Z. Ludwig, A. Wang, D. Diogo, R. Wei, Q and He S. 2007.** Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 854–862.
- **Perdices, A., Sayanda, D., Coelho, M.M. 2005.** Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 920-927
- **Perry, G.M.L., McDonald, G.j., Ferguson, M.M., Ganassin, R.C., Bols, N.C., 2001.** Characterization of rainbow trout cell lines using microsatellite DNA profiling. *Cytotechnology* 37, 143-151
- **Petren, K., Grant, B.R. & Grant, P.R. 1999.** A phylogeny of Darwin's finches based on microsatellite DNA length variation. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 266: 321-329
- **Peyush, P., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H. 2000.** Molecular Cloning of Growth Hormone Complementary DNA in Barfin Flounder (*Verasper moseri*). *Marine Biotechnology*, 2(1): 21-26.
- **Pikitch, E.K., Doukakis, P., Lauck, L., Chakrabarty, P., Erickson, D.L. 2005.** Status, trends and management of sturgeon and paddlefish Fisheries. *Fish. fisheri*, 6: 233–265.
- **Ping, S., Chang, H.Y., Zhu, X. 2002.** Clone and sequence of full length cDNA in *Silurus meridionalis* growth hormone. *Shui. Sheng. Hsueh. bao*, 3: 272-280.
- **Pinheiro, J.S., Wolff, J.L.S., Araújo, R.C., Hilsdorf, A.W.S. 2008.** Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of Neotropical freshwater fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Gen. Molec. Biol.* 31(1): 381-384.
- **Postlethwait, J.H. ; Johnson, S.L. ; Midson, C.N. ; Talbot, w.s. ; Gates, M. ; Ballinger, E.W. ; Africa, D. ; Andrews, R. ; Carl, T. ; Eisen, J.S. ; Horne, S. and Kimmel, C.B., 1994.** A Genetic map for the Zebra fish . *Science*. 264.699-703.

- Postlethwait, J.H. ; Johnson, S.L. ; Midson, C.N. ; Talbot, w.s. ; Gates, M. ; Ballinger, E.W. ; Africa, D. ; Andrews, R. ; Carl, T. ; Eisen, J.S. ; Horne, S. and Kimmel, C.B., 1994. A Genetic map for the Zebra fish . Science. 264:699-703.
- Pourkazemi, M. 1996. Molecular And Biochemical Genetic Analysis Of Sturgeon Stocks From The South Caspian Sea. PhD thesis. University of wales. Swansea, UK.
- Pourkazemi, M. 2006. Caspian Sea sturgeon Conservation and Fisheries: Past present and Future. *J. Appl. Ichthyol*, 22(1): 12-16.
- Pourkazemi, M. Skibinski, D. O. F. and J. A. Beardmore. 2000. A preliminary study on phylogenetic relationship between five sturgeon species in the Iranian coastline of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Service. 2(1), 1-12.
- Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F., and Beardmore, J.A. 1999. Application of mtDNA dloop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *J. Appl. Ichthyol*, 15: 23-28.
- Putilina L.A. and E.N. Artyukhin. 1985. Some features of Persian sturgeon migration in the lower Volga river. Ibid. P. 32-34.
- Putilina, L. A., 1983a. "Morphological Characteristics of the Persian Sturgeon from the Volga River," in Integrated Use of Biological Resources of the Caspian and Azov Seas (Moscow, 1983a), pp. 70-71.
- Rafalski, j.A. and Tinger, S.V., 1993. Genetic diagnostics plant breeding: RAPDs , Microsatellites and machines . Trends in Genetics , 9 , pp . 27- 279.
- Rajesh, R., Majumdar, K.C. 2007. A comparative account of the structure of the growth hormone encoding gene and genetic interrelationship in six species of the genus Labeo. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 311-333.
- Rastorguev, S. Mugue, N. Volkov A. and Barmintsev V. 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1), 46-49.
- Rastorguev, S. Mugue, N. Volkov A. and Barmintsev V. 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1), 46-49.
- Ravelo, C. ; Magarinos, S. and Toranzo, A.E., 2002. Molecular fingerprinting of fish pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis . *Journal of clinical microbiology*, 751-756.
- Rehbein, H, Molkentin, J. Schubring, R. Lieckfeldt, D. and Ludwig, A. 2008. Development of advanced analytical tools to determine the origin of caviar. *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1), 65-70.
- Rentier-Delrue, F., Swennen, D., Philippart, J.C., L'hoir, C., Lion, M., Benrubi, O., Martial, J.A. 1989. Tilapia Growth Hormone: Molecular Cloning of cDNA and Expression in Escherichia coli. *Mar. Ann. Lieb*, 8(4): 271-278.
- Rezvani Gilkolaei, S. 1997. Molecular Population Genetic Studies Of Sturgeon Species In The South Caspian Sea. PhD thesis. University of wales. Swansea, UK.
- Rezvani Gilkolaei, S. 2002. DNA PCR Amplification for species Diagnosis of Caviar from Caspian Sea Sturgeon. *J. Agric. Sci. Technol.* Vol. 4: 51-61.
- Richard. M, and Thorpe. R.S. 2001. Can Microsatellites Be Used to Infer Phylogenies? Evidence from Population Affinities of the Western Canary Island Lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 20, No. 3, September, pp. 351-360
- Rico, C., Rico, I., Hewitt, G., 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 263, 549-557
- Robles F, de la Herr Jn R, Ludwig A, Ruiz Rejn C, Ruiz Rejn M, Garrido-Ramos MA. 2005. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome* 48:18-28
- Ruban, G. I. Kholodova, M. V. Kalmykov and V. A. Sorokin P. A. 2008. Morphological and Molecular Genetic Study of the Persian Sturgeon *Acipenser persicus* Borodin (Acipenseridae) Taxonomic Status. *Journal of Ichthyology*, 2008, Vol. 48, No. 10, pp. 891-903.
- Ruban, G. I. Kholodova, M. V. Kalmykov and V. A. Sorokin P. A. 2011. A review of the taxonomic status of the Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin). *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, Vol. 27, NO. 2, PP. 470-476.
- Ruban, G. I., Khodorevskaya, R. P. 2011. Caspian Sea sturgeon fishery: a historic overview. *J. Appl. Ichthyol*, 27: 199-208.
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Cook, D. and Goddard, S. 1996. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) off Newfoundland: microsatellite DNA variation and anti-freeze level. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 634±645
- Saito, A., Sekine, S., Komatsu, Y., Sato, M., Hiranob, T., Itoh, s. 1988. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in escherichia coli. *Gene*, 73: 545-551.

- Sakamoto, T., Danzmann, R., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S.K., Woram, R., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Holm, L.E., Guyomard, R., Hoyheim, B., 2000. A Microsatellite Linkage Map of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. *Genetics* 155: 1331–1345
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samy, Y.E. Mohamed M, MA., 2006. Genetic Differentiation Between sex Reve rsal and Normal of full sib Nille tilapia , (*Oreochromis niloticus*) Based on DNA Finger printing Research journal of fisheries and Hydrobiology 1 (1): 1-5.
- Samy, Y.E. Mohamed M, MA., 2006. Genetic Differentiation Between sex Reve rsal and Normal of full sib Nille tilapia , (*Oreochromis niloticus*) Based on DNA Finger printing Research journal of fisheries and Hydrobiology 1 (1): 1-5.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Sarmasik. A., Arik. F., ALTUN. T. 2008. Mitochondrial DNA Sequence and Body Size Variations in Turkish Sardine (*Sardina pilchardus*) Stocks. *Turk J Zool* 32: 229-237
- Sciara , A.A., Rubiolo, J.A., Somoza , G.M., Arranz, S.E. 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol*, 142: 284–292.
- Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, T., Saito, A., Sato, M., Itoh, S., Kawachif, H. 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Appl. Biol*, 82: 4306-4310.
- Sekino, m., Saitoh, K., Aritaki, M., 2008. Microsatellite markers for a rare species of right-eye flounder *Verasper 230ariegates* (Pleuronectiformes, Pleuronectidae). *Conserv Genet* 9, 761-765.
- Sewertzoff, A.N. 1925. The place of the cartilaginous ganoids in the system and the evolution of the Osteichthyes. *J. Morphol.* 38: 105–155
- Shorygin, A.A., 1952. Pitanie pishchevoi heniya ryb kaspiskogo moray pishchehepromizdat. *Stan. Meth. Water. WWater*.
- Sick, K. 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature, Lond.* 192, 894±896
- Siemon H.S. Ng, Carlo G. Artieri, Ian E. Bosdet, Readman Chiu, Roy G. Danzmann, William S. Davidson, Moira M. Ferguson, Christopher D. Fjell, Bjorn Hoyheim, Steven J.M. Jones, Pieter J. de Jong, Ben F. Koop, Martin I. Krzywinski, Krzysztof Lubieniecki, Marco A. Marra, Leslie A. Mitchell, Carrie Mathewson, Kazutoyo Osoegawa, Sarah E. Parisotto, Ruth B. Phillips, Matthew L. Risef, , Kristian R. von Schalburg, Jacqueline E. Schein, Heesun Shin, Asim Siddiqui, Jim Thorsen, Natasja Wye, George Yang, Baoli Zhu. A physical map of the genome of Atlantic salmon, (*Salmo salar*). 2005. *Genomics* 86: 396 – 404.
- Sim, M.C. ; Lim, P.E. ; Can, S.y. and Phang, S.M., 2007. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) Marker for differentiating male from female and sporophytic thalli of *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *J Appl phycol*, 19:763-769.
- Slechtova. V., Bohlen. J., Perdices. A. 2008. Molecular phylogeny of the freshwater fish family Cobitidae (Cypriniformes: Teleostei): Delimitation of genera, mitochondrial introgression and evolution of sexual dimorphism. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47 812–831
- Smith, C. T. Nelson, R. J. Pollard, S. Rubidge, E. McKay, S. J. Rodzen, J. May B. and B. Koop 2002. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 307–312
- Smith, H.O. and Wilox, K.W. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*.]. *Mol. Biol.* 51:379-391. One of the first full description of a restriction endonuclease.
- Somorjai, I. M. L., R. G. Danzmann and M. M. Ferguson. 2003. Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics* 165: 1443–1456
- Stearns ,C.S. & Hiekstra, R.F. 2000. *Evolution an introduction*. Oxford press
- Steel, M., Penny, D. 2000. Parsimony, Likelihood, and the Role of Models in Molecular Phylogenetics. *Molecul. Biol. Evol*, 17(6):839–850.
- Streelman, J.T., R. Zardoya, A. Meyer, and S.A. Karl. 1998. Multilocus phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes): Evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Molecular Biology and Evolution* 15:798-808

- **Sugiyama, A., Noguchi, K., Kitanaka, C. 1999.** Molecular cloning and chromosomal mapping of mouse intronless myc gene acting as a potent apoptosis inducer. *Gene*, 226(2): 273–283.
- **Sultmann, H. ; Mayer, W.E. ; Figueroa, F. Tichy, H., and Klein, J., 1995.** Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA marker. *Mol. Biol. Evol.*, 12 , 1033-1047.
- **Sun, B., Chang, M., Chen, D., Nie, P., 2006.** Gene structure and transcription of IRF-2 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with the finding of alternative transcripts and microsatellite in the coding region. *Immunogenetics* 58, 774-484
- **Sun, X. Liang, L, 2003.** A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture* ,238, 165-172.
- **Tagliavini J, Conterio F, Gandolfi G, Fontana F. 1999.** Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae. *J Appl Ichthyol* 15:17–22.
- **Takezaki, N., and M. Nei. 2008.** Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics*. 178:384-392
- **Tamura, K. Dudley, J. M. Nei and Kumar, S. 2008.** *Molecular Evolutionary Genetics. Analysis.* Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute Arizona State University
- **Tanaka, M., Toma, Y., Ohkubo, T., Sudo, S., Nakashima, K. 1995.** Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone encoding gene and its promoter region. *Gene*, 165: 321-322.
- **Taylor, E.B., Tamke, P., Sterling, G., Hughson, W., 2007.** Microsatellite DNA analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from western Alberta, Canada: native status and evolutionary distinctiveness of “Athabasca” rainbow trout. *Conserv Genet* 8, 1-15
- **Teletchea, F. Laudet, V. and Hanni C. 2006.** Phylogeny of the Gadidae (sensu Svetovidov, 1948) based on their morphology and two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 189–199
- **Timm, J. Figiel, M. Kochzius, M. 2008.** Contrasting patterns in species boundaries and evolution of anemonefishes (Amphiprioninae, Pomacentridae) in the centre of marine biodiversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 268–276
- **Torotnes, E. 1989.** *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836. In: *The Freshwater Fishes of Europe. Vol.1. pt. 11. General Introduction to Fishes. Acipenseriformes* (ed. Holcik J). pp. 285-293. AULA-Verlag. Wiesbaden, Germany).
- **Van Eenennaam, A. L., J. D. Murray and J. F. Medrano, 1998a.** Mitotic analysis of the North American white sturgeon, (*Acipenser transmontanus*) Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. *Genome* 41: 266–271.
- **Vasil’ev VP. 1985.** *Evolution Karyology of Fishes.* Nauka, Moscow, 300 pp (in Russian).
- **Vasil’eva, E. D. 1999.** Some Morphological Characteristics of Acipenserid Fishes: Considerations of Their Variability and Utility in Taxonomy, *J. Appl. Ichthyol.* 15, 32–34
- **Vasil’eva, E. D. 2009.** Morphological and Morphometric Characters in Sturgeon Taxonomy and Phylogeny. Chapter 3 of *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*, Editors :Ramon Carmona. Alberto Domezain Manuel Garcia-Gallego. José Antonio Hernando Fernando Rodriguez. Manuel Ruiz-Rejn.
- **Vasil’eva, E.D., Vasil’ev, V.P., Shedko, S.V. 2009.** Revising the recent evolutionary history of equids using ancient DNA. *PNAS*, 106(51): 21754–21759.
- **Vaz, B.S., Cerqueira, G.M., Silva, J.C., Manzke, V.H.B., Moreira, C.G.A., Moreira, H.L.M. 2010.** Sequence analysis of the growth hormone gene of the South American catfish *Rhamdia quelen*. *Gen. Mol. Res.* 9(4): 2184-2190.
- **Vecsei, P. 2001.** Threatened fishes of the world: *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzenburg, 1833 (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes* 60: 362, 2001
- **Vecseia, P. and Artyukhinb, E. 2001.** Threatened fishes of the world: *Acipenser persicus* Borodin, 1897 (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes* 61: 160, 2001
- **Venter, J. C. 2001.** The sequence of the human genome. *Science*, 292(5507): 1304–1351.
- **Venugopala, T., Anathya, V., Pandiana, T.J. Gongb, G.Z., Mathavan, S. 2002.** Molecular Cloning of Growth Hormone-Encoding cDNA of an Indian Major Carp, *Labeo rohita*, and Its Expression in *Escherichia coli* and Zebrafish. *Gen. Comp. Endoc.* 125(2): 236–247.
- **Vlasenko AD, Pavlov AV, Sokolov LI, Vasil’ev VP. 1989a.** *Acipenser gueldenstaedti* Brandt, 1833. In: Holcik J (ed.), *The Freshwater Fishes of Europe*, vol. 1 (Pt. 2). AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 294–344
- **Vlasenko AD, Pavlov AV, Vasil’ev VP. 1989b.** *Acipenser persicus* Borodin, 1897. In: Holcik J (ed.), *The Freshwater Fishes of Europe*, vol. 1 (Pt. 2). AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 345–366.
- **Vlasenko, A.D., Kornienko, I.V., Voinova. 1989.** *The Fresh Water Fishes Of Europe. General Introduction to Fishes. Aul. Ver. Wies*, 345- 366.
- **Ward, R.D. and Grewe, P. 1994.** Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 300±325

- **Welsh, J. Mc Clelland, M., 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers . *Nucleic Acids Research* , 18 : 7213-7218.
- **Welsh. A. B., Blumberg. M. and May. B. 2003.** Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* .*Molecular Ecology Notes*.
- **Williams, D.J., Kazianis, S., Walter, R.B., 1998.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127, 825– 832.
- **Williams, J.G.K. ; Kabelik, A.R. ; Liva, K. J. ; Rafalski, J.A., and Tingey, V., 1990.** DNA polymorphism Amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers . *Nucleic Acid Research* , 18: 6531-6535.
- **Williot, p., Arlati, G., Chebanov, M., Gulyas, T., Kasimov, R., Kirschbaum, F., Patriche, N., Pavlovskaya, L.P., Poliakova, L., Pourkazemi, M., Kim, Y., Zhuang, P., Zholdasova, I.M. 2002.** Status and Management of Eurasian Sturgeon: An Overview. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 87: 483–506.
- **Wilson, I. J., and D. J. Balding,** 1998 Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* 150: 499–510
- **Wilting, A., Buckley-Beason. V., Feldhaar. H., Gadau. J., O'Brien. S. J. and Linsenmair. K. E. 2007.** Clouded leopard phylogeny revisited: support for species recognition and population division between Borneo and Sumatra. *Frontiers in Zoology*:4:15
- **Wirth M, Kirschbaum F, Gessner J et al. 2002.** Fatty acid composition in sturgeon caviar from different species: Comparing wild and farmed origins. *Int. Rev. Hydrobiol.* 87(5–6): 629–636.
- **Wright, J.M. 1993.** DNA Fingerprinting in Fishes. In Hochachka, P.W. and Mommsen, T., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2. Amsterdam: Elsevier, pp. 58±91
- **Wright, J.M. and Bentzen, P. 1994.** Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 4, 384±388
- **Wurtz, S., 2006.** Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker . *Aquaculture* 258 : 685- 688.
- **Xu, B. Moriyama, S. Zhang, P.J. Miao, H.Z. 2001.** The complete amino acid sequence of growth hormone and partial amino acid sequence of prolactin and somatolactin from sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 201: 117- 136.
- **Xue, L., Qian, K., Qian, H., Li, L., Li, M., 2006.** Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Mol Biol Rep* 33:129–136
- **Yasuda A, Yamaguchi K, Noso T, et al. 1992.** The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1120: 297-304.
- **Yom Din, S., Hurvitz, A., Goldberg, D., Jackson K., Levavi-Sivan, B., Degani, G. 2008.** Cloning of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) growth hormone and insulin-like growth factor I and their expression in male and female fish during the first period of growth. *J. Endocrinol. Invest*, 31: 201-210.
- **Yuri P. Kartavtsev , Sang-Oun Jung, Young-Mi Lee, Hwa-Kun Byeon, Jae-Seong Lee, 2007.** Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cyt b and 16S rRNA genes. *Gene* 396: 13–27
- **Zang, W. Wang, J. and Diny, S., 2001.** Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) analysis of two *Neobenedenia* species from cultured marine fishes . pp . 519-523.
- **Zardoya, R., Vollmer, D. M Craddock, C. Streelman, J., Karl, T.S and A. Meyer. 1996.** Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 263:1589–1598.
- **Zhang, S., Zhang, Y., Zhang, X., Chen, Y., Deng, H., Wang, D., Wei, Q., Zhang, Y., Nie, L and Wu, Q. 2008.** Molecular phylogenetic systematics of twelve species of *Acipenseriformes* based on mtDNA *ND4L-ND4* gene sequence analysis. *Science in china (Series C)* 43, 129-138.
- **Zhivotovsky. L and Feldmant. M.W. (1995).** Microsatellite variability and genetic distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 11549-11552
- **Zhu, Q.S., Grimsby, J., Chen, K., Shih, J.C. 1992.** Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J. Neurosci.*, 12: 14437-4446.
- **Zohar, Y. 1989.** Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth, and smoltification. *Fish. Physiol. Biochem.*, 7: 395-405.
- **Zolotarev, P.N., 1995.** Структура біотеснозів бенталі severo zapadnoi chasti chernogo moryaіeє transformatsiya pod vozde istvein antropogennyka faktorov, aftorect. *Cand. Sc. Dissertation*, Sevastopol. Institute of of biology of black sea, Ukraina Academy of sciences.

Abstract:

The Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) is more abundant sturgeon species in the South Caspian Sea and consist the highest proportion of Iranian Caviar, meat as well as bringing maximum foreign currency income, however from systematic point of view and differentiation of this species from Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadtii*) a serious challenging issues remain, where some Russian scientist are believe that the Persian sturgeon is not as a valid species and consider it as a subspecies of Russian sturgeon.

This research conducted with the objective of identification and introducing a molecular marker based on specific DNA for differentiation of two species of Persian sturgeon and Russian sturgeon via a proved molecular marker method. For this purposes 8 different molecular approaches such: Microsatellite, AFLP, RAPD, sequencing of Cytb, 16sDNA, ND5, Growth Hormone gene and finally Single Nucleotide Polymorphism (SNP) were investigated.

Based on applied methodology, between 5 to 16 caudal fin tissues were sampled for each species from different region of the Caspian Sea, Sefiedrud River, Ural and Volga rivers. Following DNA extraction, its quality and quantity were determined and the PCR experiment has been conducted using 5-110 primers according to various methods and type of gene.

The PCR products were electrophoresed on Polyacrilamid or agarose gels and followed by silver and Ethidium Bromide staining. In RAPD method, polymorphic DNA band was cut on the gel followed by purification and then the segments were cloned in vector in Top10 strain of E.coli, and then sequenced. Meanwhile for Growth Hormone gene in Persian and Russian sturgeon the MEGA 4, Gene runner software were used to design the appropriate primers for PCR amplification. The PCR products were cloned in PTZ57R/T vector and transformed in Top10 E.coli strain and sequenced finally. For all other genes, similar methods were applied for PCR amplification and its products were sequenced and statistical analysis as well as phylogenetical tree was performed. In Single Nucleotide Polymorphism (SNP) method, after genomic library construction, in total 14.4 billion nucleotides were sequenced and similarity/ differentiation analysis of two species were investigated using specific bioinformatic software.

Results indicated that Microsatellite and AFLP methods showed high level of genetic variation both within and between species. The Cytb gene, when 4 sample sequences from each species were compared two species were differentiated, however when analysis repeated over 15 samples, the sequence comparison couldn't differentiate two above mentioned species. Full sequence comparison of 16sDNA and mtDNA-ND5 gene showed variation in some nucleotide in both species of Persian and Russian sturgeon but no significant. Results of sequences obtained from cloned segment with RAPD method and also specific primer design based on produced sequences could succeed to discover a variable DNA band that able to differentiate two species from each other.

Results of the present study also showed that the growth hormone gene (GH) of Persian and Russian sturgeon consists of 645 nucleotide that translate to 214 Amino Acids. The sequence comparison indicated that the gene coding growth hormone in Persian and Russian sturgeon had the highest similarity with GH of Mammals (71%), Anguilaformes (63%) and less similarity with bony fish (37%). Phylogenetic analysis indicates that Persian and Russian sturgeon in compare to other organism are ancient species and this gene is originated from a common ancestor.

At present study the most appropriate results obtained from Single Nucleotide Polymorphism (SNP) method by sequencing 14.4 billion nucleotide from genome of two species of Persian and Russian sturgeon from North and the South Caspian Sea could prove that the Persian sturgeon is a valid and independent specie. This excellent results is the biggest scientific achievement for differentiation of two highly commercial important sturgeon species in the Caspian Sea in last two decades.

Keywords: Persian sturgeon, Russian sturgeon, Species differentiation, Molecular Marker., SNP Caspian Sea.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon
Research Institute**

**Project Title : Identification of genetic marker for differentiation of Persian Sturgeon
(*Acipenser persicus*) from Russian Sturgeon (*A.gueldenstadtii*)**

Approved Number: 2-86-12-89004

Author: Mohammad Pourkazemi

Project Researcher : Mohammad Pourkazemi

Collaborator(s) : Azizzadeh . L, Yarmohammadi .M, Hassanzadeh Saber.M

Advisor(s): -

Supervisor: S.Rezvani

Location of execution : Guilan province

Date of Beginning : 2010

Period of execution : 2 Years & 9 Months

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Date of publishing : 2015

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted
without indicating the Original Reference**

**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION**

Project Title :

**Identification of genetic marker for differentiation of
Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) from Russian
Sturgeon (*A. gueldeustadtti*)**

Project Researcher :

Mohammad Pourkazemi

Register NO.

44921