

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

عنوان :

مطالعه ژنتیک جمعیت گونه شبه شوریده
خلیج فارس و دریای عمان به روشهای مولکولی

مجری :

سهراب رضوانی گیل کلانی

شماره ثبت

۴۸۲۳۲

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان پروژه : مطالعه ژنتیک جمعیت گونه شبه شوریده خلیج فارس و دریای عمان به روشهای مولکولی
شماره مصوب پروژه: ۹۱۱۴۷-۱۲-۱۲-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سهراب رضوانی گیل کلانی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سهراب رضوانی گیل کلانی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : تورج ولی نسب، فرامرز لالوئی، سید جواد تقوی، نصیر نیامیمندی، علی
سالارپوری، رضا نوری دفزاری، علی سیستانی، حمزه پورغلام، سید هاشم حسینی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : اصغر مجاهدی
محل اجرا : استان هرمزگان
تاریخ شروع : ۹۱/۱۰/۱
مدت اجرا : ۱ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
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 مسؤل / مجری»

پروژه : مطالعه ژنتیک جمعیت گونه شبه شوریده خلیج فارس و

دریای عمان به روشهای مولکولی

کد مصوب : ۱۴-۱۲-۱۲-۹۱۱۴۷

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۲۳۲ تاریخ : ۹۴/۹/۱

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای سهراب رضوانی گیل کلائی دارای

مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته ژنتیک مولکولی

می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان

در تاریخ ۹۴/۶/۱ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

مشغول بوده است.

عنوان	صفحه
چکیده	۱
۱- کلیات	۲
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- معرفی دریای عمان	۴
۱-۳- معرفی راسته سوف ماهیان	۶
۱-۴- ویژگی ها و رده بندی شبه شوریده دهان سیاه	۷
۱-۵- تعاریف و اصطلاحات	۱۰
۱-۶- واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR	۱۳
۱-۷- تنوع ژنتیکی	۱۸
۱-۸- ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرها	۲۱
۱-۹- نشانگرها	۲۱
۱-۱۰- نشانگر های DNA	۲۲
۱-۱۱- توالی یابی	۲۳
۱-۱۲- اساس کار الکتروفورز	۲۵
۱-۱۳- رنگ های ردیاب	۲۶
۱-۱۴- DNA میتوکندریایی	۲۶
۱-۱۵- مزیت استفاده از mt DNA	۲۸
۲- پیشینه تحقیق	۲۹
۳- مواد و روش ها	۳۳
۳-۱- نمونه برداری	۳۳
۳-۲- استخراج DNA به روش استات آمونیوم	۳۳
۳-۳- ارزیابی کیفیت DNA به روش الکتروفورز ژل آگارز	۳۶
۳-۴- ارزیابی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری	۳۸
۳-۵- طراحی پرایمر	۳۸
۳-۶- واکنش زنجیره ای پلیمرز	۳۹
۳-۷- بهینه کردن PCR و پروفیل های حرارتی آن	۳۹

صفحه	عنوان
۴۰	۳-۸- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز.....
۴۲	۴- نتایج.....
۴۲	۴-۱- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده.....
۴۲	۴-۲- بررسی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز.....
۴۳	۴-۳- بررسی تنوع ژنتیکی.....
۴۵	۴-۴- ترکیب نوکلئوتیدی.....
۴۵	۴-۵- بررسی داده های ژنتیکی جفت نواحی.....
۴۷	۵- بحث.....
۵۵	۶- نتیجه گیری.....
۵۶	پیشنهادها.....
۵۷	منابع.....
۶۷	پیوست.....
۷۱	چکیده انگلیسی.....

چکیده

تنوع ژنتیکی را می توان به عنوان یک عامل اساسی در جهت جلوگیری از انقراض موجودات و حفاظت از تنوع زیستی معرفی نمود، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شبه شوریده دهان سیاه (*Atrubucca nibe*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از روش توالی یابی ژن D-Loop تعداد ۵۴ نمونه از بافت نرم باله از نواحی جاسک، فجیره و چابهار جدا و در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد. DNA با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج گردیده و کمیت و کیفیت آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه DNA های مطلوب، PCR و توالی یابی شدند. توالی ناحیه D-Loop شامل ۲۷۰ جفت بازبود. فاصله ی ژنتیکی مشاهده شده بین نواحی مورد مطالعه ۰/۰۶ بود. میزان هتروزیگوسیتی برآورد شده بیشتر از میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شد، همچنین میزان پائینی از هتروزیگوسیتی مشاهده شده بدست آمد، که می تواند بیان کننده کاهش تنوع ژنتیکی مناطق مذکور باشد. میزان Fst بین مناطق مورد مطالعه میانه (۰/۱) تخمین زده شد که این امر بیان کننده ی تمایز بین جمعیت های موجود می باشد. طبق نتایج حاصل از این بررسی در نواحی مورد بررسی با وجود جریان ژنی مطلوب سه جمعیت متفاوت از شبه شوریده دهان سیاه وجود دارد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، شبه شوریده دهان سیاه، دریای عمان، خلیج فارس، D-Loop، mtDNA
اختلاف ژنتیکی، فاصله ژنتیکی

۱- کلیات

۱-۱- مقدمه

جمعیت‌ها دارای مجموعه متنوعی از ژن‌ها می‌باشند. عوامل متعددی مانند از بین رفتن زیستگاه‌ها، صید بی‌رویه و شرایط نامناسب آب و هوایی منجر به کاهش اندازه جمعیت‌های موثر و در نتیجه سبب کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می‌گردد (خالدی، ۱۳۹۰). اکثر گونه‌های آبزیان دارای بیش از یک ذخیره می‌باشند (محمدیان و همکاران، ۱۳۸۹). تنوع ژنتیکی یک عامل اساسی در جهت مقابله با تغییرات محیطی در جمعیت‌ها بوده و در واقع مهمترین عامل جهت جلوگیری از انقراض موجودات و حفاظت از تنوع زیستی می‌باشد (روشنی، ۱۳۸۷). بدین منظور گسترش برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر آبزیان هنگامی سودمند واقع می‌شود که در ابتدا تنوع ژنتیکی جمعیتها بررسی شده باشد (Line et al., 2002). مدیریت‌های صورت گرفته در امور شیلاتی باید از طریق برداشت پایدار از ذخایر کمک شایسته‌ای به حفظ ذخایر و تنوع ژنتیکی جمعیتها بکنند، و لذا یکی از اصول مهم میریت شیلاتی شناسایی ذخایر آبزیان می‌باشد (WaldMan et al., 1999). تشخیص زیر گونه‌ها و بررسی ساختار جمعیتی در آبزیان توسط روش‌های مختلفی انجام گیرد (خالدی، ۱۳۹۰). یکی از روش‌های بکارگیری صفات مرفومتريک و مرستیک مانند تعداد فلس روی خط جانبی و طول بدن می‌باشد؛ اما با توجه به حساسیت صفات مرفومتريک و مرستیک به تغییرات محیطی و نیز اثرات منفی ناشی از دستکاری در هنگام نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان (Adams and Hutchings, 2003) با پیشرفت علم، استفاده از نشانگرهای مولکولی که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشند جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران قرار گرفت. در حال حاضر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌ها، نشانگرهای DNA با اعتمادترین ابزار می‌باشند (خالدی - ۱۳۹۰) اما مواد ژنتیکی در معرض جهش‌ها و تغییرات دائمی قرار دارند زیرا عوامل گوناگون فیزیکی و شیمیایی موجود در محیط درون و برون سلولی سبب جابجائی ترتیب نوکلئوتیدهای DNA در هنگام همانند سازی شده و بنابراین در گونه‌های جانوری و گیاهی جمعیت‌ها و نژادهای متفاوتی ایجاد می‌گردند که شناسایی آنها از روی صفات ظاهری امکان پذیر نیست. این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌شوند، چند شکلی ژنتیکی^۱ نام دارند. (قریب‌خانی، ۱۳۸۹).

DNA میتوکندریایی در حقیقت نشانگری ژنتیکی است که کاربرد گسترده‌ای در مطالعات ژنتیکی دارد (Hynes et al., 1996). مطالعات صورت گرفته بر روی DNA میتوکندریایی در واقع روشی حساس و سنجیده می‌باشد که از آن جهت نمایان ساختن شباهت ژنتیکی، رده بندی‌های فیلوژنیک و تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های یک گونه می‌توان استفاده نمود (Avisé, 2004؛ Mori tz, et al., 1987). امروزه طبقه بندی و بررسی میزان تنوع در جمعیت‌ها با استفاده از تفاوت توالی‌های DNA، صورت می‌پذیرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

¹Polymorphism

بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه تفاوت های به چشم می خورد که هر چند این تفاوت ها بسیار اندک می باشند ولی می توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی فاصله ژنتیکی و زمان اشتقاق دو گونه از یک سو و بازسازی و مدل سازی تاریخچه تکاملی و رابطه جدی، فرزندى و در نهایت ترسیم درخت فیلوژنی احتمالی آن ها مورد استفاده قرار گیرد (طیب، ۱۳۸۸) ، این تفاوت ها به روشی مستقیم و دقیق توسط توالی قطعه مورد نظر یا غیر مستقیم یعنی توسط نشانگر ها تعیین می گردند (خالدی ۱۳۹۰).

۱-۱-۱- اهمیت و ارزش تحقیق

اولین مرحله تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت های در حال بهره برداری است. این استراتژی در صورتیکه بر پایه روش های دقیق و قابل اطمینان (مانند روش های مولکولی) باشد، میتواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). از آنجاییکه میزان و سمت و سوی جریان ژنی یکی از مهمترین عوامل ایجاد تفاوتها و یا شباهتها در ساختار ژنتیکی گونه ها و به دنبال آن جمعیتها می باشد و از سویی وجود جریان ژنی یکی از دلایل شباهت نسبی ساختار ژنتیکی می باشد، لذا تفاوت های ژنتیکی مابین جمعیتها زمانی رخ می دهد که جریان ژنی موجب جلوگیری از تفاوت های ناشی از انتخاب طبیعی نگردد. از اینرو با استفاده از بررسی و تجزیه و تحلیل DNA میتوکندریایی در ماهی ها می توان پی برد که آیا تفاوت های ژنتیکی بین جمعیت های ایستگاه های نمونه برداری دارای اختلاف معنی داری با هم می باشند یا خیر؟

برخی کاستی های تاکسونومی سنتی بر پایه ریخت شناسی شامل یکسان پنداشتن گونه های ظاهراً شبیه به هم، فقدان خصوصیات ریختی مشترک و قابل مقایسه در میان تاکسون های گوناگون، عدم کارایی کلیدهای شناسایی در مراحل پیش از بلوغ چرخه زندگی، اشتباه گرفتن تنوع درون گونه ای یا دوشکلی جنسی به جای تفاوت گونه ای، نیاز به متخصصان ویژه برای هر گروه از جانداران (آن هم هنگامی که شمار این متخصصان در جهان رو به کاهش است) می باشد (Hebert et al., 2005). تاکسونومی مولکولی تا حد ممکن در پی جبران این کاستی ها است و این عمل را با دو رویکرد دنبال می کند: رویکرد اول، تعریف تاکسون های جدید یا بازآرایی تاکسون های شناخته شده بر پایه اطلاعات مولکولی و دیگری: به کارگیری داده های مولکولی برای نسبت دادن نمونه های جدید به گونه های تعریف شده از سوی تاکسونومیست ها.

در میان تنوع زیستی چشمگیر خلیج فارس و دریای عمان، شناخت ماهی ها می تواند یکی از اولویت های نخست جهت حفاظت از تنوع زیستی مذکور باشد. گشتی در پایگاه داده های مولکولی نشان می دهد که تا کنون اطلاعاتی از این گونه ثبت نشده است و بررسی ژنتیک جمعیت این گونه توجیه اقتصادی و ملی دارد و از آنجاییکه ماهی شبه شوریده از گونه های دارای ارزش اقتصادی می باشد (Talwar and Kacker, 1984)، بررسی

جمعیتی و فیلوژنیک آن در حوزه های مورد مطالعه پیش نیازی جهت انجام فعالیتهای زیست شناسی، اکولوژی، مولکولی در خصوص این ماهی است.

۲-۱-۱-اهداف و فرضیه های تحقیق

مطالعات مولکولی و ژنتیکی روی گونه ها و جمعیت های ابریان در مقایسه با سایر مهره داران در دهه های گذشته محدود بوده است (Meyer, 1993)، اما در سالهای اخیر بهره گیری از روشهای مولکولی به عنوان روشی دقیق و مطمئن در بررسی های فیلوژنیک و جمعیتی ابریان افزایش چشمگیری داشته است (شعبانی و همکاران، ۱۳۸۴)، زیرا آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و ذخایر توارثی بین افراد یک گونه از اهداف ارزشمند اصلاح نژاد ابریان و مدیریت ذخایر است بطوریکه بررسی های ژنتیک جمعیت یا اکولوژی مولکولی ماهیان با ارزش اقتصادی به منظور حفاظت از جمعیت آنها و حفظ صید پایدار بسیار ضروری است (Wang et al., 2007).

لذا تحقیق حاضر در جهت بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی شبه شوریده دهان سیاه صورت گرفته است و با توجه به بررسی های اولیه فرضیه ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی *Atrobuca nibe* بر اساس ژن mtDNA D-Loop در مناطق مورد مطالعه (جاسک، چابهار و فجیره) با هم متفاوت است. مطرح گردید. اهداف مورد نظر در این تحقیق نیز به شرح ذیل می باشد:

- بررسی میزان تنوع ژنتیکی در میان جمعیت های ماهی شبه شوریده در محدوده مناطق مورد مطالعه
- بررسی ساختار جمعیت این گونه با مقایسه ترتیب نوکلئوتیدهای مناطق سه گانه
- بررسی ترتیب نوکلئوتیدهای منطقه کنترل ژنوم mtDNA
- بررسی روابط فیلوژنیک شبه شوریده در مناطق مورد مطالعه
- ارائه اطلاعات راهبردی جهت مدیریت مسئولانه ذخایر گونه مورد مطالعه در راستای نیل به اهداف برداشت پایدار از ذخایر آبریان
- شناسایی زیر گونه های احتمالی ماهی شبه شوریده در مناطق مورد مطالعه
- توالی یابی ژن mtDNA D-Loop در ماهی *Atrobuca nibe* در مناطق مورد مطالعه

۲-۱-معرفی دریای عمان

زمین سیاره آب است، تقریباً ۷۱٪ از سطح زمین را آب های اقیانوسی پوشانده اند. برخلاف تغییرات شدید دمای روزانه در صحرا ها و بیابان ها، اقیانوس ها و دریاها و در مقیاس کوچکتر، دریاچه ها و حتی رودها موجب کنترل و تعدیل میزان تغییرات دمای روزانه می شوند (کرباسی، ۱۳۷۷). همچنین اهمیت دریاها و اقیانوس ها در برخورداری از منابع عظیم معدنی، شیلات، حمل و نقل و تامین انرژی بر همگان آشکار است (لطفی و همکاران، ۱۳۸۹) (شکل ۱-۱).

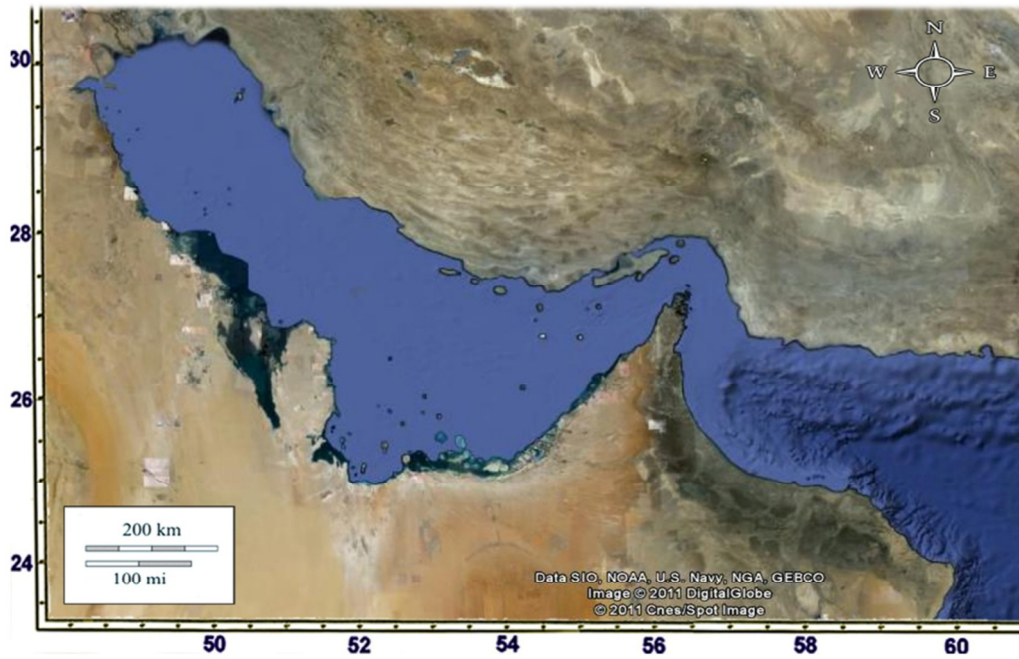
دریای عمان در طول جغرافیایی ۵۶ تا ۶۰ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۲۲ تا ۲۷ درجه شمالی در جنوب ایران در محدوده آب های استان های سیستان و بلوچستان و هرمزگان واقع شده است و از جنوب به اقیانوس هند مرتبط می شود (اصغری و همکاران، ۱۳۸۹). این دریا در منطقه گرمسیری هند - آرام، اکوریجن ۹۱ و پرووانس ۱۹ قرار دارد. این حوضه کوچک اقیانوسی باقیمانده یک اقیانوس وسیع، قدیمی بنام نئوتتیس است که به علت برخورد ورقه عربی به اورازیا کوچک شده است (Uchapi et al., 2002) به طور تقریبی طول آن شرق به غرب ۶۱۰ کیلومتر و عرض آن حدود ۲۲۰ کیلومتر می باشد (جداری عیوضی، ۱۳۵۹) حداکثر عمق این دریا ۳۰۰۰ متر می باشد (Sergey et al., 2012) عمق متوسط آن حدود ۱۷۰۰ متر بوده، و بخش شرقی این دریا عمق بیشتری دارد و شوری آب دریای عمان بطور میانگین ۳۶ PSU می باشد. (سعید پور، ۱۳۸۲). بیشینه و کمینه دمای سطح آب به ترتیب در مرداد ماه، ۳۲ و در دی ماه به حدود ۱۹/۸ درجه سانتیگراد می باشد (Emery, 1959).

دریای عمان در حاشیه شمالی سیستم های جوی گرمسیری قرار دارد بطوریکه این دریا در معرض وزش بادهای موسمی مونسون قرار می گیرد. در فصل تابستان که بادهای موسمی جنوب غربی در دریای عمان حاکم هستند آب به داخل دریای عمان در جهت شمال غربی جریان دارد و یک جریان سطحی از دریای عمان به خلیج فارس دیده می شود. در فصل زمستان که بادهای موسمی شمال شرقی حاکم می شوند آب به خارج دریای عمان جریان می یابد. جزر و مد در دریای عمان از نوع نیم روزه^۱ و از شرق به غرب بیشتر می شود. در بخش شرقی حدود دو متر و در دهانه تنگه هرمز به حدود ۳/۵ متر می رسد. پدیده فراچاهندگی^۲ یکی از پدیده هایی است که در شمال غرب دریای عمان و حوالی جاسک و چابهار به وقوع می پیوندد. (فدوی حسینی و همکاران، ۱۳۷۶). مطالعات اندکی در خصوص طبیعت و ماهیت امواج دریای عمان بعمل آمده است اما با توجه به واقع شدن دریای عمان در شمال اقیانوس هند و حاکم بودن شرایط مانسونی بر رژیم اقلیمی آن ماهیت و علت اصلی ایجاد امواج، عمدتاً ناشی از تاثیر نیروی باد می باشد. شدید ترین بادهای هنگام مانسون تابستانه در منطقه می وزد. در خلال این ایام دریا کاملاً متلاطم و ارتفاع امواج به بیش از ۳ تا ۴ متر می رسد. لذا فعالیت های کشتیرانی (عمدتاً صیادی) مختل و یا متوقف می گردد. یکی از مشخصات دریای عمان در سواحل مکران وجود گرد فشان بسیار است (Grando And Mcclay., 2006). اقیانوس هند و منطقه شمالی آن به عنوان یکی از حاصلخیزترین و بارورترین توده های آبی اقیانوس محسوب شده و ارقام تولید اولیه آن که بستگی کامل به وفور مواد مغذی آب دریا دارد بسیار قابل توجه است. با توجه به میزان تولید اولیه که بطور متوسط حدود ۵۰۰ میلی گرم کربن در متر مکعب در روز است این دریا جزء مناطقی با تولید اولیه بالا محسوب می شود (Duxbury, 1989). چنین تولید اولیه بالایی طبیعتاً حامی غنای فون و فلور منطقه بوده و دارای اثرات مثبتی بر زنجیره حیات دریای عمان می باشد. همچنین در دریای عمان بعلت عدم وجود استرس ناشی از شوری بالا که بعنوان یکی از عوامل اصلی

¹ Semi diurnal

² Upwelling

محدود کننده محیطی برای موجودات خلیج فارس مطرح است محیط دریای عمان جزء مناطق بسیار مناسب جهت رشد و زندگی بشمار رفته و گروه های متعدد و مهم شیلاتی در آنها یافت می شوند که در حال حاضر از بعضی از آنان بهره برداری تجاری صورت پذیرفته و برای تعدادی دیگر نیز پتانسیل و دور نمای مساعدی جهت استحصال وجود دارد.



شکل ۱-۱. نقشه ماهواره ای خلیج فارس و دریای عمان منبع: www.googlemaps.com

۳-۱- معرفی راسته سوف ماهیان^۱

این راسته متنوع ترین ماهیان و بزرگترین راسته مهره داران نیز است و در بین مهره داران دریایی غالب است. راسته سوف ماهیان دارای ۲۰ زیر راسته ، ۶۰ خانواده ، حدود ۱۵۳۹ جنس و ۱۰۰۳۳ گونه می باشد. بزرگترین خانواده های این راسته شامل ۸ خانواده زیر می باشد:

Apogonidae, Pomacentridae, Blenniidae, Labridae, Serranidae, Cichlidae, Gobiidae, Scianidae

اکثر گونه های این راسته ماهیان دریایی ساحلی هستند ، حدود ۲۰۴۰ گونه بطور طبیعی فقط در ابهای شیرین حضور دارند و حدود ۲۳۳۵ گونه از این راسته دست کم جهت گذراندن بخشی از زندگی خود به اب شیرین وارد می شوند (Nelson, 2006).

^۱ Perciformes

۱-۳-۱- معرفی خانواده شوریده ماهیان^۱

شوریده ماهیان در یکی از بزرگترین راسته های مهره داران یعنی راسته سوف ماهیان قرار دارند. بدن آنها تا اندازه ای کشیده تا چهارگوش ، فشرده با خط جانبی کشیده شده تا باله دمی می باشد. دهانه آبششی وسیع بوده و دهان انتهایی می باشد . گروه های دندانهای سوزنی شکل در فکها دیده می شوند که غالباً توام با دندانهای نیش در ردیف های جانبی می باشند ، سر با فلس پوشیده شده است. فلسها نازک ، سیکلوئیدی یا کم و بیش به طور ظریف شانه ای ، چسبنده و محکم می باشند (Blegvad and Leppenthin, 1944).

کل بدن و سر به استثنای نوک پوزه دارای فلس است ، پوزه گرد یا نوک تیز و تا حدی کند می باشد ، دارای یک باله پشتی است که قسمت خار دار این باله بوسیله شکاف عمیق از بخش نرم ان جدا می شود. باله مخرجی ۱ تا ۲ خار دارد. باله شکمی موقعیت سینه ای داشته و دارای ۱ خار و ۵ شعاع می باشد. رنگ این ماهیان بسیار متفاوت بوده و از نقره ای تا قهوه ای تیره یا سیاه متفاوت است. در بعضی از گونه ها رنگ یک دست بوده و بعضی از آنها دارای نقاط و نوارهای تیره می باشند. اجزای داخل بدن از قبیل سنگریزه شنوایی یا اتولیت و همچنین کیسه شنا اغلب دارای اندازه و شکل مخصوص به خود هستند که جهت شناسایی جنس ها و گاهی اوقات گونه های موجود در این خانواده مورد استفاده قرار می گیرند. این ماهیان گوشت عالی داشته و ارزش اقتصادی زیادی دارند (ستاری، ۱۳۸۲). اعضای این خانواده با اندازه کوچک تا متوسط در ابهای ساحلی تا ابهای باز دریاها بر روی فلات قاره زندگی می کنند. بعضی گونه ها به ابهای شیرین اختصاص دارند. این ماهیان ترجیح می دهند نزدیک بستر دریا و غالباً به صورت گروهی شنا کنند. گوشتخوار می باشند و بسیاری از گونه ها به کمک عضلات اطراف کیسه شنا صدای طبل ماندی تولید می کنند (Blegvad and Leppenthin, 1944).

۴-۱- ویژگی ها و رده بندی شبه شوریده دهان سیاه (*Atrobuca nibe*) (Jordan & Thompson, 1911)

- جایگاه ماهی شبه شوریده در رده بندی

جایگاه ماهی شبه شوریده در رده بندی ماهیان به شرح ذیل می باشد (Fishbase, 2012):

- Phylum: Chordata (Bateson, 1885- Chordates)
- Class: Osteichthyes (Huxely, 1880- Boy fishes)
- Order: Perciformes (Perch- like Fishes)
- Family: Scianidae (Drums or Croaker)
- Genus: *Atrobuca*
- Species: *A. nibe*

¹ Scianidae

۱-۴-۱- معرفی گونه شبه شوریده دهان سیاه (*Atrubucca nibe* (Jordan & Thompson, 1911)

- ریخت شناسی

این ماهی دارای بدنی کوچک و نسبتاً مرتفع است. دهان انتهایی بوده و فک بالایی کمی کوچکتر از نصف طول سراسر است. دندانها متفتوت بوده از کوچک تا بزرگ، دندانهای بزرگ در قسمت بیرونی فک بالا و ردیف داخلی فک پایینی قرار دارد. خارهای ابششی آن باریک و بلند بوده و دارای ۹ تا ۱۲ خار روی بخش پایینی کمان ابششی هستند.

کیسه شنا هویجی شکل بوده و شامل ۲۴ تا ۳۰ جفت ضمام (Raje, 1988) و انشعابات شاخه دار است که قسمت ابتدایی آن وارد سر نمی شود. باله پشتی دارای ۱۰ عدد خار است، دومین بخش از باله دارای ۲۹ تا ۳۱ شعاع نرم است. طول باله سینه ای تقریباً برابر با عمق بدن است و باله مخرجی دارای ۲ عدد خار و ۷ شعاع نرم است و دومین خار بلند و باریک بوده و تقریباً حدود ۳/۴ طول بلندترین شعاع نرم است. باله دم‌ی لوزی شکل^۱ است. فلسهای خط جانبی به ابتدای باله دم می رسد. رنگ داخل دهان، اتاچک ابششی و حفره داخل بدن سیاه رنگ است (Sasaki, 2001) (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲. ماهی شبه شوریده دهان سیاه (*Atrubucca nibe* (Jordan & Thompson, 1911)

- بوم شناسی

شبه شوریده ابزی دریازی و کفزی بوده و در اعماق ۴۵ تا ۲۰۰ متر زندگی میکند (Sasaki, 2001). و طبق تحقیقات صورت گرفته در ایران ترکیب غذایی شبه شوریده دهان سیاه را عمدتاً فانوس ماهی (۶۵ درصد) سپس گوازیم دم رشته ای (۱۳ درصد)، میگوهای اعماق (۱۱ درصد)، حسون منقوط (۱ درصد) و آکروپوما (۴ درصد) تشکیل می دهند (سالارپوری، ۱۳۹۲). پ.

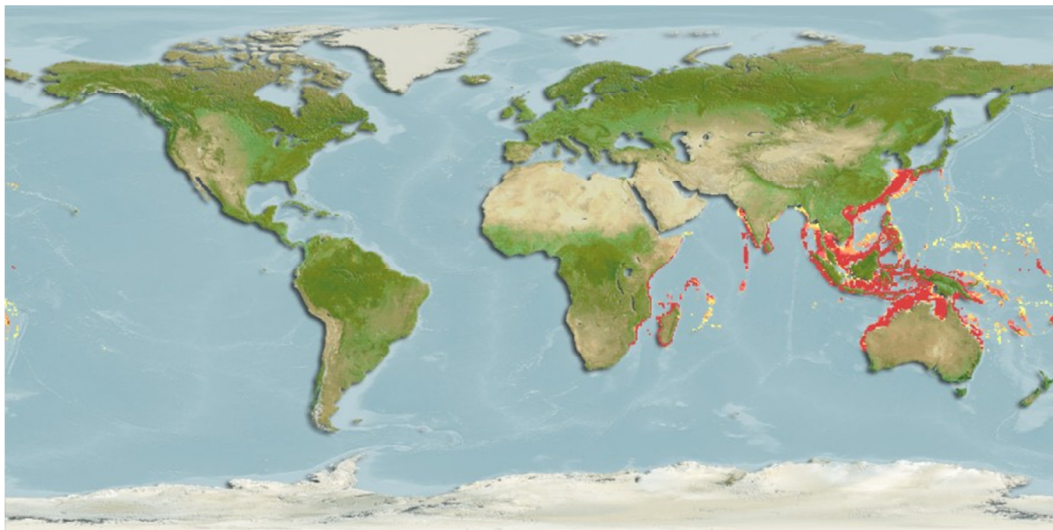
¹ Romboid

- زیست شناسی

شبه شوریده در هنگام بلوغ ۱۴/۵ سانتی متر طول داشته و حداکثر طول آن ۴۵ سانتی متر می باشد ، طول میانگین آن ۲۵ سانتی متر می باشد (Sasaki, 2001).

- پراکنش

در ابهای هند-ارام غربی از موزامبیک و ناتال تا جنوب افریقا (Vander Elst, 1993)، هند (Heemstra, 1986)، چین ، ژاپن ، فیلیپین ، اندونزی تا شمال استرالیا وجود دارد (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳. نقشه پراکنش ماهی شبه شوریده دهان سیاه در جهان
(Fishbase, 2012) *Atrubucca nibe* (Jordan & Thompson, 1911)

- نامهای رایج

شبه شوریده دهان سیاه دارای نام های گوناگونی در حوزه انتشار خود می باشد که به برخی از آنها در جدول ۱-۱ اشاره شده است (Fishbase, 2012):

جدول ۱-۱. نام های متداول شبه شوریده در کشورهای مختلف

کشور	نام های محلی
آفریقای جنوبی	Lagvin-Kob
فرانسه	Mamselle noire , Courbine noire
دانمارک	Sortnundet trommefisk
انگلیس	Black croaker
استرالیا	Longmouth jewfish
	Alakak
	Longfin
	Kuroguchi

- میزان صید

ذخایر ماهی شبه شوریده دهان سیاه در سال ۱۳۷۷، با آغاز بهره برداری از ذخایر فانوس ماهیان در شمال غرب دریای عمان، به عنوان صید ضمنی شناخته و معرفی شدند، بتدریج به عنوان یک صید تجاری و مهم اهمیت پیدا کردند. در گذشته در امار صید دریای عمان این گونه همراه با سایر گونه های شوریده گرد اوری و تحت عنوان سایر شوریده ماهیان گزارش می گردید اما در چند سال اخیر به دلیل اهمیت خاص این گونه امار صید ان جداگانه ارائه می گردد. بر اساس آمار فائو میزان صید جهانی شوریده ماهیان و گونه های مشابه آن در سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۱.۵ میلیون تن گزارش شده است، در همین سال میزان صید شوریده ماهیان در آبهای ایران ۳۵۱۵ تن گزارش شد (سالارپوری، ۱۳۹۲)، میزان صید شبه شوریده دهان سیاه در سال ۱۳۸۸ در منطقه شمال غرب دریای عمان ۱۳۹۰ تن و در سال ۱۳۸۹ صید این ماهی برابر ۱۳۸۲ تن گزارش شده است (ولی نسب و همکاران، ۱۳۹۰) میزان صید این ماهی در سال ۱۳۹۰ بر اساس آمار شیلات استان هرمزگان ۱۰۲۱ تن اعلام شده است. در سال ۱۳۹۱ این مقدار به ۸۴۳ تن رسیده است (سالارپوری، ۱۳۹۲).

۱-۵- تعاریف و اصطلاحات**- جمعیت^۱**

جمعیت شامل تمامی افراد تشکیل دهنده گونه^۲ مشابهی است که در مکانهای ویژه و در زمانهای مشابه زندگی می کنند. هر جمعیت دارای یک خزانه ژنی^۳ می باشد که کل مواد ژنتیکی تمامی افراد جمعیت را در خود جای می دهد (علی بیگ، ۱۳۸۲). در واقع جمعیت ها گروهی از افراد درون امیز می باشند که از لحاظ تولیدمثلی از گروه های دیگر همان گونه جدا می باشند. این گروه ها اگرچه از نظر تولیدمثلی جدا هستند اما به علت صورت پذیرفتن جداسازی میان جمعیت ها به طور کامل به عنوان گونه قلمداد نمی گردند. اعضای دو جمعیت از یک گونه در صورت مهیا شدن شرایط لازم قادر به تولید فرزندان بارور می باشند (سلیمی، ۱۳۹۰).

- اختلاف ژنتیکی

جهت توصیف اختلاف ژنتیکی از شاخص F_{ST} استفاده می شود که مستقیما و یا از طریق ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز است (قریب خانی، ۱۳۸۹).

F_{ST} بر اساس فراوانی به صورت ذیل محاسبه می شود:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_e}{H_T}$$

^۱ Population^۲ Species^۳ Gene pool

H_T : هتروزایگوسیتی کل ، H_e : هتروزایگوسیتی قابل انتظار

- چند شکلی^۱ ژنتیکی

چند شکلی ژنتیکی عبارتست از وجود چندین فنوتیپ کاملاً متفاوت و منفصل در درون یک جمعیت (درویش، ۱۳۸۴). پلی مورفیسم ژنتیکی ممکن است در سه سطح کروموزوم ، ژن و طول قطعه های محدود (قطعه های حاصل از اثر آنزیم محدود کننده) وجود داشته باشد (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

- تنوع هتروزایگوسیتی^۲

راه های متفاوتی جهت بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد. فراوانی هتروزایگوت ها بدین دلیل حائز اهمیت است که هر هتروزایگوت ناقل الل های متفاوتی است که این موضوع نمایانگر وجود تنوع می باشد. از اینرو متداولترین معیار جهت بررسی تنوع ژنی در یک جمعیت میزان هتروزایگوسیتی است. میزان هتروزایگوسیتی اغلب جهت یک مکان ژنی و یا میانگین تعدادی مکان ژنی بیان می شود (Peakall & Smouse, 2006).

- اللهای واقعی^۳

اللهای واقعی در حقیقت شامل تعداد اللهای مشاهده شده در هر جایگاه ژنی می باشد. این فاکتور به شدت تحت تأثیر اندازه ی نمونه بوده به همین جهت این ممکن است در آزمایشهایی با تعداد نمونه های متفاوت تعداد اللهای واقعی گوناگونی برای یک جایگاه معین مشاهده شود (Peakall and Smouse, 2005).

- اللهای مؤثر^۴

این معیار بیانگر تعداد اللهایی است که هتروزایگوسیتی یکسان ایجاد میکنند. در شرایطی که همه آلهله دارای فراوانی یکسان بوده و تحت تأثیر اللهای نادر قرار نگیرند ($P \leq 0/01$) تعداد آلهله های مؤثر در یک جمعیت برابر تعداد اللهای واقعی خواهد بود (Peakall and Smouse, 2005).

- فاصله ژنتیکی^۵

فاصله ژنتیکی شاخصی از ارتباط ژنتیکی زیر جمعیت های یک جمعیت می باشد. روش های برآورد فاصله ژنتیکی معیاری جهت اندازه گیری مقدار تغییر تکاملی بین دو جمعیت را در زمانی که تفکیک شده اند، ارائه

¹Polymorphism

²Heterozygosity Variation

³Real allele

⁴Effective allele

⁵Genetic distance

می دهند. براساس تعداد جایگزینی های آلی در هر جایگاه ژنی که در طول جدائی تکاملی دو جمعیت صورت گرفته برآورد صورت می گیرد (Jothi, 2008).

- جریان ژنی^۱

بسیاری از گونه ها جمعیت های محلی می سازند به طوریکه افراد این جمعیت محلی تمایل به تولید مثل در داخل گروه را دارند. هر کدام از جمعیت های محلی مذکور قادر به گسترش ذخیره ژنی خود به صورت مجزا از دیگر جمعیت ها می باشند. با این حال افراد یک جمعیت با افراد ی که گاهی از جمعیت مجاور وارد می شوند، احتمال تولید مثل دارند. این عمل قادر به معرفی ژن های جدید و یا تغییر تکرار موجود در میان افراد مقیم می باشند. به این فرایند جریان ژنی گویند (خالدی، ۱۳۹۰).

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

N_M : جریان ژنی، F_{ST} : درجه تمایز ژنتیکی جمعیت

- توالی یابی^۲

توالی یابی عبارتست از تعیین ردیف قرارگیری نوکلئوتیدها در یک ملکول DNA یا RNA و یا تعیین ردیف قرارگیری اسیدهای آمینه در یک زنجیره پلی پپتیدی (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

- فیلوژنی^۳

بر اساس علم فیلوژنی با در نظر گرفتن شباهت ها و تفاوت های بین گونه ها روابط تکاملی موجودات اشکار می شود. کارشناسان علم رده بندی جهت شکل گیری ارتباط های تکاملی (تبارزایی یا فیلوژنی) از روشهای رده بندی موجودات زنده بر پایه نیاکان مشترک استفاده می کنند. طی سالها بررسی درشت مولکولها (پروتئین ها و اسید های نوکلئیک (RNA DNA)، به ابزارهای توانمندی جهت مطالعه تکامل تبدیل شده اند. مقایسه دو درشت مولکول شمار واحدهای متفاوت موجود در هر یک از ان ها را مشخص می کند. شمار تفاوتها معمولا نشانه ای است که به وسیله ان می توان فاصله موجودات را تا نیای مشترکشان تعیین کرد (علی بیگ، ۱۳۸۲).

¹ Gene flow

² Sequencing

³ Phylogeny

- ژنتیک جمعیت^۱

ژنتیک جمعیت علمی است که به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ها می پردازد. این علم گوناگونی های ژنوتیپی را بررسی می کند و در حقیقت ژنتیک جمعیت به فراوانی های ژنی و ژنوتیپی و قوانین حاکم بر تغییرات آنها می پردازد. این علم تنوع حاصل از عواملی همچون جهش، نوترکیبی، جریان ژنی و اندازه موثر جمعیت را پیش بینی می کند. (Mburu, 2005 ; Pirchener, 1983).

بطور کلی کاربرد تکنیک های مولکولی در سطح بیولوژی جمعیت در چهار گروه دسته بندی می شوند:

(۱) جهت حل مواردی مثل دوره های زندگی متفاوت در تفکیک گونه ها ، هیبریداسیون و توصیف سویه ها در ارگانسیم های تک سلولی.

(۲) جهت بررسی تفاوت های ژنتیکی بین جمعیت ها (Hall et al., 1995).

(۳) جهت بحث و بررسی تفاوت های ژنتیکی در درون جمعیت ها (Grewe, 1993).

(۴) جهت آنالیز تنوع ژنتیکی و بروز هتروپلاسمی^۲ در جمعیت ها (Skibinski et al., 1994, a,b) و ارزیابی جمعیت های چند ژنی^۳ (Zhang & Nei, 1996).

۶-۱- واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR^۴

این تکنیک در اواسط دهه ی ۱۹۸۰ بوسیله کری مولیس (Kary Mullis) معرفی شد (امتیازی، ۱۳۸۶). روش PCR اولین بار توسط محققان برای تکثیر DNA بتاگلوبین انسانی و تشخیص بیماری کم خونی داسی شکل مورد استفاده قرار گرفت (Surzycki, 2002). واکنش زنجیره ای پلیمرز یک روش قدرتمند جهت سنتز DNA در شرایط آزمایشگاهی است. PCR یک روش ساده ، حساس و ارزان برای تکثیر DNA است. این تکنیک انقلابی در بیولوژی مولکولی بوجود آورد که در علوم طبیعی و علم پزشکی کاربرد بسیار زیادی دارد (Saiki et al., 1988). PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانندسازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است (امتیازی، ۱۳۸۶). مراحل این واکنش به شرح ذیل می باشد:

تکثیر DNA پس از چسبیدن آغازگر به انتهای توالی های مشخصی از DNA صورت می گیرد. پرایمرها قطعات اولیگونوکلئوتیدی کوتاهی هستند که با دورگه سازی با رشته های مقابل توالی موردنظر، به کمک انزیم DNA پلیمرز، موجب شروع سنتز توالی مکمل DNA می شوند. رشته مکمل DNA با استفاده از Dntp و در حضور انزیم پلیمرز به شکل نمایی تکثیر می شود.

^۱ Genetic population

^۲ Heteroplasmy

^۳ Multi-gene population

^۴ Polymerase Chain Reaction

DNA پلی مرز، DNA تک رشته ای را از جهت ^۴ به عنوان الگو مورد استفاده قرار می دهد و رشته مکمل را در جهت \rightarrow ک می سازد.

به طور خلاصه مراحل PCR به شرح زیر می باشند:

(۱) واسرشته سازی^۱

حرارت دادن برای واسرشت شدن دو رشته DNA (دمای ۹۴ درجه سانتیگراد).

(۲) چسبیدن آغازگر^۲

سپس با سرد کردن (دمای ۶۰-۴۰ درجه سانتی گراد) که در این مرحله مقدار دما بستگی به توالی های بازی پرایمرهای مکمل توالی رشته DNA دارد، آغازگرها در دمایی که مانع اتصال غیر اختصاصی آنها می شود، به طور اختصاصی به نواحی موردنظر DNA الگو متصل می شوند.

(۳) بسط و طولیل شدن رشته DNA^۳

در این مرحله DNA پلی مرز شروع به همانند سازی از روی DNA می نماید. طولیل شدن رشته مکمل از OH^۴ آغازگر شروع می شود. در این واکنش از DNA پلیمرازی که در برابر حرارت مقاوم است بنام Taq DNA Polymerase استفاده می شود. این انزیم در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد کاملاً پایدار است و دمای ایتیم عمل آن ۷۲ درجه سانتیگراد می باشد.

(۴) این پروسه تا چندین سیکل تکرار شد که در نتیجه مقدار قابل ملاحظه ای DNA سنتز شد.

تکثیر DNA پس از چسبیدن آغازگر به انتهای ک توالی های مشخص از DNA الگو صورت میگیرد. تکرار مراحل باز شدن دو رشته DNA، چسبیدن آغازگر و طولیل شدن آن را یک سیکل PCR می نامند. پس از یک سیکل PCR از یک مولکول DNA دو مولکول و پس از سیکل دوم چهار مولکول و پس از سیکل سوم ۸ مولکول از DNA موردنظر تولید می شود. پس از ۲۰ سیکل ۲۰ مولکول DNA تولید می گردد.

۱-۶-۱- کاربرد واکنش های PCR

از کاربردهای PCR می توان به موارد زیر اشاره کرد:

PCR- در تشخیص ناهنجاری های ژنتیکی نظیر هموفیلی ، کم خونی سلول های داسی شکل ، تالاسمی و شناسایی توالی های اسید نوکلئیک پاتوژن ها در نمونه های آزمایشگاهی کاربرد گسترده ای دارد.

- اشکار کردن یک ژن منتقل شده به یک ژنوم گیاهی با PCR

- تعیین هویت ژنتیکی نمونه های جنایی

¹Denaturation

²Annealing

³Polymerization

- بررسی موتاسیون ها
- جهت تجزیه و تحلیل ژن های همولوگ در زیست شناسی تکامل
- تولید کتابخانه های cDNA از مقادیر اندک mRNA
- استفاده در بیولوژی مولکولی گیاهی
- تولید کاوشگر برای ژن ها یا cDNAهایی که هنوز کلون نشده اند
- تولید توالی های خاصی از DNA دو رشته اش کلون شده برای استفاده به عنوان کاوشگر

۲-۶-۱- عوامل استاندارد واکنش PCR

ترکیبات واکنش استاندارد PCR عبارتند از : DNA پلیمرز پایدار به گرما، آب خالص ، DNA الگو، پرایمر ، dNTP ، $MgCl_2$ و بافر PCR که در ادامه به توضیح هر یک پرداخته می شود (Surzycki, 2002).

- دی ان ا پلیمرز

DNA پلیمرز پایدار به گرمای بالا ، DNA پلیمرز Taq نامیده می شود که از یک باکتری گرما دوست به نام *Thermus aquaticus* گرفته شده است و دارای فعالیت آگزونوکلئازی ۵' به ۳' است. این انزیم با شناسایی انتهای آزاد هیدروکسیل در ۳' پرایمر ، نوکلئوتیدها را به ترتیب ارائه شده از روی زنجیره مکمل به آن متصل می نماید و یک رشته الگو می سازد. فعالیت DNA پلیمرز با عوامل اتصال دهنده $MgCl_2^{2+}$ و افزودن $MgCl_2$ افزایش می یابد (شهریاری، ۱۳۸۱). غلظت انزیم در ترکیب واکنش می تواند درستی و صحت محصول را تحت تاثیر قرار دهد. مقدار بالای پلیمرز می تواند باعث تولید محصولات کاذب و غیر اختصاصی شود. مقدار انزیم سفارش شده در واکنش برای بیشتر پلیمرزها ۱ تا ۵ واحد است (Innis et al., 1988). این انزیم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بهترین فعالیت خود را دارد و ان را باید در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

- آب خالص

اب خالص و استریل جهت PCR و تمام واکنش های بیوشیمیایی مورد نیاز است.

- دی ان ا الگو

اغلب غلظت توالی هدف در DNA الگو نامعلوم است. معمولاً مقدار DNA برای PCR و بهینه سازی شرایط ان برای قطعات DNA کلون شده در حد کمتر از نانوگرم و برای DNA ژنومی در حد کمتر از میکروگرم می باشد. (شهریاری، ۱۳۸۱).

- پرایمرها

برای آغازگر لازم است دمای ذوب^۱ محاسبه شود، برای این منظور می توان از محاسبه تجربی ۲ درجه سانتی گراد برای بازهای ادنین (A) و تیمین (T) و ۴ درجه سانتی گراد برای سیتوزین (C) و گوانین (G) استفاده نمود. با توجه به کاربرد و نوع استفاده، دمای ذوب (T_m) معمولاً بین ۵۵ تا ۸۰ درجه مطلوب می باشد. درجه اتصال ایده ال آغازگر باید بقدر کافی پایین باشد تا قادر به دورگه سازی (پهلویی) بین آغازگر و الگو باشد همچنین باید به قدر کافی بالا باشد تا از تشکیل اتصالات اشتباهی جلوگیری شود. این درجه حرارت می تواند به وسیله تعیین درجه حرارت ذوب از هیبرید آغازگر-الگو تخمین زده شود. T_m درجه حرارتی است که در آن بازهای مکمل از هم جدا می شوند (ذوب می شوند). معمولاً دمایی معادل ۴-۲ درجه کمتر یا بیشتر از T_m کافی است تا مجال دورگه سازی صحیح بین آغازگر و الگو حاصل شود، دمای ذوب بطور تجربی می تواند تعیین شود اما بطور معمول از طریق فرمول زیر محاسبه می شود:

$$2(A+T)+T_m=4(C+G)$$

که در آن (C+G) تعداد نوکلئوتیدهای G و C و (A+T) تعداد نوکلئوتیدهای A و T در توالی آغازگر می باشد (پورنقشبنده، ۱۳۸۰).

- دی ان تی پی

Dntp با خلوص بالا توسط کارخانجات مختلفی تهیه می شود که یا به صورت ۴ محلول ذخیره جداگانه و یا به صورت مخلوطی از ۴ نوع dNTP را برای انجام PCR (تقریباً برابر با $100 \mu\text{M}$) در نظر میگیرند هرچند که انزیم DNA پلیمراز Taq در غلظت های پایین تر dNTP (در حد $10-100 \mu\text{M}$) از صحت بالاتری برخوردار است (شهریاری، ۱۳۸۱).

غلظت بهینه dNTP بستگی به عوامل زیر دارد (شهریاری، ۱۳۸۱):

- غلظت کلرومنزیوم

- میزان دقت آزمایش

- غلظت آغازگر

- طول ناحیه تکثیرشونده (Amplicon)

- تعداد چرخه های PCR

- کلرومنزیوم

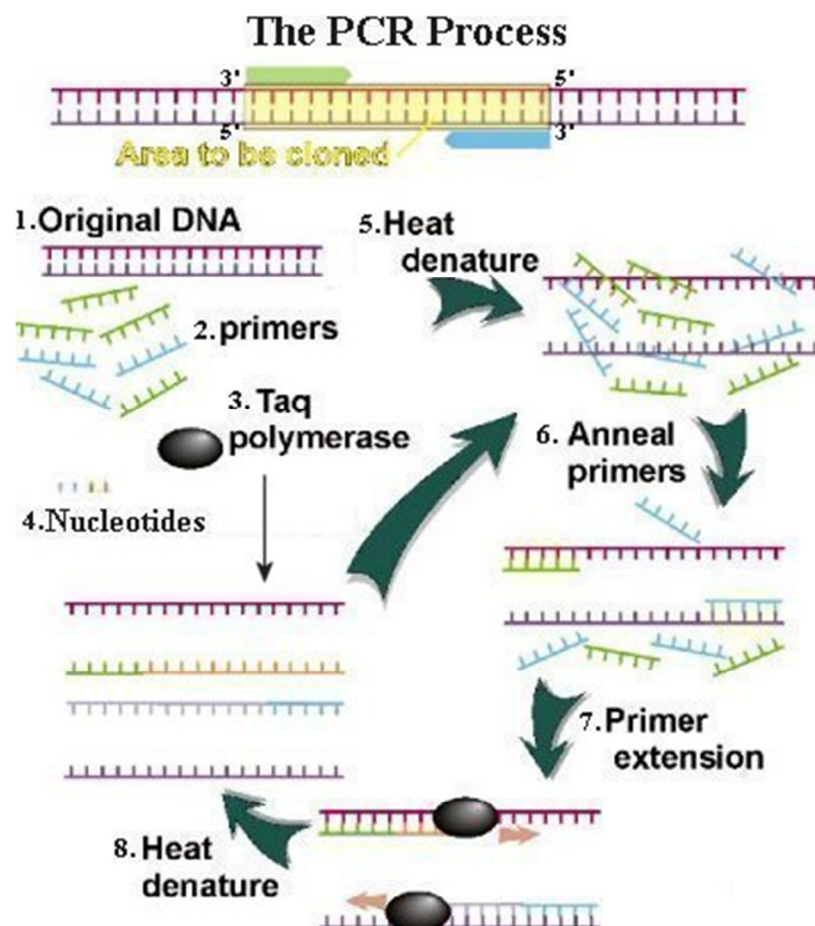
غلظت کلرومنزیوم در مخلوط نهایی واکنش متفاوت و بین ۵-۰/۵ mM می تواند متغیر باشد. یون های Mg با $dNTP_s$ یک کمپلکس محلول تشکیل می دهند، که تشکیل این کمپلکس برای ورود $dNTP_s$ به داخل زنجیره در

^۱Melting temperature

حال سنتز ضروری است. همچنین این یون ها فعالیت پلیمرازی انزیم DNA پلیمراز را تحریک می نمایند و گذشته از آن ، باعث افزایش T_m مربوط به مولکول های DNA دو رشته ای و اثر متقابل مربوط به کمپلکس DNA الگو و آغازگر می شوند. به طور کلی می توان گفت که مقادیر کم Mg منجر به کاهش بازدهی PCR و مقادیر بالای Mg باعث افزایش فرآورده های کاذب و غیر اختصاصی خواهد شد (شهریاری، ۱۳۸۱).

- بافر PCR و نمک

بافر PCR شرایط شیمیایی لازم برای فعالیت انزیم پلیمرازی را فراهم می آورد. بافر استاندارد برای DNA، ۱۰ تا ۵۰ میلی مول Tris-Hcl است. PH مطلوب و بهینه برای DNA پلیمرازهای گرمادوست بین ۸-۹ است. نمک مورد استفاده در بیشتر واکنش ها پتاسیم و سدیم است. $(Na^+)K^+$ معمولاً برای تسهیل در اتصال صحیح پرایمرها به مخلوط اضافه می شود. برای DNA پلیمراز Taq، غلظت مورد استفاده ۵ میلی مول است و غلظت یونی بالاتر، بازدارنده فعالیت DNA پلیمراز است (Innis et al., 1988).



شکل ۱-۴. تصویری شماتیک از واکنش PCR

۷-۱- تنوع ژنتیکی^۱

وجود گوناگونی های ژنتیکی در افراد یک جمعیت را تنوع ژنتیکی آن جمعیت می نامند (Templeton, 2004) اولین گام در آغاز هر برنامه اصلاح نژاد داشتن تنوع است. در اصلاح نژاد در صورتیکه بنیان ها ضعیف باشند میزان اختلاف ژنتیکی نسل های در حال تفرق در جمعیت اصلاح شده، بتدریج کاهش خواهد یافت ، در نتیجه فاصله ژنتیکی بین زاده ها و والدین کاهش یافته و هتروزیگوسیتی کافی حاصل نمی شود (عطائی ، ۱۳۸۱ ؛ Hedric, 1998) در حقیقت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژنها است که مخزن ژنی آن نژاد را می سازد. (Hedric, 1998) تنوع درون نژادی همواره با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است. اما تنوع ژنتیکی بین نژادی را نمی توان براحتی بازسازی نمود. ساختار ژنتیکی هر نژاد حاصل تقابل جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است (Templeton, 2004). از آنجائی که جمعیت ها ممکن است تبادلاتی با هم داشته باشند، این امکان وجود دارد که تمایز ژنتیکی میان جمعیت ها وجود نداشته باشد (به استثنای جمعیت هایی که بطور آشکار از نظر جغرافیایی از هم جدا هستند و هیچ ارتباطی با هم ندارند). به عبارت دیگر در مواردی، موانع تولید مثلی پنهانی وجود دارد که از تبادل اطلاعات ژنتیکی بین جمعیت ها جلوگیری می کند. بعلاوه در طول چرخه زندگی یک گونه، ممکن است اعضاء یک جمعیت بطور فیزیکی با اعضاء دیگر جمعیت ها مخلوط شوند، به این ترتیب ساختار جمعیتی یک گونه می تواند یک جمعیت تولید مثلی منفرد یا جمعیت های متعدد مجزا که تنها گاهی با هم تبادلات گامتی دارند ولی در اصل بوسیله فاصله جغرافیائی از هم جدا هستند، باشد. همچنین می تواند بصورت جمعیت هایی که در کنار هم زندگی می کنند اما از نظر تولید مثلی مجزا هستند و یا ترکیبی از تمام حالات مذکور باشد (Whitmore, 1990).

- منابع تنوع ژنتیکی

هر جمعیت شامل سه منبع تنوع یعنی جهش، نوترکیبی، و شارش ژنها^۲ می باشد. نوترکیبی بخودی خود تنوعی ایجاد نمی کند مگر آنکه آلل ها در مکان های ژنی^۳ مختلف، در حال تفکیک باشند. در غیر اینصورت چیزی برای نوترکیب شدن وجود نخواهد داشت. به همین دلیل اگر تمام افراد گونه برای یک آلل هموزیگوت باشند شارش نیز تنوعی نخواهد داشت. لذا در چنین جوامعی جهش منبع اصلی تنوع خواهد بود (King et al., 2001). برخی تغییرات محیطی همچون ساخت سدها، انحراف مسیر آب، آلودگی و اسیر شدن آب ها و معرفی گونه های غیر بومی ، می توانند سبب کاهش تنوع ژنتیکی ماهیان شوند. همچنین پرورش ماهیان می تواند مشکلاتی همچون رواج بیماری، هیبرید شدن، دستکاری های آماری و اختلالات ژنومی بین موجودات را به همراه داشته

^۱ Genetic Variation

^۲ Recombination

^۳ Locus

باشد. برداشت ماهیان نیز چه بصورت برداشت بیش از حد، انتخاب گونه های خاص، برداشت دسته جمعی و دستکاری های آماری می توانند در کاهش تنوع ژنتیکی دخیل شوند (نویدی، ۱۳۸۵). در صورتیکه جوامع موجودات کوچک باشند، به علت خطای نمونه برداری، خزانه ژنی موجود، نمی تواند نماینده دقیق نسل بعد باشد. به عبارتی به تغییرات تصادفی فراوانی ژنها در جوامع کوچک، رانش ژنتیکی اتلاق می شود. رانش ژنتیکی^۱ می تواند منجر به افزایش هموزیگوسیت ها و در نتیجه کم شدن فراوانی هتروزیگوت ها بر کاهش قابلیت کاربری باروری و تنوع گردد (نویدی، ۱۳۸۵).

- از دست رفتن تنوع ژنتیکی

در کشورهای پیشرفته تاکنون از نظر از دست رفتن تنوع ژنتیکی بیشترین توجه به نژادهای نادر معطوف بوده است. اما در مدیریت جهانی منابع ژنتیکی حیوانی، نژادهای در معرض خطر با سایر نیاها تفاوت اساسی نداشته و تفاوت میان نژادهای کم کاربرد یا بدون کاربرد و نژادهای دارای کاربرد رایج یا دارای کاربرد احتمالی در آیندهای نزدیک، اندک می باشد. با حفظ نمونه هایی از تمامی نژادهای یک گونه که دارای بیشترین تفاوت ژنتیکی می باشد، می توان حداکثر تنوع ژنتیکی را حفظ نمود. این نمونه ها نژادهایی را شامل می گردند که دارای آلل ها یا ترکیبات آللی منحصر به فرد می باشند (Templeton, 2004).

- از دست رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی

از دست رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی دارای چندین علت است که مهمترین علت آنها انحراف ژنتیکی در حین نمونه گیری از سلولهای جنسی در جمعیت های محدود می باشد. از دست رفتن تنوع ژنتیکی در اثر انحراف ژنتیکی با سرعتی رخ می دهد که این سرعت با اندازه موثر جمعیت رابطه عکس دارد (هالمرن، ۱۳۸۴). طی فرایندی که بنام نقش انقراض مشهور است، درون آمیزی و از دست رفتن تنوع در اثر انحراف ژنتیکی می تواند باعث کاهش سازگاری و شایستگی شود، از دست رفتن شایستگی می تواند موجب کاهش اندازه موثر جمعیت شده و از این رو درون آمیزی و از دست رفتن تنوع بیشتری را، که به نوبه خود شایستگی را بیشتر کاهش می دهد، ایجاد می کند. کاهش مستمر اندازه جمعیت، جمعیت را با افزایش خطر انقراض روبرو می سازد. از دست رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی شایع ترین خطر و اثر سوء مرتبط با تصمیمات اتخاذ شده در مراکز تکثیر ماهی و به ویژه در رابطه با تعداد مولدین مورد استفاده و چگونگی آمیزش آنها می باشد (هالمرن، ۱۳۸۴).

در مورد اثر و پیامد از دست رفتن مقدار معینی از تنوع ژنتیکی بر سازگاری و شایستگی بلندمدت یک جمعیت خاص ماهیان و همچنین در رابطه با حساسیت نسبی گونه ها و جوامع مختلف به کاهش تنوع ژنتیکی عدم

¹ Gene drift

قطعیت وجود دارد. از آنجایی که عدم قطعیت مذکور را احتمالاً، نمی توان برطرف نمود، باید راه کارها و راهنمایی ها، با اصول تکاملی همسو و مطابق باشد تا از دست رفتن تنوع ژنتیکی در اثر دخالت انسان به کمترین مقدار برسد (Waples et al., 1990).

- ازدست رفتن تنوع ژنتیکی بین جوامع

آمیزش هایی که در میان ماهیان متعلق به چندین جمعیت انجام می شود موجب از دست رفتن وجه مشخصه و تمایز ژنتیکی هر کدام از جوامع یا هویت آنها می شود. این قبیل تلاقی ها اثراتی مشابه با فرایند ژنتیکی مهاجرت دارند که نه غیرطبیعی است و نه ضرورتاً کشنده است. بسیاری از گونه های ماهیان از ابر جمعیت هایی تشکیل شده اند که زیر جمعیت های نسبتاً جدا شده آنها، از طریق مقادیر جریان ژنی متفاوتی توسط افراد مهاجر با هم در ارتباطند. جدایی، فرصتی را فراهم می آورد که زیر جمعیتها با شرایط محیط زیست محلی خود سازگاری پیدا کنند. مقادیر اندک مهاجرت می تواند از دست رفتن تنوع ژنتیکی را بدون غلبه نیروهای محلی انتخاب طبیعی، در درون جوامع شروع شده برطرف کند. با این وجود اعمال بسیاری از برنامه های تکثیر و رهاسازی (و نقل و انتقال ذخایر) در گذشته، موجب افزایش مهاجرت در میان جوامع یا ترکیب شدن جوامعی شده است که در حالت طبیعی چنین اتفاقی رخ نمی داد. یکی از پیامدهای اختلاط جوامع متمایز فشار برون امیزی است، که در اثر برهم خوردن اختلال در ترکیبات ژنی همسازگار یا سازگاری محلی، موجب از دست رفتن شایستگی و سازگاری می شود (هالمرن، ۱۳۸۴).

- روش های حفظ تنوع ژنتیکی

در صورت انقراض جمعیت ها و یا نبود تنوع در درون جمعیت های محدود، تنوع ژنتیکی لزوماً بین می رود. نسبت مورد انتظار تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) که در داخل یک جمعیت پس از t نسل باقی می ماند را می توان از فرمول زیر بدست آورد.

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

که در آن H_0 هتروزیگوسیتی اولیه، N اندازه جمعیت، N_e اندازه جمعیت موثر و t تعداد نسل می باشد.

طبق فرمول ذکر شده می توان حفظ هتروزیگوسیتی را از طریق مطالب ذیل حداکثر کرد (Targon et al., 2000):

از طریق تشکیل جمعیت های با تعداد بالا می توان هتروزیگوسیتی اولیه را حداکثر نمود، بدین منظور تا حد امکان جمعیت هایی که سطوح بالایی از تنوع را دارند انتخاب شوند، از طرق حداقل نمودن تعداد نسل ها که بدین منظور تعداد نسل را می توان از طریق افزایش فاصله نسل یا از طریق استفاده از انجماد اسپرم حداقل نمود. فناوری هایی از قبیل انجماد اسپرم و جنین، فرصت هایی را برای حداقل کردن کاهش ژنتیکی فراهم می کند، حداکثر نمودن اندازه جمعیت و حداکثر نمودن نسبت اندازه جمعیت موثر به اندازه جمعیت یا N_e/N .

۸-۱- ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرها

با استفاده از انواع نشانگرها، می توان تنوع ژنتیکی را در سطح وسیع تر و با دقت بیشتری بررسی نمود. نشانگرها شامل انواع مختلف مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می باشند. ساده ترین نشانگرها، نشانگرهای مورفولوژیک هستند که اساس آنها، وجود تفاوت های ظاهری در افراد مختلف می باشد. نشانگرهای سیتوژنتیکی نیز بر پایه تفاوت در سطح کروموزوم ها بنا نهاده شده اند و نشانگرهای بیوشیمیایی، شامل پروتئین های ذخیره ای، شکل های مختلف آنزیم ها (ایزوزایم ها، آلوزایم ها و...) هستند. با ابداع نشانگرهای مولکولی کاربرد این نوع نشانگرها محدود شده است (Frankham, 1994).

در این راستا بهترین و مناسبترین نوع نشانگرها، نشانگرهایی هستند که تفاوت و تنوع افراد را در سطح ماده ژنتیکی یعنی DNA بر روی صفات مختلف نشان داده و از نظر تأثیر بر روی صفات مختلف خنثی میباشند و همچنین تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمیگیرند (Tilman et al., 1996).

نشانگرهای مولکولی که بر اساس تفاوت در توالی DNA طراحی شده اند، در بررسی تنوع ژنتیکی و چند شکلی های بین گونه ای و نیز داخل جمعیت های یک گونه کاربرد وسیعی دارند. این نشانگرها تفاوت های کوچک در سطح DNA (مثلا حذف، اضافه و تغییر یک یا چند باز که در اثر عوامل مختلف بوجود آمده اند) را منعکس کرده و به همین دلیل چند شکلی بالایی را ایجاد می کنند و جهت بررسی تنوع و گوناگونی جمعیت ها کاربرد گسترده ای دارند. نشانگرهای مولکولی شامل انواع متعددی از نشانگرها بوده که هر کدام مزایا و معایب خود را دارند. کشف PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز)، نقش اساسی در مطالعه و پژوهش ژنوم جانداران داشته است همچنین در توسعه و کاربرد نشانگرهای گوناگون DNA نقش بسزایی ایفا کرده است (Schlotterer, 2004).

۹-۱- نشانگرها

به طور کلی هر صفت متفاوتی ناشی از تفاوت موجود بین توالی های DNA آنهاست که به افراد نسل بعد منتقل می شود. حتی صفاتی که تحت تاثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می کنند (تفاوت بین افراد در شرایط محیطی یکسان)، بازتاب تفاوت های موجود در ردیف های DNA هستند. این تفاوت ها می توانند به عنوان نشانگر یا نشانه به کار گرفته شوند. پس بطور کلی برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد، باید دست کم دو ویژگی داشته باشد:

(۱) در بین دو فرد متفاوت باشد

(۲) به توارث برسد (Chawla, 2000)

نشانگرهای ژنتیکی به عنوان ابزارهای جهت تهیه نقشه های پیوستگی مولکولی و ارزیابی جایگاه های ژنتیکی چند شکلی در صفات اقتصادی کمی کاربردهای بالقوه ای را در برنامه های اصلاحی حیوان و گیاه پیدا کرده اند (جوآنروح علی آباد، ۱۳۸۱).

۱-۹-۱- مهمترین ویژگی های یک نشانگر مطلوب

- ۱) تشخیص اسن ژنوتیپ های ممکن (الل های هموزیگوت و هتروزیگوت)
- ۲) تظاهر در مراحل اولیه زندگی جاندار
- ۳) نداشتن تاثیر بر روی دیگر الل های موجود در جایگاه های ژنی نشانگر، که بر مورفولوژی جاندار موثرند (نداشتن اپیستاز^۱)
- ۴) حداقل بودن یا عدم تاثیر متقابل با نشانگرهای دیگری که می توانند به طور همزمان در یک جمعیت مورد استفاده قرار گیرند.
- ۵) پیوستگی زیاد با ژن های مورد نظر
- ۶) توارث پذیری کامل
- ۷) آسان بودن اندازه گیری (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱)

۱-۱۰- نشانگر های DNA

از بیست و چهار سال گذشته توجه به نشانگر های DNA افزایش یافته است. در ابتدا DNA میتوکوندریایی و سپس تکنیک های مولکولی پیشرفت کرده و به سمت DNA هسته ای سوق یافته است (Ferguson et al., 1995). نشانگر های DNA چند شکلی موجودات را در سطح DNA تعیین می کنند این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می کنند (خوش خلق، ۱۳۸۵) و در نتیجه توالی های کد کننده و غیر کد کننده را در بر می گیرند. بررسی این گونه تفاوت ها فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم DNA امکان پذیر است و به آنها نشانگر های مولکولی در سطح DNA می گویند (جوانروح، علی آباد، ۱۳۸۱).

از مزایای این نشانگرها می توان به موارد ذیل اشاره نمود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶):

- ۱- هم بارز بودن اکثر نشانگر های DNA
- ۲- امکان بکار گیری آنها در تمام مراحل زندگی جاندار (حتی در دوران جنینی)
- ۳- فراوانی بالا
- ۴- عدم تاثیر از شرایط محیطی
- ۶- امکان استفاده از نرم افزار های رایانه ای مختلف در آنالیز داده های حاصل
- ۷- قدرت تمایز بالای این نشانگر ها
- ۸- نمایان سازی تفاوت توالی های غیر کد کننده علاوه بر نمایان سازی اختلاف موجود در توالی های کد کننده

¹Epistasis

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، امتیاز بندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع گردیدند و تحولی عظیم در اطلاعات تنوع ژنتیکی ایجاد کرده اند (قره یاضی، ۱۳۷۵). این نشانگرها به عنوان ابزارهای ضروری در ایجاد و اهدافی چون نگهداری بیولوژیک مطالعات تکاملی و نیز پروژه های نقشه بردار ژنی در آمده اند (دانشورآملی، ۱۳۸۳).

۱-۱۱-۱- توالی یابی

توالی یابی به تعیین ردیف قرارگیری نوکلئوتیدها در یک ملکول DNA یا RNA و یا تعیین ردیف قرارگیری اسیدهای آمینه در یک زنجیره پلی پپتیدی گفته می شود (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

۱-۱۱-۱-۱- توالی یابی شیمیایی^۱

در این روش قطعه مشخصی از DNA به عنوان ماده اولیه مورد نیاز است. لازم نیست که این قطعه در ناقل پلاسمید کلون شود. لذا این روش برای هر قطعه DNA کاربرد دارد. انتهای ۵' هر دو رشته DNA با فسفر رادیواکتیو (P32) نشان دار می شوند. رشته ها ذوب شده و جدا می گردند تا جمعیتی از رشته های نشان دار شده برای واکنش های تعیین توالی تولید شوند. گام بعدی، تغییر شیمیایی بازهای DNA است DNA به ۴ قسمت تقسیم شده و به هر قسمت، ماده شیمیایی خاصی افزوده می شود که یک یا دو باز از ت دار را تغییر می دهد. آزمایش به گونه ای برگزیده می شود که به طور میانگین در هر مولکول DNA فقط یک تغییر شیمیایی انجام شود. سپس بازهای تغییر یافته از قندی که به آن متصل هستند جدا شده و با افزودن ماده شیمیایی پیریدین، زنجیره فسفودی استراز در محلی که باز از ت دار تغییر یافته است، شکافته می شود. این فرایند ها تولید قطعات نشان دار شده ای خواهند کرد که انتهای آنها بازهای متفاوتی وجود دارد و هر یک از آنها فقط در یک نوکلئوتید با دیگران متفاوت است. این قطعات را اصطلاحاً قطعه های همجوار می گویند (امین لاری، ۱۳۷۸).

۱-۱۱-۲- توالی یابی به روش خاتمه یابی زنجیره^۲

هر چند نتایج نهایی این روش با روش شیمیایی یکسان است اما روش سانجر (سانگر) کولسان به طور کامل با روش ماکسام_گیلبرت متفاوت است. طی این روش الگو، یک DNA تک رشته ای است و یک آغازگر نیز باید تهیه شود تا به انتهای ۳' متصل گردد و آنزیم DNA پلیمراز سنتز خود را از آن ناحیه آغاز کند. تولید قطعات همجوار از راه وارد کردن dNTP های تغییر یافته به هر محلول واکنش صورت می گیرد dNTP. های تغییر یافته بدون گروه هیدروکسیل در محل ۳' دی اکسی ریبور بوده و برای طولانی شدن زنجیره DNA لازم هستند. این

^۱Maxam Gilbert Method

^۲Sanger Method

بازهای تغییر یافته دی دی اکسی نوکلئوزید تری فسفات (ddNTP) هستند. در هر یک از ۴ محلول واکنش، یکی از ۴ ddNTP ها (A,G,C,T) ریخته می شود. همه محلول ها دارای ۴، ddNTP های معمولی نیز هستند. غلظت دی دی اکسی به گونه ای برگزیده می شود که شمار ورود آن، به DNA در حال رشد محدود باشد. بنابراین هر واکنش، قطعه های تولید می کند که رشد آن ها در محل یک نوکلئوتید متوقف شده است و ۴ واکنش یک سری قطعه های همجوار را تولید می کنند. زنجیره DNA با بکارگیری dNTP رادیواکتیو در محیط واکنش نشان دار می شود. برای این کار معمولاً dNTP نشان دار شده با گوگرد رادیواکتیو (α -S35-dNTP) استفاده می شود، زیرا در مقایسه با dNTP نشان دار شده با P32 امکان خواندن شمار بیشتری را از توالی روی یک ژل فراهم می کند. تولید قطعه ها برای تعیین توالی با روش دی دی اکسی، معمولاً پیچیده تر از روش شیمیایی است و اغلب در آن به کلون کردن دوباره در ناقل متفاوتی نیاز است. در یک روش، DNA را در فاژ ۱۳ M کلون می کنند که هنگام آلوده کردن باکتری میزبان، DNA تک رشته ای تولید می کند. این DNA ماده اولیه مناسب برای تعیین توالی است (امین لاری، ۱۳۷۸).

۳-۱۱-۱- تعیین ترادف DNA های طویل

آزمایش تعیین توالی DNA به روش سانجر و به روش ماکسام گیلبرت، فقط در حدود ۴۰۰ نوکلئوتید از زنجیره الگورا در بر می گیرد ولی اکثر ژن ها خیلی طویل تر از این هستند. برای رفع این محدودیت، تعیین توالی DNA می تواند با تعداد زیادی قطعات مختلف که همه از یک مولکول DNA بزرگ و منفرد مشتق شده اند، انجام می گیرد، قطعات مذکور باید دارای نقاط هم پوشان باشند. محل هم پوشان، با استفاده از نرم افزارهای تخصصی تعیین می گردد (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

۴-۱۱-۱- قدم زنی پرایمری

DNA تک رشته ای که بیش از ۵۰۰ نوکلئوتید دارد، طبعاً به صورت مطلوب نمی تواند بر روی ژل پلی اکریل آمید تفکیک شود. این مشکلات محدودیت هایی برای تعیین توالی ایجاد می کند و تعیینات طول توالی ها در این روش محدود می باشد. روشی که جدیداً به وجود آمده است، شامل سنتز یک آغازگر الیگو نوکلئوتیدی است که این آغازگر ها می توانند یک جایگاه مشخص را در توالی نامشخص در انتهای رشته شناسایی و با آن جفت شوند. این توالی ها معمولاً در انتهای پایانی رشته ها قرار دارند. در این روش، توالی ها با قدم زنی مشخص می شوند، در هر مرحله یک آغازگر جدید سنتز می شود که منطقه توالی شناخته شده را گسترش می دهد. البته می توان قطعات قرار گرفته در پایین دست جایگاه اتصال آغازگر را به کمک آنزیم ها حذف کرد و مرتباً این کار را ادامه داد تا یک سلسله فرآیند حذف به وجود آید. با تعیین توالی هر دو رشته مکمل DNA و تایید اینکه هر دو توالی تعیین شده به طور کامل مکمل هستند امکان آشکار سازی و حذف توالی های مصنوعی تولید شده

در واکنش یا در طول الکتروفورز، به وجود خواهد آمد. وقتی این موضوع بررسی شد، توالی DNA می تواند با درجه دقت بالایی ساخته شود (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

۵-۱۱-۱- آنالیز اتوماتیک تعیین توالی DNA

در توالی یابی ماشینی با استفاده از چهار ماده فلورسنتی، یک واکنش با هر چهار dNTP در یک شیار یا چاهک ژل انجام می شود. محصولات واکنش با هم مخلوط گردیده و در ژل به حرکت در می آیند. با تابیدن اشعه، برجسب های موجود بر قطعات با طول های مختلف، یک علامت یا سیگنال خاص از خود نشان میدهند. وقتی توسط دستگاه، امواج آرگون به برجسب های فلورسنت تاییده شوند، پرتوهایی در طول موج های مختلف ساطع می گردد. این امواج توسط یک جستجوگر شناسایی و توسط نرم افزار خاصی به صورت سیگنال ثبت و پردازش می شود. هر سیگنال معرف یک باند است (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

۱۲-۱- اساس کار الکتروفورز

اساس کار الکتروفورز حرکت ذرات باردار در میدان الکتریکی می باشد. واژه Electro به معنای انرژی الکتریسته و Phoresis از فعل یونانی Phoros به معنای انتقال از طریق می باشد. ترکیبات باردار با وارد شدن در محلولهای آبی به یونهای مثبت و منفی یونیزه می شوند و در صورتی که مولکولهای دارای بار خالص باشند می تواند به طرف قطبین حرکت نمایند. پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک درشت مولکولهای زیستی در چنین سیستمی به میزان بار خالص آنها بستگی دارد که خود تابعی از PH محیط است. اگر توزیع بارها در مولکول متقارن باشد در طول یک گرادیان میدان و سرعتی که تابع بار الکتریکی، اندازه، شکل و وزن ماده است حرکت می کند. مولکول هایی با بار و اندازه مختلف در میدان، سرعت های متفاوتی پیدا کرده و به مناطقی تفکیک می شوند. این مناطق از هم فاصله گرفته و در یک زمان معین در طول میدان منظم می شوند که این احساس جداسازی بطریق الکتروفورز است (شاه حسینی، ۱۳۸۰).

۱-۱۲-۱- الکتروفورز ژل آگارز^۱

آگارز یک پلی ساکارید است که از واحدهای تکرار شونده آرابینوزدی ساکارید تشکیل شده است. هنگامی که پودر آگارز در اثر حرارت در بافر خود توسط باندهای هیدروژنی بحالت ژل در می آید در واقع مولکول های پلیمر از حالت حلقوی نامنظم به شکل مولکولهای مارپیچی دوتایی در می آیند. بسته به اندازه متفاوت ماکرومولکول از غلظت های متفاوت آگارز استفاده می شود. غلظت استاندارد ۰/۷-۰/۸ درصد قادر به تفکیک

^۱Agarose Gel Electrophoresis

باند‌های به طول 15-500 kb می باشد. این سیستم قادر به ارزیابی قطعاتی با طول بیشتر از 10 Mb بوده و از فواید آن استحکام و غیر سمی بودن آن هاست. (Hildebrandt & Igarashi, 1999).

۱۳-۱- رنگ های ردیاب^۱

با افزودن رنگ های ردیاب به بافرهای سنگین کننده، میزان حرکت قطعه DNA در ژل الکتروفورز مشخص می شود. از رنگ های معمول که قابلیت حرکتی زیادی در طول ژل الکتروفورز دارن رنگ های برموفنل بلو و گزین سیانول می باشند که در غلظت های متفاوت ژل قابلیت تفکیک اختصاصی دارند (Hildebrandt & Igarashi, 1999).

%1 Agarose: Xylene cyanol ~ 5kb., bromphenol blue ~ 0.5 kb
%5 acrylamid: Xylene cyanol ~ 260 bp., bromphenol blue ~ 60 bp

۱۴-۱- DNA میتوکندریایی

در سلول های جانوران یوکاریوت مقدار کمی از DNA خارج از هسته و درون میتوکندری ها و کلروپلاست ها یافت می شود. میتوکندری یکی از اجزای سلول های یوکاریوت هوازی است که طی فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو توسط آنزیم ها متصل به غشاء داخلی میتوکندری ATP تولید می کند (پاسالار و همکاران، ۱۳۷۴). در دهه های گذشته DNA میتوکندری به صورت گسترده به عنوان شاخص ژنتیکی برای تعیین ساختار ژنتیکی موجودات، ارتباط تکاملی آن ها و الگوهای جریان ژنی مورد استفاده قرار گرفته است (Wilson et al., 2000; Shen et al., 2007; Gai et al., 2008). این اطلاعات ممکن است از مطالعات بر روی ترتیب ژنی، تعیین توالی ژن های فردی، تکثیر قطعات برش داده شده میتوکندری یا تعیین توالی کامل میتوکندری منشا گرفته باشد (Wilson et al., 2000). بررسی ها نشان داده است که ژنوم میتوکندی و حتی ترتیب ژن های آن در مهره داران از دوزیستان تا انسان کاملاً حفظ شده است. (Tjensvoll et al., 2008) مطالعات میکروسکوپ الکترونی، کلاف های متشکل از تارچه هایی به قطر ۳۰ تا ۴۰ انگستروم را در ماده زمینه ای میتوکندری مشخص می سازد. این تارچه ها پس از تاثیر آنزیم DNase ناپدید می شوند بنابراین از DNA تشکیل یافته اند. هر میتوکندری می تواند تا ۶ کلاف DNA داشته باشد. مولکول های mt DNA پس از جدا کردن و سایه دادن با فلز به شکل زنجیره های کوتاه (۵ میکرون) حلقوی دیده می شوند. ساخت mt DNA که با پروتئین هیستون همراه نبوده و اصطلاح برهنه به آن اطلاق می گردد مستقل از ساخت DNA هسته ای و با DNA پلی مرزهایی متفاوت با پلی مرزهای هسته صورت می گیرد. همانندسازی mt DNA از چند نظر با سایر DNA های حلقوی تفاوت فاحش دارد. در mt DNA آنزیم پلیمرز گاما کار همانندسازی را به عهده دارد. برای همانندسازی ابتدا یک رشته DNA همانندسازی می شود (رشته L بعنوان الگو قرار میگیرد و رشته H ساخته می شود) سپس آنزیم به محل D-Loop متصل و آن را باز می کند و بعد از روی رشته L رشته H را می سازد (شاهسون بهبودی، ۱۳۷۴). میتوکندری ها هر یک حاوی حدود ۱۰ کپی

^۱Tracking dyes

یکسان از ژنوم میتوکندریایی می باشند DNA میتوکندریایی در مهره داران، مولکولی با دو زنجیره حلقوی بسته و طولی در حدود 15-17 bp می باشد. (Clayton, 1992) توالی نوکلئوتیدی mt DNA دو نمونه انتخاب شده از یک گونه احتمال دارد متفاوت باشد. تفاوت ممکن است در نوع یا تعداد نوکلئوتیدها در یک مکان از ژنوم باشد که نوع اول را جهش نقطه ای^۱ می نامند و ممکن است به وسیله جانشینی یک نوکلئوتید به وسیله معادل ساختاری آن رخ دهد (Brown et al., 1982) و نوع دوم را جهش های طولی^۲ می نامند (Hauswirth & Clayton, 1985) و در توالی غیر کدبندی شده مرسوم تر است. اگر جهش در ژنوم میتوکندری سلول های زایا ایجاد شود احتمال اینکه در تقسیمات بعدی این سلول ها همه میتوکندری های فرد جدید که از آن سلول منشا می گیرند شامل mt DNA جهش یافته باشند بسیار بالا می رود (Ovenden, 1990).

mt DNA در مهره دارن حدود ۳۷ ژن را حمل می کند و حاوی ۲۲ ژن tRNAs، 2 ژن rRNAs و ۱۳ ژن mRNAs که کدکننده پروتئین ها می باشند و در زنجیره اکسیداتیو فسفریلاسیون^۳ و انتقال الکترون و نیز در تولید ATP نقش دارند و یک ناحیه غیر کد بندی شده یا D-Loop که بعنوان ناحیه شروع همانندسازی می باشد. دو زنجیره mt DNA، زنجیره H (زنجیره سنگین) و رشته L (زنجیره سبک) نامیده می شوند که در محتوی C+G اختلاف دارند. اغلب ژن ها در رشته H و تنها ژن tRNA ND6 ژن توسط رشته L کد دهی می شوند (Saccone et al., 1999) mt DNA های پلویید بوده و انتقال ژن ها در اکثر گونه ها به صورت مادری می باشد پس تغییر پذیری توسط پدیده جهش رخ می دهد. البته بررسی ها نشان می دهد که mt DNA در بعضی از موجودات نظیر موش و دروزوفیلا منشاء پدری (Gyllester et al., 1991) و در ماسل های دریایی و در بازدانه ها منشاء پدری و مادری دارد (Zouros et al., 1992).

انتقال ژن ها در mt DNA بصورت گروهی بوده و فرایند کراسینگ اور و پدیده نوترکیبی در آنها رخ نمی دهد. (Hoech et al., 1991) تراکم ساختاری مولکول mt DNA تقریباً ۲ درصد به ازای هر میلیون سال می باشد که این میزان ۵ تا ۱۰ برابر در مقایسه با میزان تنوع در ژنوم هسته ای سریعتر می باشد، به طوری که در 8- mt DNA 10 جایگاه و در ژنهای هسته حدود ۹-۱۰ جایگاه سالانه می باشد که احتمالاً بعلت فقدان هیستون ها و عدم وجود مکانیسم بازسازی DNA می باشد. (Garesse et al., 1997) اکثر تفاوت ها در توالی های mt DNA جهش های نقطه ای می باشند. (Brown et al., 1982)

بر اساس مطالعات انجام گرفته تعداد زیادی از هاپلوتیپ های نادر در mt DNA وجود دارد که موجب جهش های زیان بخش می شوند. میزان تکامل در mt DNA سریعتر از DNA هسته ای می باشد که احتمالاً به علت فقدان آنزیم های ترمیمی جهت بازسازی اشتباهات در همانندسازی mt DNA می باشد. (Fry, 1993)

¹ Point mutation

² Length mutation

³ Oxidative phosphorylation

مولکول mt DNA حاوی کدهای ژنتیکی متفاوتی می باشد بطوریکه ۲۲ ژن tRNA کدبندی شده در ژنوم mt DNA جهت رمزگشایی کامل ژن های mRNAs میتوکندریایی کافی می باشند. علاوه بر محافظت محتویات ژن های mt DNA نظم و ترتیب ژن ها در ارگانسیم ها بطور فیلوژنتیکی حفظ شده است بنابراین با وصف خصوصیات مولکول mt DNA می توان گفت که mt DNA به عنوان شاخص حساس در سطح مطالعات جمعیتی و بررسی تکامل روابط بین جمعیت ها و تخمین فواصل ژنتیکی بین گونه ها و حل روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت ها مفید و ضروری می باشد. (Avice, 2004).

۱۵-۱- مزیت استفاده از mt DNA

مواد ژنتیکی اعم از کروموزمی یا خارج از کروموزومی در معرض تغییرات و جهش های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون سلول یا بیرون از ارگانسیم در هنگام همانندسازی سبب جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می شوند. ژنوم میتوکندری یک نشانگر ژنتیکی میباشد که به طور گسترده ای برای مطالعات ژنتیکی کاربرد دارد. (Hynes et al., 1996; Ovenden, 1990) با توجه به اینکه میتوکندری منشأ مادری دارد و نو ترکیبی در آن انجام نمی گیرد، لذا این خصوصیات باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از اینرو نشانگر خوبی برای تشخیص گروه هایی که برای ۱۰، ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ سال از هم جدا بوده اند می باشد. (Bilington, 1998)

mtDNA یک ابزار قوی به منظور مطالعات و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ها می باشد که می تواند به دلایل زیر باشد:

- ۱) سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته از آن یک کاندیدای خوب و مناسب برای مطالعات تکاملی می سازد در واقع این ویژگی و قدرت تفکیک و دقت مطالعات را در سطح جمعیتی بهبود می بخشد. (Brown, 1983; Moritz et al., 1994).
- ۲) mtDNA از مادر به فرزند می رسد (Hutchinson et al., 1974; Avice and virjenhock, 1987 may and Grew 1993) به این مفهوم که تمام فرزندان، بدون توجه به جنسیت، ژنوتیپ هاپلوئید mtDNA مادرشان را به ارث می برند.
- ۳) در mtDNA نو ترکیبی صورت نمی گیرد. این خاصیت باعث بروز اختلافات ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته می گردد. (Brown, 1983).

۲- پیشینه تحقیق

طی مطالعات صورت گرفته توسط Yamada و Tokimura در سال ۱۹۹۴ بر روی شبه شوریده دهان سیاه در آبهای چین شرقی و دریای زرد گونه مذکور را در زمره گونه های در معرض خطر و اسیب پذیر تخمین زدند. Kawasaki در سال ۱۹۸۷ گزارشی از صید بی رویه و کاهش ذخایر *A. nibbe* در آبهای کنگ آرائه نمود. Murty در سال ۱۹۸۰ برخی از جنبه های رشد شبه شوریده دهان سیاه را شامل روابط طول-وزن، طول بلوغ و فصل تخم ریزی را مورد مطالعه قرار داد.

Fennessy در سال ۲۰۰۰ ۴ گونه از شوریده ماهیان را از جنبه های زیستی را در آبهای آفریقای جنوبی مورد مطالعه قرار داد و اشاره ای نیز به رشد گونه شبه شوریده دهان سیاه نمود.

لالوئی و همکاران در سال ۱۳۸۷ با استفاده از mtDNA به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* در حوضه جنوبی دریای خزر پرداختند. تجزیه تحلیل داده های حاصل از ارزیابی ژن های ND-3/4 و ND-5/6 نشان داد که نمونه های سواحل استان گیلان با تالاب انزلی، سواحل استان گیلان با سواحل استان گلستان ورودخانه تجن با گرگانرود از لحاظ فراوانی هاپلو تیپ دارای اختلاف معنی داری بوده است ($P \leq 0.05$). با توجه به نتایج بدست آمده و وجود تفاوت ژنتیکی معنی دار بین نمونه ها، میتوان عنوان نمود که جمعیت یکسانی از کپور معمولی در مناطق مورد بررسی وجود نداشته و بطور کلی سه گروه ژنتیکی از این گونه شناسائی شدند.

قریب خانی در سال ۱۳۸۹ به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و فیلوژنی سوف حاجی طرخان *Perca fluviatilis* در تالابهای انزلی و امیرکلاهی لاهیجان و سوف سفید *Sander lucioperca* در سد ارس و حوضه ی جنوب غربی دریای خزر با استفاده از روش توالی یابی پرداخت و به این نتیجه دست یافت که منشا تکاملی سوف سفید سد ارس و تالاب انزلی مشترک است و گونه های سوف سفید و سوف حاجی طرخان دارای یک جد مشترک در زمانهای بسیار دور بوده اند.

خالدی در سال ۱۳۹۰ به بررسی تنوع ژنتیکی ماهی راشو معمولی *Eleutheronema tetradactylum* در خلیج فارس و دریای عمان (خوزستان، بوشهر، بندرعباس و سیستان و بلوچستان) با استفاده از تعیین توالی ژن 28S rRNA پرداخت و مشخص گردید مقادیر حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی در دو منطقه خلیج فارس و دریای عمان معنی دار نبودند ($P > 0.05$). این امر نشان می دهد ساختار ژنتیکی گونه مورد نظر در خلیج فارس و دریای عمان خیلی با یکدیگر متفاوت نیست.

در تحقیق انجام شده توسط قدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ تنوع ژنتیکی *Liza aurata* در سواحل استان گلستان بررسی شد. تفاوت بارزی ژنتیکی در میان مناطق مشاهده نشد و میزان نسبتا بالایی از جریان ژنی بین جمعیت ها مشخص گردید.

نعمت زاده و همکاران در سال ۱۳۹۰ در بررسی صورت گرفته بر روی ۶ گونه از کفال ماهیان ایران را با استفاده از روش PCR-sequencing مورد مطالعه قرار دادند که گونه *Liza aurata* با گونه *Liza subviridis* به روش آنالیز

maximum parimony در یک شاخه قرار گرفتند اما به روش Neighbor joining این گونه با *Liza saliens* در یک شاخه قرار گرفتند.

Sheldlock و همکاران در سال ۱۹۹۱ با استفاده از روش PCR-sequencing ارتباط تکاملی ماهی آزاد اقیانوس آرام Pacific Salmon را بر اساس تعیین توالی مستقیم از روی محصولات PCR ناحیه D-loop در mtDNA مورد بررسی قرار داد و تجزیه و تحلیل های قبلی، در مورد روابط فیلوژنی خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) را تایید کرد.

Pourkazemi در سال ۱۹۹۶ به بررسی مولکولی ذخایر ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر پرداخت و نتیجه گیری کرد که بخش D-Loop مولکول mtDNA برای تمایز گونه ها مناسب است اما برای تمایز جمعیتها کارایی ندارد.

Rezvani در سال ۱۹۹۷ به بررسی ژنتیک جمعیت ماهی خاویاری جنوب دریای خزر با استفاده از روش توالی یابی mtDNA پرداخت و نتیجه گیری کرد که بخش D-Loop مولکول mtDNA برای تمایز گونه ها مناسب است اما برای تمایز جمعیتها کارایی ندارد.

Alvarado Bremer و همکاران در سال ۱۹۹۸ برای مطالعه ساختار ژنتیکی *Thunnus obesus* در اقیانوس اطلس، هند و آرام از روش Sequencing و PCR-RFLP استفاده نمود که با استفاده از ۳ آنزیمی که در ناحیه D-loop به کار بردند، ۱۳ هاپلوتیپ را شناسایی کردند. در آنالیز فراوانی پراکنش، نمونه های اقیانوس اطلس از نظر ژنتیکی با نمونه اقیانوس آرام و هند مجزا بود و اختلاف کم بین ماهیان اقیانوس اطلس و آرام را ناشی از جریان ژنی بین دو منطقه دانستند. نتایج آنها نشان داد که تئوری جمعیت جهانی از ماهی تن چشم درشت بی اساس است.

Menezes و Panrulekar در سال ۱۹۹۸ مطالعه و تحلیلی که از بکار گیری روشهای مولکولی در بررسیهای جمعیت شناسی و تمایز گونه ها آذربایجان کشور هند انجام دادند نتیجه گیری کردند که این روشها مؤثر بوده و دارای کاربرد وسیع می باشند.

در تحقیق انجام شده توسط Hurst و همکاران در سال ۱۹۹۹ در آزاد ماهی اقیانوس اطلس ترتیب و توالی کامل mt DNA مشخص شد.

Ludwig و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی هتروپلاسمی ناحیه کنترلی mtDNA سه جنس تاس ماهیان (*Acipenser*, *Scaphirhynchus*, *Huso*)، با استفاده از تعیین توالی D-loop پرداخت و عنوان نمود که، واحدهای تکراری ماهیان خاویاری بین ۷۴-۳۸ جفت باز طول دارند. در گونه *Polydon spathula* واحدهای تکراری وجود نداشت. و به این نتیجه کلی دست یافت که، واحدهای تکراری در قسمت TAS وجود داشته و حدود ۵۰ درصد از موتاسیون گونه ای که در D-loop وجود دارد در ۱۰ جفت باز بالادست و پایین دست TAS اتفاق می افتد.

Wirgin در سال ۲۰۰۲ ساختار جمعیتی تاس ماهی اقیانوس اطلس را بر اساس Sequencing ناحیه کنترلی mt DNA بررسی کرد و وجود حداقل هفت ذخیره ژنتیکی را در میان زیر گونه ها مشخص نمود.

در تحقیق انجام شده توسط Gross و همکاران در سال ۲۰۰۲ پلی مرفیسم داخل نواحی ژن ND-3/4 و ND-5/6 در بین جمعیت‌های کپور معمولی متعلق به زیر گونه‌های اروپائی و آسیای شرقی مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی ۱۷۶ نمونه از کشورهای روسیه، ویتنام، ژاپن و مجارستان جمع‌آوری شد. آنان در مجموع ۷ هاپلوتیپ متفاوت را شناسایی کردند و بر این اساس ماهیان را به ۴ گروه اروپایی، آمور، کپور ویتنامی و کپور Koi دسته‌بندی نمودند.

Tianxiang و همکارانش در سال ۲۰۰۳، ۸۳۸ bp از ژن CO میتوکندریایی جمعیت وحشی و پرورشی *Fenneropenaeus chinensis* را تکثیر و تعیین سکانس کردند، و با استفاده از درخت مولکولی فیلوژنتیک سه گروه بزرگتر میگوها را بدست آوردند *Farfantopenaeus*, *Litopenaeus*, *Fenneropenaeus*. نتایج آنها نشان داد که، روابط ژنتیکی نزدیکتری بین *F. aztecus* و *F. indicus*, *F. paulensis* و *F. merguensis* و *L. setiferus* و *L. schmitti* وجود داشت و جنسهای *Litopenaeus* و *Farfantopenaeus* بیکدیگر نزدیک تر بودند.

Huakasi در سال ۲۰۰۳ دو گونه وابسته و نزدیک بهم میگو، *Penaeus merguensis* and *Penaeus silasi* از آبهای Thai، از نظر ژنتیکی با استفاده از تفاوت‌های مشاهده شده در توالی ۵۵۸ bp از سیتوکروم اکسیداز ۱ DNA میتوکندری بررسی شدند که نتایج نشان داد که امکان اینکه *P. merguensis* در واقع دو گونه پیچیده پنهان است یا یک گونه واحد با دو زیرگروه فیلوژغرافیایی است.

Martin cesar و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بکارگیری Sequencing مستقیم ژن D-loop میتوکندریایی ماهی *Leporinus elongates* در برزیل جمعیت‌های وحشی رودخانه پارنا را مشخص نمودند.

در تحقیق انجام شده توسط Kohman و همکاران در سال ۲۰۰۳، ذخایر بومی و جمعیت‌های طبیعی کپور معمولی اروپا، آسیای مرکزی، آسیای شرقی و جنوب شرقی را با روش mtDNA مورد مطالعه قرار گرفت.

در تحقیق انجام شده توسط Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۳، تنوع ژنتیکی بین *Cyprinus carpio* و *C. C. haematopterus* را با استفاده از آنالیز mt DNA در نواحی از اروپا مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از چپیش نوکلئوتیدهای نواحی D-100P و ND-5/6 و آنالیز RFLP تفاوت‌های ژنتیکی بین زیر گونه اروپایی و آسیایی را مشخص شد.

Lavery و همکاران در سال ۲۰۰۴ با بررسی ۱۹ گونه از جنس *Penaeus* بوسیله Sequencing ژن COI و 16S rRNA نتیجه مطالعات قبلی که زیر جنس‌های *Litopenaeus* و *Farfantopenaeus* پارافیلیتیک فرض می شد را رد کردند و نشان دادند که آنالیزهای فیلوژنی صحت وجود ۶ زیر جنس (یا جنس) را تأیید نمی کند.

Aboim و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از توالی یابی ژن D-loop و cyt b ماهی *Helicolenus dactylopterus* در شمال آتلانتیک به مطالعه جمعیت‌های این ماهی پرداخت. نتایج نشان داد که جمعیت‌های پنج منطقه مورد بررسی، تفاوت ژنتیکی معنی داری با هم دارند. خصوصاً این تفاوت، در میانه و شمال آتلانتیک بیشتر است. تفاوت‌های درون جمعیتی نیز در مناطق پنجگانه دیده شد. آنالیز داده‌ها، شروع و گسترش واگرایی جمعیت‌ها

را نیز نشان می داد که علت آن را پدیده تنگنا و یا پدیده هایی مثل جریانات دریایی خاص که جمعیت ها را تحت تاثیر خود قرار می دهند، دانست.

در تحقیق انجام شده توسط Lehoczky و همکاران در سال ۲۰۰۵ تنوع ژنتیکی کپور معمولی با استفاده از ژن های ND-3/4 و ND-5/6 میتوکندری و آنالیز PCR-RFLP و همچنین ۴ لوکوس ریز ماهواره ای مطالعه شده. در این بررسی برای ژن ND-5/6، 4 آنزیم محدودکننده و برای ژن ND-5/6، 2 آنزیم محدودکننده به کار برده شد که پلی مرفیسم را نشان ندادند.

Chakraborty و همکاران در سال ۲۰۰۶ با همین روشهای مولکولی و استفاده از مولکول mtDNA روی گونه های یال اسبی آبهای ژاپن مطالعه قرار دادند و موفق شدند برخی گونه ها را به عنوان گونه های مستقل معرفی نمایند. در تحقیق انجام شده توسط Papasotirpoulos و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از آنالیز توالی یابی از ناحیه mtDNA در کفال ماهیان، به روابط خویشاوندی این خانواده پرداختند. در این تحقیق پنج جنس از خانواده Mugilidae شامل: *Liza aurata*, *Liza ramanda*, *Chelon labrosus*, *Mugil cephalus*, *Liza sallies* و از هر جنس به تعداد ۵ نمونه از دریاچه Messolongi در یونان جمع آوری شدند. سه ناحیه از mtDNA (16s rRNA, 12s rRNA) CO I (تکثیر و توالی یابی شدند. آنالیز توالی یابی نشان داد که بیشترین تفاوت ژنتیکی در بین *M.cephalus* با دیگر جنس های مورد مطالعه بود در حالیکه *L.aurata* و *C.labrosus* نزدیکترین بهم بودند.

Shen و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی Sequencing ژنوم میتوکندریایی از دو میگو *Vannamei leptopenaeus* و *Fenneropenaeus chinensis*، روابط خانواده Penacidae را بررسی کردند.

Samonte و همکاران در سال 2009 با استفاده از روش PCR-Sequencing توانستند گونه های ساردین ماهیان آب شیرین فیلیپین را از نظر فایلوژنی مورد بررسی قرار دهند.

همچنین دیگر پژوهشهای تبارزایی انجام شده در خصوص برخی دیگر از گونه ها شامل:

Sparks Wiley و همکاران در ۱۹۹۸ بر روی Lampridiform و Lopez و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی اردک ماهیان؛ Smith ۲۰۰۴ بر روی ماهیان سیچلاید؛ Vinson و همکاران در سال ۲۰۰۴ در هامور ماهیان و Ilves و Taylor در سال ۲۰۰۹ بر روی Osmeridae نیز کارهای دیگری هستند که در این زمینه انجام شده است.

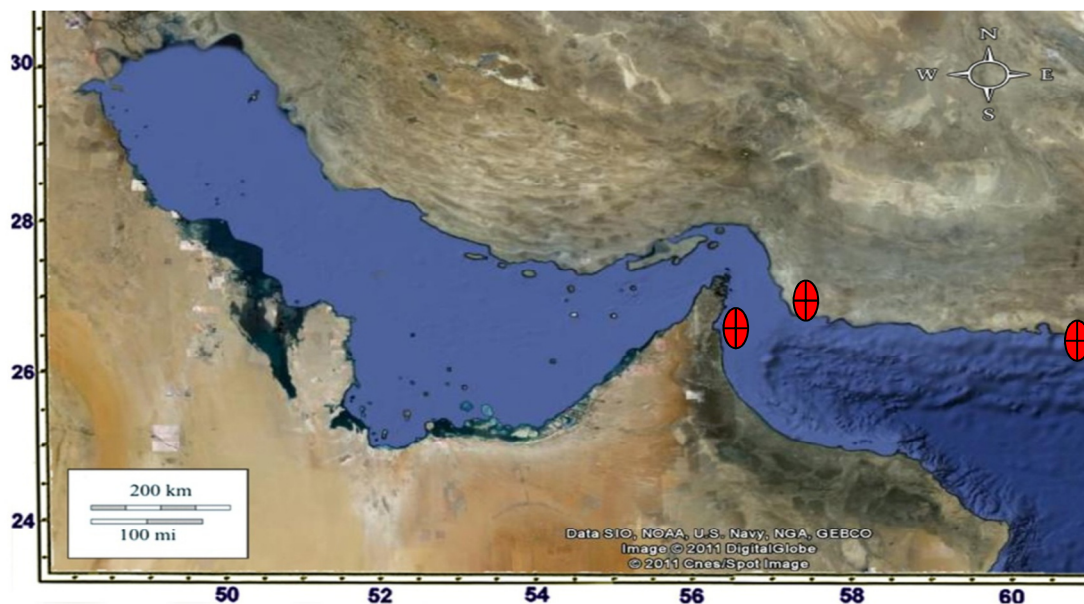
۳- مواد و روشها

۳-۱- نمونه برداری

در این بررسی پس از مطالعه ی اولیه و تعیین ایستگاه ها ۳-۵ گرم از بافت باله ی دمی از ۵۴ عدد ماهی شبه شوریده، از صیدگاه های مناطق جاسک در استان هرمزگان، فجیره در شمال غرب دریای عمان و چابهار در استان سیستان و بلوچستان جدا و در اتانول (۹۶ درصد) فیکس گردیده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر شهرستان ساری منتقل می گردد. کلیه نمونه برداری ها با استفاده از تور ترال انجام گردید.

جدول ۱-۳. موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده

تعداد نمونه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ایستگاه نمونه برداری
۲۰	۲۵° ۴۰' N	۵۷° ۴۶' E	جاسک
۲۰	۲۵° ۷' N	۵۶° ۲۰' E	فجیره
۱۴	۲۵° ۱۷' N	۶۰° ۳۷' E	چابهار



تصویر ۱-۳. موقعیت مناطق نمونه برداری

۳-۲- استخراج DNA به روش استات آمونیوم

تمامی نمونه ها بوسیله شکستن سلول ها، جدا نمودن پروتئین ها و هیدرات های کربن از اسیدهای نوکلئیک و در نهایت رسوب دادن DNA از بافت ها استخراج گردیده .

مواد و تجهیزات مورد نیاز:

STE -

SDS -

- پروتئیناز K
- استات امونیوم
- ایزوپروپانول
- الکل ۷۰ درصد
- آب مقطر
- میکروتیوپ ۱.۵ میکرولیتر
- شیکر
- بن ماری
- سانتریفوژ
- سمپلر
- فریزر (20- درجه سانتی گراد)

به منظور استخراج DNA از ماهیان به روش استات آمونیوم مراحل زیر به ترتیب انجام میگیرد:

۱- حدود ۵۰ میلی گرم از نمونه باله ماهی کاملاً خشک گردیده و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و له می شود.

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

۳- جهت فعال نمودن کامل آنزیم، تیوپ حاوی نمونه به مدت یک دقیقه در شیکر لوله و سپس ۴۵ دقیقه تا ۱ ساعت در شیکر قرار داده شده و پس از آن به مدت یک شب در بن ماری ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد قرار می گیرد، در طی این مدت نمونه به طور کامل هضم شده و بصورت امولسیون غلیظ در می آید.



شکل ۲-۳. دستگاه شیکر لوله (ورتکس)



تصویر ۳-۳. حمام بن ماری

۴- پس از یک شب قرار گرفتن نمونه ها در بن ماری نمونه ها خارج شده و به هر تیوپ ۱۶۰ میکرولیتر استات آمونیوم اضافه می شود و برای مدت حداقل یک ساعت با استفاده از شیکر بهم زده و بلافاصله آن را در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می نمایم .



شکل ۳-۴. دستگاه سانتریفیوژ

۵- به آرامی ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی را توسط یک نمونه بردار جدا کرده و در داخل تیوپ جدیدی ریخته و برای حذف بقایای استات آمونیوم بر روی آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه نموده، لوله ها بوسیله دست به

آرامی چندین مرتبه سر و ته شده و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و فاز بالایی محلول دور ریخته می شود.

۶- جهت خارج نمودن کامل ایزوپروپانول، ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به لوله ها اضافه شده و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ میگردد.

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

۸- پس از خشک شدن بر روی رسوب DNA، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شده و در بن ماری در دمای ۴۰ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شده تا DNA بطور کامل در آب حل و قطعات ناخواسته هضم گردد سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده.

۳-۳- ارزیابی کیفیت DNA به روش الکتروفورز ژل آگارز

در این روش DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ طی مراحل زیر الکتروفورز گردیده :

مواد و تجهیزات مورد نیاز :

- پودر آگارز

- محلول (10X)TBE

- محلول رنگی اتیدیوم برماید

- بافر سنگین کننده^۱

- ارلن مقاوم در برابر حرارت

- دستگاه مولد برق

- سینی مخصوص ژل

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

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

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

۳- سوسپانسون حاصله را روی شعله حرارت داده تا آگارز آن حل و شفاف شود و سپس ارلن در دمای محیط آزمایشگاه قرار میگردد تا سردشود.

۴- محلول حاصله را پس از سرد شدن در سینی ژل ریخته و اجازه داده تا منعقد گردد.

^۱Loading Buffer

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

۶- ۶ میکرولیتر از DNA ژنومی همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملا مخلوط و با دقت به هریک از چاهک های مستطیلی شکل ژل ریخته میشود .

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

۸- پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر، در اتیدیوم بروماید (۱۰mg/mL)، رنگ آمیزی شده و پس از شستشو با آب مقطر کیفیت DNA توسط به دستگاه ژل داکيومنشن مدل DOC-PRINT-1000/26MX ساخت شرکت VILBER LOURMAT کشور فرانسه منتقل گردیده و کیفیت DNA از لحاظ خلوص، آلودگی و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار میگيرد .



تصویر ۳-۵. دستگاه الکتروفورز افقی



شکل ۳-۶. دستگاه مستند ساز ژل

۴-۳- ارزیابی کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری

جهت اندازه گیری کمیت DNA، از اسپکتروفتومتر ساخت شرکت Eppendorf، در محدوده طول موجهای ۲۶۰ nm و ۲۸۰ و با استفاده از فرمول $[DNA]_{ng/mL} = 50 \times D \times A_{260}$ استفاده شد.

A: میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر

D: نسبت رقت $300/5=60$

اگر نسبت جذب $A_1/A_2=1/8$ باشد DNA مناسب است و اگر $A_1/A_2 > 1/8$ باشد DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر نسبت جذب $A_1/A_2 < 1/8$ باشد نشان دهنده ناخالصی و آلودگی با فلن و پروتئین است. DNA استخراجی در این پژوهش DNA استخراجی از کیفیت مناسبی برخوردار بود. سپس نمونه ها برای انجام آزمایش های بعدی در فریزر نگهداری شدند.



شکل ۳-۸. دستگاه اسپکتروفتومتر

۵-۳- طراحی پرایمر

از آنجایی که داشتن توالی DNA مربوط به یک منطقه خاص از ژنوم یک گونه این اجازه را میدهد تا همین منطقه خاص از ژنوم مربوط به گونه های بسیار نزدیک یا جمعیت های مشابه از یک گونه را با همان آغازگر تکثیر کرد، با از مودن نشانگرهای موجود در آزمایشگاه، بهترین نشانگر که مربوط به ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* (Atabeyoglu, 2007) بود انتخاب شد. آغازگرهای مورد استفاده در این روشها بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده، توسط آب مقطر استریل از حالت لیوفیلیزه به حالت محلول درآورده شدند. رقیق سازی آنها به نسبت ۳۰ میکرولیتر آغازگر و ۷۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به صورت جداگانه در میکروتیوب

های ۰/۵ میلی لیتری انجام شد و جهت استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز در فریزر با دمای °C-۲۰ قرار داده شدند (جدول ۲-۳).

جدول ۲-۳. توالی آغازگر مورد استفاده

جایگاه	توالی آغازگر
D-Loop F1	F: 5'- TGGCATTGTTTCCTACTTCAGG -3'
12S1-H	R: 5'- TGCGGAGACTTGCATGTGTAAGT -3'

۳-۶- واکنش زنجیره ای پلیمرز

مقدار مواد لازم برای یک واکنش ۲۵ میکرو لیتری PCR با غلظت‌های زیر بهینه و مورد استفاده قرار میگیرند:

جدول ۲-۳. نوع و حجم مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز

ماده	غلظت مواد	شرکت سازنده	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرو لیتری
DNA استخراجی	متغیر $100 \leq ng$	-	۰/۸ میکرو لیتر
Taq DNA Polymerase	۵u/μ	سیناژن	۰/۵ میکرو لیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	سیناژن	۰/۷۵ میکرو لیتر
PCR Buffer	۱۰X	سیناژن	۲/۵ میکرو لیتر
آغازگر	۱-۱/۵Pmol	-	۱ میکرو لیتر
dNTP _s	۱۰ میلی مولار	سیناژن	۰/۷۵ میکرو لیتر
آب مقطر	-	-	۱۸.۵ میکرو لیتر

۳-۷- بهینه کردن PCR و پروفیل های حرارتی آن

جهت بدست آوردن دمای اتصال پرایمر به DNA الگو ابتدا نمونه ها در دستگاه بر روی شیب حرارتی قرار داده شد، از آنجایی که دامنه حرارتی برای اتصال پرایمر به DNA الگو ۶۵-۷۰ درجه سانتی گراد بدست آمد از اینرودستگاه در یک شیب حرارتی ۶۵-۷۰ درجه سانی گراد قرار داده شد. و دمای اتصال ۶۰ درجه بدست آمد. چیدمان نمونه ها در داخل دستگاه به صورت عمودی بوده چون در ردیف های افقی حرارت یکسان بوده اما در ردیف عمودی دما از بالا به پائین کاهش می یابد.

برای اطمینان از درستی انجام PCR و نداشتن آلودگی، یک میکروتیوب به عنوان کنترل منفی در دستگاه قرار داده شد که محتویات آن شامل مخلوط مواد لازم برای PCR به غیر از DNA الگو بود. البته لازم به ذکر است هرگاه در شرایط استاندارد PCR نتیجه ای مشاهده نشود مقدار MgCl₂ و تعداد سیکل ها تغییر می یابد (Sambrook and Russel, 2006).

در پایان، محصولات PCR به یخچال ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده شد تا جهت سنجش کیفیت محصول PCR در دسترس باشد. پس از این مرحله، محصولات PCR به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

جدول ۳-۳. برنامه های مورد استفاده در دستگاه PCR

مراحل	تعداد چرخه (سیکل)	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان	مراحل
۳ دقیقه	۱	۹۴	۳ دقیقه	Denaturation
۳۰ ثانیه	۳۰	۶۰	۳۰ ثانیه	Denaturation Annealing Extention
۳۰ ثانیه			۶۰	
۳۰ ثانیه			۷۲	
۳ دقیقه	۱	۷۲	۳ دقیقه	Elongation

۳-۸- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز

محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفته و قطعات تکثیر شده از نظر کیفیت و شارپ بودن باند حاصله بررسی شد. محصول PCR طی مراحل زیر الکتروفورز گردید. ۶ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط و با دقت به هریک از چاهک های مستطیلی شکل ژل ریخته شد. در چاهک پایانی از نشانگر DNALadder 50 bp به عنوان شاخص برای تعیین اندازه قطعات حاصل استفاده شد.

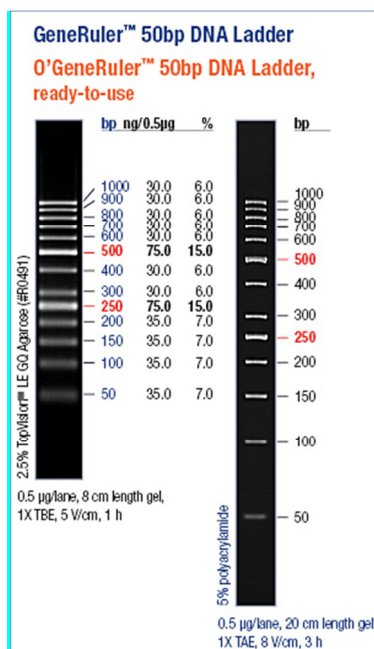
تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۹۰ ولت و ۴۵ میلی آمپر تنظیم گردید، پس از اتمام الکتروفورز و رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل، ژل مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در ظرف محتوی محلول اتیدیوم بروماید و بعد از آن به مدت یک دقیقه در داخل ظرف محتوی آب مقطر قرار داده شد تا قسمتهایی از ژل که به طور غیر اختصاصی رنگ گرفته اند رنگ زدایی شوند.

در انتها ژل مورد نظر توسط کاردک بر روی دستگاه مستندساز ژل با طول موج ۳۱۲-۲۵۴ نانومتر قرار داده شده و قطعات DNA به صورت باندهایی بر روی ژل مشاهده شدند سپس تصویر ژل فریز و با فرمت Tiff ثبت و ذخیره گردید.

بدین ترتیب کیفیت DNA از لحاظ خلوص، آلودگی پروتئینی و شکستگی DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. حال می توان از مطلوب بودن واکنش PCR و عدم تشکیل باندهای غیر اختصاصی مطمئن شد در غیر این صورت واکنش باید مجدداً بهینه و تکرار گردید.

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

پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر، به دستگاه ژل داکيومنشن منتقل گردیده و کیفیت محصول PCR از لحاظ شارپ بودن و نداشتن اسمیر مورد ارزیابی قرار گرفت .



شکل ۳-۹. نشانگر DNA Ladder 50 bp (<http://www.thermoscientificbio.com>)

پس از انجام PCR و ارزیابی محصولات آن، جهت توالی یابی، DNA های با کیفیت بالا که فقط دارای باند اختصاصی باشند با باندهای قوی و بدون آلودگی، به حجم ۴۰ میکرولیتر و غلظت ۲۰ نانومول، به درون میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری جداگانه که شماره ی نمونه ها بر روی در و بدنه ی آنها نوشته شده منتقل شده و در آنها با استفاده از پارافیلیم بسته شد. آغازگر نیز با حجم ۱۰ میکرولیتر و غلظت ۱۰ پیکومول به ازای هر توالی به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری دیگری منتقل، در آن با پارافیلیم بسته و به همراه جدول مشخصات نمونه ها (نام آغازگر، روش تخلیص DNA، حجم DNA، غلظت DNA، اندازه ی آغازگر، نوع واکنش و نام نمونه) برای توالی یابی نمونه های DNA ماهی شبه شوریده توسط شرکت تکاپوزیست به شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال شده و توالی یابی با استفاده از روش خاتمه یابی زنجیره (سانجر کولسان) (Pherson et al., 2000) و توسط دستگاه DNA Sequence Analyzer انجام گردید .

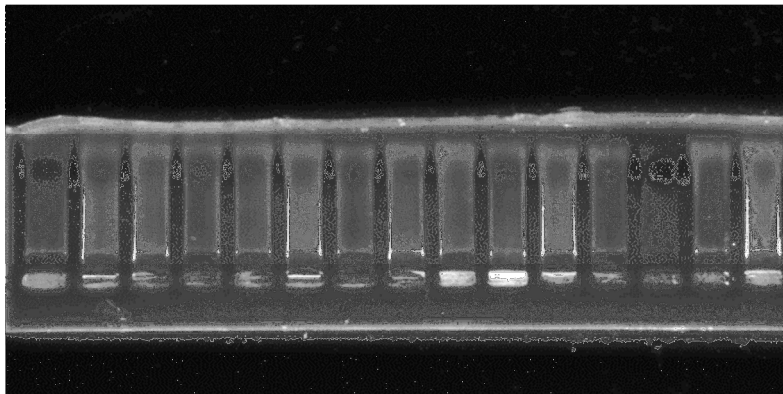
توالی های بدست آمده با استفاده از برنامه Clustal-W (Chenna et al., 2007) در نرم افزار BIOEDIT 7.0.3.1 (Hall, 1999) همتراز شدند . پس از همترازی ، ویژگیهای توالی های نوکلئوتیدی (هاپلوتایپ ها و جایگاه های پلی مورفیسم، تعداد و تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی ، اختلاف ژنتیکی ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، الل های واقعی و موثر، جریان ژنی و واگرایی بین مناطق توسط نرم افزار DnaSP 5.10.0.1 (Librado and Rozas, 2009) و Arlequen و Genepop آنالیز شدند. توالی ها (هاپلوتایپ های متفاوت) در بانک ژنی ثبت شدند. همچنین ماتریس فاصله ژنتیکی توسط برنامه Mega 5 محاسبه شد.

۴- نتایج

نتایج حاصل از بررسی ماهی شبه شوریده دهان سیاه *Atrobuca nibe* در خلیج فارس و دریای عمان به روش توالی یابی به شرح زیر بود:

۱-۴- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کیفیت DNA استخراجی از نظر شکستگی و یا عدم شکستگی DNA، وجود الودگی های پروتئینی و یا RNA توسط روش الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی شد. وجود باندهای شفاف و واضح از مطلوب بودن کیفیت DNA استخراج شده حکایت داشت. کیفیت باندهایی که توسط دستگاه مستندساز ژل با برنامه UVI- DocMw Ver. 99.04 مشاهده شدند در شکل ۴-۱ نمایه شده است. همچنین میزان جذب نوری DNA های استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه گردید و این نسبت در کل DNA های استخراجی بین ۲-۱/۸ به دست آمد که گویای این مطلب است که جذب عمدتاً توسط اسید نوکلئیک صورت گرفته و DNA ها از کیفیت مناسبی برخوردار می باشند.

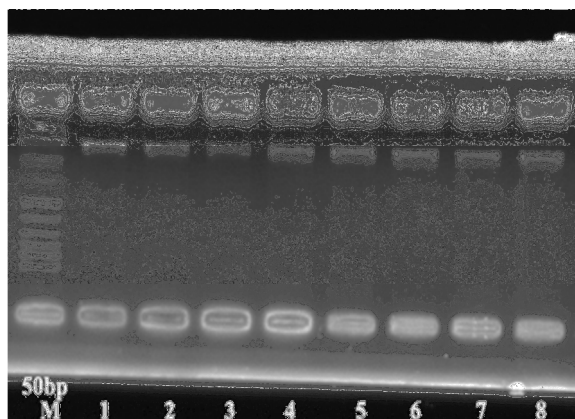


شکل ۴-۱. ارزیابی DNA استخراج شده شبه شوریده خلیج فارس و دریای عمان به روش استات امونیوم

۲-۴- بررسی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز

با استفاده از شیب دمایی^۱، بهترین دمای اتصال هر آغازگر، به رشته ی الگو تعیین شد. کیفیت و کمیت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. همانگونه که مشاهده می شود وزن قطعات در حدود ۶۰۰ جفت باز است.

^۱ Temperature Gradient



شکل ۴-۲. ارزیابی محصول PCR شبه شوریده خلیج فارس و دریای عمان

۳-۴- بررسی تنوع ژنتیکی

نتایج بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت شبه شوریده در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از توالی یابی ژن D-Loop، با طول تقریبی ۲۳۰ جفت باز، توسط CIUSTAL-W، در سه ناحیه جاسک، فجیره و چابهار به ترتیب ۳۷، ۴۷ و ۳۹ جایگاه پلی مورف و ۲۰ هاپلوتیپ ثبت شد (جدول ۴-۱). در ناحیه جاسک هاپلوتیپ های شماره (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸)، در فجیره هاپلوتیپ های شماره (۲، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷) و در چابهار هاپلوتیپ های شماره (۲، ۶، ۱۸، ۱۹، ۲۰) مشاهده شدند. بیشترین تنوع هاپلوتیپی درون نواحی مورد بررسی در فجیره (۰.۹۳) و کمترین در چابهار (۰.۸۳) ثبت گردید. بیشترین و کمترین تعداد هاپلوتیپ به ترتیب در فجیره (۱۱ هاپلوتیپ) و چابهار (۵ هاپلوتیپ) ثبت گردید. در فجیره نیز بیشترین تنوع نوکلئوتیدی مشاهده گردید (۰.۱) و این شاخص در چابهار و جاسک به میزان مساوی محاسبه شد (۰.۰۸). در همین محاسبه بیشینه ی تعداد جایگاه های پلی مورف در فجیره (۴۷) و کمینه ان در جاسک (۳۷) بدست آمد (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲- تنوع نوکلئوتیدی ($p(\pi)$)، تعداد هاپلوتایپ (n)، تنوع هاپلوتایپ (h)، تعداد جایگاه پلی مورف

نواحی نمونه برداری	π	n	h	تعداد جایگاه پلی مورف
جاسک	۰.۰۸	۸	۰/۸۹	۳۷
فوجیره	۰.۱۲	۱۱	۰/۹۳	۴۷
چابهار	۰.۰۸	۵	۰/۸۳	۳۹
میانگین	۰.۱۰		۰.۸۸	

بر اساس داده های جدول ۴-۳ بیشترین فاصله یا طول اتصال (29) بین هاپلوتایپهای 18 و 19 چابهار و کمترین آن (3) بین هاپلوتایپهای 8 و 2 جاسک مشاهده گردید.

جدول ۴-۳- ارتباط بین هاپلوتایپ های ماهی شبه شوریده در مناطق مورد مطالعه

مناطق	گروه اول	گروه دوم	طول اتصال
جاسک	Hap 1	Hap 7	17
	Hap 7	Hap 2	17
	Hap 2	Hap 8	3
	Hap 2	Hap 6	7
	Hap 6	Hap 5	14
	Hap 5	Hap 3	21
	Hap 3	Hap 4	22
	Hap 2	Hap 9	4
	Hap 9	Hap 6	5
	Hap 2	Hap 16	12
	Hap 2	Hap 15	23
	Hap 15	Hap 13	22
	Hap 13	Hap 10	5
	Hap 13	Hap 12	10
فجیره	Hap 12	Hap 17	14
	Hap 17	Hap 11	12
	Hap 13	Hap 14	17
	Hap 2	Hap 6	7
	Hap 6	Hap 20	25
	Hap 20	Hap 18	6
	Hap 18	Hap 19	29
چابهار			

ارزش p در تعادل هاردی واینبرگ (HWE p-value) در چابهار بیشترین بود (0.041) و در جاسک کمترین (0.004) بدست آمد. الل های موثر در جاسک بیشترین (2/89) و در چابهار کمترین مقدار (2/48) را به خود اختصاص دادند. اللهای مشاهده شده حداکثر در فجیره (15) و در چابهار کمتر از سایر نواحی (12) الل بدست آمد. متنوع ترین جمعیت ژنی گونه ی مورد مطالعه در فجیره (0.93±0.06) و کم تنوع ترین جمعیت ژنی گونه ی مذکور در چابهار (0.83±0.07) تخمین زده شد. همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار بعنوان شاخصی از گوناگونی ژنتیکی برای هر منطقه محاسبه گردید (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴- هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، ارزش p در تعادل هاردی واینبرگ، تعداد الل موثر، تعداد الل مشاهده شده، گوناگونی ژنتیکی.

نوع ژنی	تعداد الل مشاهده شده	تعداد الل موثر	HWE p-value	H_E	H_O	
۰/۸۹	۱۴	۲/۸۹	۰/۰۰۴	۰.۶۹	۰.۴۷	جاسک
۰/۹۳	۱۵	۲/۵۵	۰/۰۳۱	۰.۷۲	۰.۵۰	فجیره
۰/۸۳	۱۲	۲/۴۸	۰/۰۴۱	۰.۶۷	۰.۴۵	چابهار

۴-۴- ترکیب نوکلئوتیدی

فراوانی هر یک از بازهای تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین (به درصد) و مقدار بازهای انتقالی^۱ و متقاطع^۲ جهت تخمین شاخص R نیز محاسبه شد (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۵- ترکیب نوکلئوتیدی (به درصد)، بازهای انتقالی، متقاطع و شاخص R در نواحی مورد مطالعه

R	t_v	t_i	G	A	T	C	ناحیه نمونه برداری
۱	۲۲	۲۲	۲۵.۹۱	۲۳.۲۵	۳۳.۸۸	۱۶.۹۶	جاسک
۱.۰۸	۲۴	۲۶	۲۵.۳۱	۲۴.۰۱	۳۳.۲۰	۱۷.۴۸	فجیره
۰.۸۵۷	۲۱	۱۸	۲۵.۲۵	۲۳.۷۷	۳۳.۷۴	۱۷.۲۴	چابهار
۰.۹۷	۲۲.۳۳	۲۲	۲۵.۴۹	۲۳.۶۷	۳۳.۶۰	۱۷.۲۲	میانگین

۴-۵- بررسی داده های ژنتیکی جفت نواحی

بیشترین میزان فاصله ژنتیکی بین جفت نواحی جاسک و فجیره (۰/۱۱) و کمترین فاصله میان جفت نواحی فجیره و چابهار بدست آمد بر این اساس بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی به ترتیب در فجیره-چابهار (۰/۹۷) و فجیره-جاسک (۰/۸۹) مشاهده شد (جدول ۴-۴).

¹ Transitions

² Transversion

جدول ۴-۶- ماتریس فواصل ژنتیکی و شباهت ژنتیکی (Nei, 1972) در مناطق مختلف نمونه برداری (اعداد بالای قطر مربوط به فاصله ژنتیکی و زیر قطر مربوط به شباهت ژنتیکی می باشد).

چابهار	فوجیره	جاسک	
۰/۰۴	۰/۱۱	۰/۰۰	جاسک
۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۸۹	فوجیره
۰/۰۰	۰/۹۷	۰/۹۶	چابهار

در مقایسه جفت نواحی ، بیشترین تعداد هاپلو تیپ ها بین نواحی چابهار-فجیره (۲۶) و کمترین بین جاسک-چابهار (۱۴) بدست آمد. بیشترین گوناگونی هاپلو تیپی بین نواحی چابهار-فجیره (۱.۰۰) و فاکتور مذکور بین جفت نواحی جاسک-چابهار و جاسک-فجیره مساوی (۰.۹۳) محاسبه شد بالاترین تنوع نوکلئوتیدی بین نواحی چابهار و فجیره (۰.۰۵) و در نواحی جاسک و چابهار به مقدار کمتر (۰.۰۱) ثبت گردید. (جدول ۴-۷).

جدول ۴-۷- مقایسه ی تعداد هاپلو تیپ ها (H)، گوناگونی هاپلو تیپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (P_iT) در جفت نواحی مورد مطالعه

P _i T	Hd	H	نواحی مورد مقایسه
۰.۰۲	۰.۹۳	۲۰	جاسک-فجیره
۰.۰۵	۰.۹۳	۱۴	جاسک-چابهار
۰.۰۱	۱.۰۰	۲۶	فجیره-چابهار

بالاترین جریان ژنی بین نواحی فجیره و چابهار (۲.۷۴) و پایین ترین ، بین جاسک و فجیره (۱.۷۸) دیده می شود. همچنین آزمون واگرایی^۱ نشان داد که بیشترین واگرایی بین نواحی فجیره و چابهار (۰.۰۲٪) و این شاخص در بین نواحی جاسک و چابهار کمتر (۰.۰۱٪) می باشد (جدول ۴-۸).

جدول ۴-۸- اختلاف ژنتیکی (F_{st}) ، جریان ژنی (N_m) ، واگرایی (D_{xy}) میان جفت نواحی مورد مقایسه

D _{xy}	N _m	F _{st}	نواحی مورد مقایسه
۰.۰۲	۱.۷۸	۰.۱۲	جاسک-فجیره
۰.۰۶	۲.۷۴	۰.۰۸	فجیره-چابهار
۰.۰۱	۱.۹۲	۰.۱۱	جاسک-چابهار

^۱ Divergence

۵- بحث

آشکارسازی پراکنش جغرافیایی، تمایز ریختی و ویژگیهای پایه ای ژنتیکی، یکی از پایه ای ترین نیازها در مدیریت دانش بنیان و حفاظتی گونه هاست. اما باید توجه داشت که شاخص های مورفولوژیک روش مطمئنی جهت تفکیک جمعیت های احتمالی نمی باشند (Sorgeloos, 1997). به همین دلیل از نشانگرهای ژنتیکی به صورت موفقیت آمیزی جهت ایجاد ارتباط میان جمعیت های ابریان و تعیین ساختار ذخایر آنها استفاده میشود (Herweden et al., 2006). تعیین توالی ژنوم جانداران با پیشرفت و تجهیز دستگاه های تعیین توالی و نرم افزارهای تخصصی مطالعات ژنتیکی، متداول، آسان تر و به دور از هرگونه خطا است (Hedrick, 1999). بهره گیری از ژنتیک جمعیت ابریان یکی از راههای مطالعه ساختار ژنتیکی جهت مطالعه و بررسی گوناگونی های درون گونه ای موجودات ابری است، زیرا مطالعه و بررسی تنوع زیستی و ساختار ژنتیکی جمعیت ابریان و همچنین ارتباط های سیستماتیک این موجودات درک روشنی از ساختار جوامع زیستی می دهد (Rezvani Gilkolaei et al., 2007). پلی مورفیسم دی ان ا شاخص ژنتیکی بسیار مهمی در ارزیابی ساختار جمعیتی و محافظت از ذخایر ژنی گونه ها می باشد (Taggart et al., 1992). انجام مطالعات جهت مدیریت برداشت و حفظ تنوع ژنتیکی ماهیان موجود در سواحل و مصب ها اهمیت دو چندان دارد، زیرا بر خلاف ماهیان اقیانوسی و مناطق مرجانی، که ساختار ژنتیکی تقریباً یکنواختی را از خود نشان می دهند (Horne et al., 2008). همچنین اهمیت صید و صیادی در آبهای ساحلی زیاد است و به همین نسبت، دانش ما از این ابریان نسبت به سایر ابریان کمتر می باشد (Blaber, 2002).

DNA بارها جهت مطالعه روابط تبارزایی در انواع گروه های جانوری استفاده شده است (Stepien et al., 1997). ژن های میتوکندریایی به مراتب سریع تر از ژن های هسته ای تکامل می یابند. در نتیجه توانایی بیشتری جهت نشان دادن تفاوت های موجود بین نوکلئوتید های نزدیک به هم را دارا می باشند (علی آبادیان و همکاران، ۱۳۹۱). معمولاً از این ژن ها جهت نمایان ساختن واگرایی میان جمعیت هایی که برای مدت کوتاهی از هم جدا شده اند، استفاده می شود. میزان واگرایی ژنتیکی مشاهده شده میان گونه های متفاوت، نسبت به واگرایی ژنتیکی درون گونه ای بیشتر می باشد. نتایج حاصله از بررسی و مقایسه دی ان ا میتوکندریایی در گونه های متفاوت، فاصله های آرایه شناختی را نمایان می سازند که توسط پژوهشگران، به عنوان گونه تلقی می شود (Hebert et al., 2004).

یکی از مواردی که در روش توالی یابی ژنوم میتوکندریایی بررسی و مقایسه می شود، درصد نوکلئوتیدهای مختلف است. در بررسی کنونی ترکیب نوکلئوتیدی A: ۲۳/۶۷٪، C: ۱۷/۲۲٪، G: ۲۵/۴۹٪ و T: ۳۳/۶۰٪ با نسبت GC برابر ۴۲/۷۱٪ بدست آمد. Ward و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی خود میانگین نسبت GC را در سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ در ۱۴۳ گونه ماهی استخوانی^۱ ۴۷/۱٪ و در بین ۶۱ گونه از ماهیان غضروفی

^۱ Teleost

۴۲/۲٪ بدست آوردند همچنین بیان نمودند که نسبت GC در بین سفره ماهی ها بیشتر از کوسه ماهیان بود. Pardo و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی خود بر روی ژن 16S rRNA بر روی ۳۰ گونه از کفشک ماهیان، میانگین درصد نوکلئوتیدها را چنین محاسبه کردند A: ۲۹/۰۷٪، C: ۲۵/۸۳٪، G: ۲۲/۳۶٪ و T: ۲۲/۷۴٪. همچنین میزان نسبت CG، ۴۸/۲٪ برآورد شد. نتایج بررسی حاضر نشان دهنده اختلاف نسبی با نتایج بدست آمده از ماهیان دیگر خانواده ها می باشد. دلایل تفاوت در نسبت GC در ماهیان هنوز شناخته نشده اند (Ward, 2005). جانیشینی نوکلئوتیدی که در بین بازهای یک توالی رخ می دهد از نوع Transition و Transversion است. Transition زمانی رخ می دهد که یک باز پورین (A و G) به باز پورین دیگر و یا یک باز پیریمیدین (C و T) به باز پیریمیدین دیگر تبدیل شود و Transversion زمانی رخ می دهد که یک باز پورین به باز پیریمیدین و یا بالعکس تبدیل شود و این دو فاکتور به عنوان شاخص های تنوع مولکولی مطرح می باشند (Tamura et al., 2004). در این مطالعه بیشترین تعداد Transition و Transversion در فجیره مشاهده شد.

هاپلو تیپ ها، شاخص خوبی جهت تعیین میزان گوناگونی ژنتیکی میان جمعیت ها است. تراز تنوع هاپلو تیپی میتواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلو تیپ های مشابه) تا یک (همه افراد جمعیت دارای هاپلو تیپ های متفاوت) متغیر باشد (Abiom et al., 2005). در تحقیق حاضر بیشترین تعداد هاپلو تیپ ها در فجیره ثبت گردید. جاسک ۸ و چابهار ۵ هاپلو تیپ داشت. دو هاپلو تیپ (شماره ۲ و ۶) در همه نواحی به صورت مشترک دیده شد. در این بررسی بیشترین طول اتصال (۲۹) بین هاپلو تیپهای ۱۸ و ۱۹ چابهار و کمترین آن (۳) بین هاپلو تیپهای ۲ و ۸ جاسک مشاهده شد. بیشترین طول اتصال نشان دهنده بیشترین میزان شباهت میان هاپلو تیپ ها می باشد. هاپلو تیپ شماره ۲ بیشترین درصد فراوانی را در نواحی جاسک، چابهار و فجیره به میزان ۰/۲۶۷، ۰/۲۸۶ و ۰/۳۳۳ دارا بود. بیشترین و کمترین تنوع هاپلو تیپی به ترتیب در فجیره (۰/۹۳) و چابهار (۰/۸۳) بدست آمد. بالاترین تنوع نوکلئوتیدی در فجیره به مقدار (۰/۱) و در مناطق جاسک و چابهار به مقدار کمتر و مساوی (۰/۰۸) دیده شد. میانگین تنوع هاپلو تیپی (۰/۸۸) و نوکلئوتیدی (۰/۰۸) محاسبه گردید (جدول ۴-۲). بالاترین تنوع هاپلو تیپی بین جفت نواحی فجیره-چابهار ثبت شد (۰/۱) که به علت در بر داشتن اکثریت هاپلو تیپ های حاصل از این بررسی است. تنوع هاپلو تیپی در جفت نواحی های فجیره-جاسک و چابهار-جاسک به میزان مساوی محاسبه شد (۰/۹۳) (جدول ۴-۷). بیشترین تنوع نوکلئوتیدی بین جمعیت های فجیره و چابهار (۰/۰۵) و کمترین مقدار این شاخص در بین جمعیت های چابهار و جاسک (۰/۰۱) بدست آمد (جدول ۴-۷). مقدار شاخص های مورد اشاره در فجیره مقدار بیشتری را به خود اختصاص دادند. در توجیه این مطلب دلایل مختلفی را می توان ذکر نمود: ناحیه فجیره میتواند زیستگاه جمعیت های مختلفی از گونه مورد نظر باشد، و یا افزایش شاخص های مذکور را می توان نشان دهنده پویایی ژنتیکی بالا و مناسب تر بودن ساختار جمعیتی این ناحیه نسبت به سایر نواحی به علت فرصت بیشتر برای تکثیر طبیعی، بهره برداری بهینه از منابع شیلاتی آن و عدم تخریب زیستگاه طبیعی دانست. همچنین این نکته حائز اهمیت است که تعداد نمونه ها در بررسی حاضر به علت وجود برخی محدودیت ها کم می باشد و

این می تواند خود عاملی باشد در حصول برخی نتایج. کمینه پارامترهای بحث شده در چابهار مشاهده شد. دادن یک معنای زیستی به پارامترهای مذکور اسان نیست اما نتایج حاصله می تواند حکایت از استرس های محیطی این منطقه باشد، چابهار یکی از قطب های اصلی صید صیادی کشور است این امر در کنار این موضوع، در این منطقه ازاد نرخ رفت و آمد کشتی های بالا است نیز میتواند دلیلی بر افزایش استرس و الودگی این ناحیه باشد. همچنین تخریب زیستگاه، الودگی ها حاصل از عبور و مرور کشتی ها (الودگی های محیطی) می توانند از سایر عوامل موثر باشند. در واقع تنوع ژنتیکی در گونه هایی که در محیط های ناپایدار و پر استرس زندگی می کنند، نسبت به گونه های مشابه در محیط های پایدار بیشتر است اما در دوره های کوتاه تکاملی (چند نسل)، چنانچه گونه ای به مدت طولانی در معرض آلودگی قرار گیرد، در محدوده ی سنی خاصی تحت فشار صید باشد، زیستگاه طبیعی آن از بین برود و یا مکان تخم ریزی آن محدود شود، تنوع ژنتیکی آن کاهش خواهد یافت و یا اینکه صید بی رویه ماهیان بالغ و عدم جایگزینی آنها در طی نسل های مختلف سبب گشته است که تنها تعداد معدودی قادر به ازدیاد نسل باشند در نتیجه ماهیان زاده شده، از مولدین اندکی تولید می گردند که این امر سبب کاهش تنوع ژنتیکی می گردد. پایین بودن میزان تنوع ژنتیکی علاوه بر عوامل محیطی و خارجی می تواند متأثر از رفتار ذاتی یعنی محدود بودن قلمرو پراکنش گونه ی مورد مطالعه باشد (Welch et al., 2010).

Ovenden و همکاران با مطالعه ای که در سال ۱۹۹۲ بوسیله توالی یابی ژن میتوکندری جمعیت های مختلف *P. Argus* انجام دادند دامنه تنوع هاپلوتیپی را ۰/۹۷-۰/۹۵ بیان نمودند. در بررسی ساختار جمعیتی تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstadii*) که توسط Pourkazemi و همکاران در ۱۹۹۶ با استفاده از توالی یابی ناحیه D-LOOP انجام شده است، هفت ترکیب هاپلوتیپی مختلف در این گونه گزارش شد همچنین میانگین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۷۵ بیان شد. Lankford و همکاران در سال ۱۹۹۹ با توالی یابی mtDNA در ماهی *M. undulatus*، میزان تنوع هاپلوتیپی را ۰/۶۲-۰/۴۷ و تنوع نوکلئوتیدی را ۰/۳۲-۰/۰۷ محاسبه نمودند. در مطالعه ای که Abiom و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از توالی یابی ژن D-LOOP در ماهی *H. dactylopterus* انجام دادند تنوع هاپلوتیپی ۰/۰۱-۰/۹۱ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۳-۰/۰۰۵۹ بدست آمد. پارامترهای محاسبه شده با داده های حاصل از این پژوهش همخوانی ندارند که با توجه تفاوت در گونه مورد مطالعه و منطقه مورد بررسی توجیه پذیر است.

هتروزیگوسیتی یکی از شاخص های بسیار مهم در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتها می باشد. هتروزیگوسیتی از این روی اهمیت دارد که در طی فرایندهای طبیعی نوترکیبی^۱ و جدایی^۲، امکان تولید گستره ای از ژنوتیپ ها را، برای بهره برداری شایسته از منابع به روشهای مختلف، فراهم می آورد. در نتیجه به عنوان شاخص مناسبی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در یک جمعیت در نظر گرفته می شود (Fei et al., 2007). مطالعات صورت گرفته نشان می

¹Recombination

²Segregation

دهند که اکثر مواقع افرادی که دارای هتروزیگوسیتی بیشتری می باشند، نسبت به افرادی که دارای هتروزیگوسیتی کمتری هستند، در ویژگیهای مختلفی مانند رشد، باروری، و پایداری در برابر بیماری ها، برتری دارند (Xu et al., 2001). در مطالعه حاضر، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بین جمعتهای بررسی شده در محدوده ۰/۵۰ - ۰/۴۵ با میانگین کل ۰/۴۷ بود. کمترین مقدار هتروزیگوسیتی دیده شده در نمونه های چابهار (۰/۴۵) و بیشترین هتروزیگوسیتی دیده شده، در نمونه های فجیره (۰/۵۰) مشاهده شد. دامنه هتروزیگوسیتی برآورد شده بین ۰/۶۷ تا ۰/۷۷ با میانگین ۰/۷۱ بود. فجیره بیشترین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را داشت (۰/۷۲) و در ناحیه چابهار هتروزیگوسیتی برآورد شده به میزان کمتر (۰/۶۷) مشاهده شد. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی برآورد شده مقدار پایین تری را به خود اختصاص داد (جدول ۴-۴) که نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی و کاهش تنوع ژنتیکی در نمونه ها است. پایین بودن هتروزیگوسیتی مشاهده شده $0.45 < H_o < 0.50$ می تواند در اثر عواملی مانند تخریب تخمیرز گاه ها، کاهش شدید جمعیت در اثر صید زیاد یا عواملی مانند درون آمیزی و یا انتخاب طبیعی می تواند باشد (Hauser et al., 2002; Zheng et al., 2009). هتروزیگوسیتی در ماهیان می تواند پیرو ویژگیهای زیستی و بازتابی از زیستگاه آنها باشد. معمولاً گونه های دریایی دارای سطوح تنوع ژنتیکی بالاتری (میانگین $He = 0.79$) نسبت به گونه های آب شیرین (میانگین $He = 0.46$) و گونه های رود کوچ (میانگین $He = 0.68$) می باشند (DeWoody and Avise, 2000). بنابر این میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار، در بررسی حاضر محدوده $0.72 < He < 0.67$ با میانگین ۰/۷۱ نامعمول نیست.

ناحیه فجیره دارای هتروزیگوسیتی بیشتری نسبت به نواحی دیگر بود این در حالی است که چابهار کمترین میزان هتروزیگوسیتی را به خود اختصاص داد، این مطلب نشان دهنده این است که میزان تغییرپذیری و جهش در فجیره نسبت به دیگر جایگاه ها متفاوت است. در واقع می توان بالاتر بودن هتروزیگوسیتی در فجیره را نشانه بالا بودن تنوع و ساختار مناسب تر جمعیت و یا عدم تخریب زیستگاهی، برون زادآوری و... در این مناطق نسبت به دیگر ایستگاه های بررسی شده دانست.

خوش خلق در سال ۱۳۸۵ در بررسی بر روی تاسماهی ایرانی دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴ - ۰/۸۶ و دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۳ - ۰/۸۳ نشان داد. نوری در سال ۱۳۸۶ در ماهی ازون برون دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۲۳۱ - ۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۵۷ - ۰/۵۴۳ محاسبه نمود. قلیچ پور در سال ۱۳۸۹ در بررسی روی کپور ماهی معمولی *Cyprinus carpio* در دریای خزر میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده را در دامنه ۱/۰۰ - ۰/۹۶ (میانگین ۰/۹۹) و هتروزیگوسیتی برآورد شده را در دامنه ۰/۹۳ - ۰/۷۹ (میانگین ۰/۹۰) به دست آورد و نتیجه گیری نمود که این ماهی با وجود فشار صیادی هنوز از نظر ژنتیکی وضعیت خوبی دارد. Jug و همکاران در سال ۲۰۰۵ با بررسی بر روی *Salmo marmoratus* در دریاچه آدریاتیک

دامنه دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۱۲ - ۰/۶۵ و دامنه هتروزیگوسیتی بر آورد شده ۰/۰۶ - ۰/۷۲ برآورد نمودند.

در بررسی های میزان تنوع ژنتیکی، غنای آلی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای اهمیت بیشتری می باشد زیرا بالا بودن غنای آلی نشان دهنده بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر است و بهره گیری از آن جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی که برای برنامه های بهگزینی یا حفاظت انتخاب شده اند، مناسب تر می باشد (Diz and Persa, 2009). در این بررسی فجیره بیشترین میزان غنای آلی (۱۵) را دارا بود و چابهار کمترین مقدار (۱۲) را از نظر این پارامتر به خود اختصاص داد. طبق مطالب ذکر شده مشاهده می شود که تنوع هاپلو تپیی و هتروزیگوسیتی نیز موید این موضوع می باشند.

متوسط تعداد آلله‌ها در هر جایگاه ژنی، در ماهیان آب شور (۲۰/۶)، در ماهیان آب شیرین (۷/۵) و در ماهیان رود کوچ (۱۱/۳) گزارش شده است (Dewoody and Avise, 2000) اما مطابقت نداشتن داده حاصل از این بررسی را میتوان به علت محدود بودن فضای کاری و تعداد نمونه ها دانست.

پلی مورفیسم در ژنوم موجودات به عنوان شاخص ژنتیکی ارزشمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی به منظور حفاظت از ذخایر ژنی گونه ها محسوب می شود (Thai et al., 2006). طی مطالعات صورت گرفته مشخص شد که بیشترین تعداد جایگاه پلی مورف را فجیره (۴۷) و کمترین را جاسک (۳۷) به خود اختصاص داد، که با توجه به به تعداد هاپلو تپیی ها و تنوع هاپلو تپیی ذکر شده دور از ذهن نمی نماید.

در بررسی حاضر، نتایج بدست آمده از بررسی میزان ترازمندی هاردی- واینبرگ نشان داد هر سه منطقه بررسی شده دارای انحراف معنی داری از این تراز هستند ($p < 0.05$) (جدول 4-4). ترازمندی هاردی - واینبرگ در جوامعی صادق است که شرایطی چون شمار بالای افراد، جمعیت بسته، جفت گیری تصادفی و احتمال جهش بالا در آن حکم فرما باشد (Hardy, 1908; Weinberg, 1908; Wright, 1969). انحراف از تراز هاردی-واینبرگ در جمعیت ماهیان زیاد دیده می شود (خارا و همکاران ۱۳۸۷، رضایی و همکاران ۱۳۹۰، صفری و همکاران، ۱۳۸۶). دلایل زیستی انحراف از تعادل به خوبی شناخته نشده است اما فاکتورهای زیادی مانند اثر وهلاندر (ترکیب شدن جمعیت‌های با فراوانی آلی مختلف که سبب افزایش هموزیگوسیتی می شود) و درون آمیزی (جفتگیری بین افراد خویشاوند که عامل کاستی هتروزیگوسیتی می شود) را می توان از عوامل مؤثر در این پدیده ذکر کرد (Diz and Pesa, 2009). مشاهدات همسانی در خروج از تعادل هاردی- واینبرگ در دیگر ماهیان دریایی و دیگر مناطق بررسی شده نیز دیده شده است.

خوش خلقی در سال ۱۳۸۵ در مطالعه تاسماهی ایرانی، در تمام جایگاه‌ها، انحراف از تعادل را ناشی از مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری، تلاقی خویشاوندی، خطای نمونه برداری با توجه به اندازه کوچک جمعیت‌ها و تعداد کم نمونه‌ها در بعضی از مناطق اعلام کرد. رضایی و همکارانش در سال ۱۳۸۹ با بررسی ماهی سفید، علت انحراف را عملیات تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر اعلام کردند. سالاری در سال ۱۳۸۸ در بررسی

روی ماهی، اکثر جایگاه های بررسی شده را خارج از تعادل معرفی نمود. کشیری و همکارانش در سال ۱۳۹۰ در بررسی روی ماهی کلمه در مناطق انزلی و گمیشان از ۲۰ ایستگاه بررسی شده در ۱۰ مورد، انحراف معنی داری از تعادل یافتند و دلیل این امر را کاهش هتروزیگوسیتی بیان نمودند. Rocha-Olivares و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی بر روی صخره ماهی مکزیکی مشاهده نمودند که همه ایستگاه ها در تعادل قرار دارند. Alam و Islam در سال ۲۰۰۵ در بررسی ژنتیک جمعیت *Catla catla* علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به اندازه کم نمونه ها نسبت دادند. Brigitte و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی جمعیت اردک ماهی (*Esox lusius*) پرداختند و انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در ده درصد جمعیتها به ازای کل جایگاه ها یافتند که دلیل آن را اندازه کوچک جمعیتها ناشی از حوادث پس از یخبندان بیان نمودند. Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua*، انحراف در تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هوموزیگوسیتی، رانش ژنتیکی و کافی نبودن نمونه ها بیان کردند.

جریان ژنی یکی از مهمترین معیارها در تکوین ساختار جمعیتی گونه های مورد مطالعه است به طوری که میزان آن بیانگر واحد تکاملی مستقل جمعیتهای محلی یک منطقه می باشد (Slatkin, 1993). میزان جریان ژنی به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقه دیگر در طی یک نسل اطلاق می شود. عوامل مختلفی بر میزان جریان ژنی تاثیر گذار است یکی از این عوامل جریان های ابی است. جریان های ابی ناشی از بادهای موسمی یکی از عواملی هستند که به افزایش مهاجرت و به دنبال آن جریان ژنی کمک می کنند. از دیگر عوامل موثر طول عمر گونه ابزی می باشد که با توجه به این که گونه شبه شوریده دهان سیاه دارای سن بالایی است (۱۴ سال) (سالارپوری، ۱۳۹۲)، در نتیجه امکان مهاجرت و در واقع دارای شانس بیشتری جهت انجام مهاجرت و پراکنش و به دنبال اینها جریان ژنی دارد. از دیگر عواملی که تاثیر مطلوبی بر مهاجرت و تبادل ژنی دارد، می توان به روش تولیدمثل اشاره کرد. جمعیت هایی که از طریق برون امیزی تولیدمثل میکنند قادر به تبادل ژنتیکی بیشتری در مقایسه با جمعیت هایی که فقط از طریق درون امیزی تولیدمثل می کنند می باشند (ملکیان، ۱۳۹۲). از دیگر عوامل تاثیر گذار فاصله جغرافیایی است که با توجه فاصله ایستگاهها، میزان مهاجرت در این پژوهش با میزان فاصله جغرافیایی مطابقت ندارد، یکی از علل این مطلب را میتوان خواستگاه گونه شبه شوریده دهان سیاه را نام برد. با توجه به این که این گونه از اقیانوس هند وارد دریای عمان می شود می تواند تاثیر بسزایی در ایجاد تفاوت در میزان جریان ژنی و عدم تطابق فاصله جغرافیایی و جریان ژنی داشته باشد. با توجه به مطالب ذکر شده مهاجرت گونه مورد بحث و تبادل ژنی این گونه امری دور از انتظار نیست. هر چه میزان جریان ژنی بین دو منطقه بیشتر باشد بیانگر آن است که مهاجرت بین مناطق بیشتر بوده و اختلاف ژنتیکی کمتر است. نقش اختلاف ژنتیکی و جریان ژنی وابسته به آن در شکل گیری الگوی اختلاف ژنتیکی، از نظر تئوری و تجربی به خوبی به اثبات رسیده است (Rousset, 2004). بر اساس گزارش Li و همکاران در سال 2007، هرگاه $Nm > 1$ باشد، جریان ژنی و هرگاه $Nm < 1$ باشد، رانش ژنتیکی اصلی ترین عامل در ایجاد تمایز ژنتیکی است. بنابراین از آنجا که

میزان جریان ژنی در مطالعه حاضر (۲/۱۴) بزرگتر از یک به دست آمد، عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی جمعیت‌های ماهی شبه شوریده دهان سیاه در نواحی مورد مطالعه جریان ژنی بوده است. با توجه به میزان جریان ژنی مشاهده شده، میزان اختلاف ژنتیکی بررسی شده دور از انتظار نیست، اختلاف ژنتیکی که آن را با شاخص F_{ST} نمایش میدهند، روش مرسوم برآورد تمایز ژنتیکی در مطالعات ژنتیکی می باشد. F_{ST} بیشتر شامل اندازه گیری تمایز در زیر جمعیتها است و بیشترین کاربرد را در آزمون واگرایی ژنتیکی کل در بین زیر جمعیتها دارد و مقدار آن همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ زیر جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود زیر جمعیت و جدایی کامل جمعیتها) متغیر است. در این بررسی بیشترین اختلاف ژنتیکی بین جفت جمعیت های فجیره-جاسک (۰/۱۲) و کمترین مقدار این شاخص بین جمعیت های فجیره-چابهار (۰/۰۸) تعیین گردید در کنار این موضوع باید عنوان نمود که حداکثر جریان ژنی بین جفت نواحی فجیره-چابهار (۲/۷۴) و حداقل آن بین فجیره-جاسک (۱/۷۸) ثبت گردید (جدول ۴-۸). مقدار F_{ST} اگر بین صفر تا ۰/۰۵ باشد، تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی بالا است. (Ballox and Moulin, 2002؛ Wraght, 1978). با توجه به این موضوع تمایز ژنتیکی جمعیت های مورد بررسی با میانگین ۰/۱ در محدوده میانه قرار خواهد داشت. معمولاً F_{ST} برای ماهیان دریایی پایین است، و میانگین آن (۰/۰۲) گزارش شده است (Waples, 1998) که نتایج حاصل از این مطالعه با این موضوع مطابقت نداشته و بیانگر میزان بیشتری از تمایز میان جمعیت هاست.

کشوری در سال ۱۳۸۸ میزان F_{ST} جمعیت های ماهی کلمه در دریای مازندران را در دامنه ۰/۰۳۴-۰/۰۱۳ و تمایز ژنتیکی میان جمعیت ها را پایین ارزیابی نمود. رضایی در سال ۱۳۸۹ در بررسی میان جمعیت های ماهی سفید در حوزه جنوبی دریای خزر، میزان F_{ST} را در بین نمونه های منطقه مورد بررسی ۰/۰۱۳ و در نتیجه تمایز ژنتیکی پایینی میان مناطق مختلف ارزیابی نمود. قلیچ پور در سال ۱۳۸۹ در بررسی خود بر روی کپورماهیان جنوب دریای مازندران، دامنه F_{ST} را میان ۰/۰۱۷-۰/۰۰۲ و تمایز پایینی را میان جمعیت های بررسی شده نشان داد؛ و بیان نمود تمایز کم در این جمعیت ها، بازتاب دهنده جریان ژنی بالا به دلیل رهاسازی لاروهای به دست آمده از تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر می باشد. Charrier و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار F_{ST} و فاصله جغرافیایی مشاهده نکردند و تمایز ژنتیکی پایین این ماهی را ناشی از جریان ژنی بالا بین مولدین مناطق مختلف اعلام کردند. سالاری در سال ۱۳۸۸ در بررسی جمعیت های سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان F_{ST} را بین ۰/۰۰ تا ۰/۰۶۳ بدست آورد و بیان نمود تمایز ژنتیکی حاصل از F_{ST} با جریان ژنی و فاصله جغرافیایی نمونه ها منطبق است. Guo و همکاران در سال ۲۰۱۳ تمایز ژنتیکی بالا با میانگین ۰/۳۰۶ در بین ۴ جمعیت شوورت ماهی نقره ای یافتند و بیان نمودند این نتایج با میزان پایین جریان ژنی به دست آمده در آن بررسی همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان Dxy در جفت نواحی فجیره-چابهار و کمترین میزان این پارامتر میان جفت نواحی چابهار-جاسک مشاهده شد. که میتوان حکایت از بیشتر بودن میزان جهش‌ها بین فجیره - چابهار باشد. ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی برای توصیف تمایز ژنتیکی ساختارهای جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. Shaklee و همکاران در سال 1982 بیان نمودند که میزان متوسط فاصله ی ژنتیکی Nei, 1978 برای جمعیت‌های هم گونه (دامنه ی ۰/۰۷-۰/۰۲)، برای گونه‌های هم جنس (دامنه ی ۰/۶۱-۰/۰۳) و برای جنس‌های هم خانواده (دامنه ی ۱/۲۱-۰/۵۸) می‌باشد. بنابراین با توجه به میزان فاصله ی ژنتیکی به دست آمده در مطالعه حاضر (۰/۱۱-۰/۳) ماهیان شبه شوریده در مناطق مورد مطالعه در محدوده ی گونه‌های هم جنس قرار می‌گیرند که خود دلیلی بر انشقاق ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. طبق جدول ۴-۶ میزان شباهت میان جمعیت‌های فجیره-چابهار بیشترین میزان و در نتیجه کمترین فاصله ژنتیکی را به دنبال داشت، همانطور که ذکر شد میزان اختلاف ژنتیکی نیز بین جمعیت‌های فجیره-چابهار کمترین مقدار را به خود اختصاص داد. در واقع در این بررسی کمینه و بیشینه تمام فاکتورها با یکدیگر همخوانی داشته و در واقع تایید کننده یکدیگر هستند.

۶- نتیجه گیری

بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی شبه شوریده دهان سیاه به عنوان یکی از گونه های بازار پسند، به روش توالی یابی در خلیج فارس و دریای عمان انجام شد و نتایج ذیل حاصل شد:

میزان تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی محاسبه شد و فجیره بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. همچنین بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی بین جفت نواحی فجیره - چابهار مشاهده شد. با توجه به اینکه منطقه فجیره از لحاظ پارامترهای مذکور بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد میتوان علت را اجتماع چندین جمعیت در ابهای این منطقه، تعداد کم نمونه و یا ناشی از مناسب بودن ساختار جمعیتی و پویایی این جمعیت دانست. در مقابل منطقه چابهار کمترین میزان را از لحاظ فاکتورهای ذکر شده به خود اختصاص داد، حداقل میزان فاکتورهای مذکور در چابهار را میتوان به شرایط سخت و پر استرس و عدم پایداری محیط دانست. در این پژوهش داده های حاصل از میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار بیانگر کاهش تنوع در مناطق مورد بررسی بودند. این موضوع با توجه به استرس های ناشی از فعالیت های انسانی در هر منطقه مانند صید بی رویه، الودگی روز افزون اب ها دور از ذهن نیست. همچنین در این مطالعه میزان جریان ژنی و تمایز ژنتیکی در کنار تطابق با یکدیگر، میزان اختلاف ژنتیکی مناطق را متوسط بیان نموده و نشان دادند علی رغم مهاجرت مناسب موجود بین مناطق، سواحل خلیج فارس و دریای عمان دارای سه جمعیت جدا از یکدیگر می باشند.

پیشنهادها

- جهت بررسی دقیق تر توصیه می شود آغازگرهای اختصاصی برای ماهی شبه شوریده دهان سیاه طراحی گردد ، و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نتایج دقیق تری به دست آید.
- تهیه بانک ژنی به منظور ایجاد پایگاهی از میراث اندوخته ژنتیکی و گردآوری و یکپارچه سازی داده های پراکنده ژنتیکی و همچنین تسهیل در مطالعات ژنتیکی آینده
- بررسی امکان تکثیر و پرورش مصنوعی گونه شبه شوریده دهان سیاه با توجه به ساختار ژنتیکی جهت حفظ تنوع ژنتیکی
- لزوم اجرای مطالعات گسترده با همکاری کشورهای ذینفع جهت دستیابی به اطلاعات دقیق تر و گسترده تر
- بکارگیری روش های ژنتیکی دیگر به منظور مطالعه ساختار جمعیتی شبه شوریده در خلیج فارس و دریای عمان در جهت مقایسه و اطمینان از نتایج این تحقیق
- استفاده از تعداد نمونه بیشتر جهت بررسی دقیق تر

منابع

- نوروزی، م.، ۱۳۸۶. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ماهی ازون برون (*Acipenserstellatus*) دریای خزر با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت. رساله دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- اصغری، ث.، احمدی، م.، محمدی زاده، ف.، ابراهیمی، م.، اجلالی، ک.، قاجری، ش.، اکبرزاده، غ. ۱۳۸۹. بررسی تنوع تراکم شکم پایان در قبل و بعد از مانسون تابستانه در سواحل ایرانی دریای عمان. مجله آبزیان و شیلات. سال اول. شماره ۴.
- امتیازی، گ. ۱۳۸۶. مبانی زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک. انتشارات مانی.
- امین لاری، م. ۱۳۷۸. پیش‌درآمدی بر مهندسی ژنتیک، انتشارات دانشگاه شیراز.
- پاسالار، پ و صمدی، ع. ۱۳۷۴. ژنتیک مولکولی، جلد دوم، انتشارات دانشگاه شیراز.
- پورنقشبند، ز. ۱۳۸۰. آشنایی با PCR، انتشارات صنم.
- جداری عیوضی، ج. ۱۳۵۹. جغرافیای آبها. انتشارات دانشگاه تهران.
- جوانروح علی آباد، ع. ۱۳۸۰. بررسی تنوع ژنتیکی در شش توده بز بومی ایران با استفاده از نشانگر RAPD، پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
- خارا، ح.، پورکاظمی، م.، وثوقی، ح.، رضوانی، س.، نظامی بلوچی، ع.، قاسمی، ا.، حسن زاده، م.، احمدنژاد، م.، قناعت پرست، ا.، کیوان، ا. ۱۳۸۷. تنوع ژنتیکی ماهی سیم *Abramis brama orientalis* در تالاب انزلی، سواحل جنوبی (ایران) و جنوب غربی دریای خزر (جمهوری آذربایجان) مجله زیست‌شناسی ایران. شماره ۲۱.
- خالدی، ه. ۱۳۹۰. مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ماهی راشگو معمولی *Eleutheronema tetradactylum* در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش تعیین توالی (Sequencing) ژن 28S rRNA و PCR-RAPD. پایان‌نامه دکتری. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.
- خوش خلق، م. ۱۳۸۵. بررسی تنوع تاس ماهی ایرانی و روسی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای. پایان‌نامه دکتری. دانشگاه گرگان.
- دانشورآملی، ع. ر. ۱۳۸۳. بررسی پلی مورفیسم تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره ای در جمعیت گوسفند بلوچی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. دانشگاه تهران.
- درویش، ج. ۱۳۸۴. جمعیت‌ها، گونه‌ها و تکامل، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- رضایی، م.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب.، کشیری، ح. ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره. مجله علمی شیلات ایران. سال بیستم. شماره ۳.

- رضایی، م. شعبانی، ع. شعبانپور، ب و کشیری، ح. ۱۳۹۱. تنوع ریزماهواره ای و ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید در سواحل استان مازندران. مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۵. شماره ۴.
- روشنی، س. ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی لاک پشت دریایی نوک عقابی خلیج فارس *Eretmochelys imbricata* با استفاده از نشانگر مولکولی *microsatellite*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.
- سالارپوری، ع. ۱۳۹۲. گزارش بررسی ذخایر شبه شوریده دهان سیاه (*Atrobucca nibe*) در خلیج فارس و دریای عمان. وزارت جهاد کشاورزی. پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان.
- سالاری علی آبادی، م. ع. ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش مواکولی ریز ماهواره. رساله دکتری رشته بیولوژی دریا گرایش، دانشگاه علوم فنون دریایی خرمشهر.
- ستاری، م. ۱۳۸۳. ماهی شناسی (۱) (تشریح و فیزیولوژی)، انتشارات حق شناس.
- سعیدپور، ب.، سواری، ا.، احمدی، م. ر. ۱۳۸۲. بررسی برخی صفات زیستی لاکپشتهای دریایی در جزیره هرمز و هنگام. پژوهش و سازندگی. سال دوازدهم. شماره ۶۱.
- سلیمی، ع. ۱۳۹۰. تعیین تنوع ژنتیکی ماهی گورخری *Aphanius ginaonis* و *Aphanius dispar* در آبهای ساحلی هرمزگان و بوشهر با استفاده از نشانگر مولکولی PCR-RFLP.
- شاه حسینی، م.، سید رضای تهرانی، م. ۱۳۸۰. واکنش زنجیره ای پلیمرز، انتشارات پارسیران.
- شاهسون بهبودی، ب و محررخمامی، خ. ۱۳۷۴. زیست شناسی یاخته ای، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی.
- شعبانی، ع.، پورکاظمی، م.، رضوانی، س. ۱۳۸۴. بررسی مولکولی جمعیت ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771) بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی (رودخانه تجن) دریای خزر به روش مولکولی PCR-RFLP. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. سال دوازدهم. شماره ششم.
- شهریاری، ف.، امام جمعه، ع. ۱۳۸۱. واکنش زنجیره ای پلیمرز، انتشارات دانشگاه امام رضا (ع).
- صفری، م. ۱۳۸۵. بررسی ساختار جمعیت ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- عالی زاده، ا. ۱۳۹۱ گزارش وضعیت صید سال ۱۳۹۰ استان هرمزگان. اداره کل شیلات استان هرمزگان.
- عطائی، ف. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایران در رودخانه سفید رود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mt-DNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشگاه شهید بهشتی.

- علی ابادیان، م.، علایی کاخکی، ن.، درویش، ج. ۱۳۹۱. رده بندی فیلوژنتیکی همتافت گونه جغد انباری (*Tyto alba Scopoli, 1769*) با استفاده از ژن میتوکندریایی (16S rRNA): ارزیابی آرایه شناختی. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال چهارم، شماره یازدهم.
- علی بیگ، ه. ۱۳۸۲. تکامل موجودات زنده، انتشارات فیروزه.
- قدسی، ز.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza* (Risso, 1810) *aurata* در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگر های ریز ماهواره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال سوم، شماره ششم.
- قره یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۴-۷ شهریور، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- قریب خانی، م. ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و فیلوژنی سوف حاجی طرخان *Perca fluviatilis* در تالابهای انزلی و امیرکلایه لاهیجان و سوف سفید *Sander lucioperca* در سد ارس و حوضه ی جنوب غربی دریای خزر. پایان نامه دکتری. دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات.
- قلیچ پور، م. ۱۳۸۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در رودخانه های گرگانرود، قره سو و تالاب گمیشان با استفاده از نشانگر های ریز ماهواره (میکروساتلایت). پایان نامه ی کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- کر باسی، ع. ۱۳۷۷. اقیانوس شناسی، چاپ دوم، انتشارات فراز انرژی پایدار.
- کشیری، ح.؛ شعبانی، ع.؛ شعبانپور، ب. و رضایی، م. ۱۳۹۰. بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه *Rutilus rutilus caspicus* در مناطق انزلی و گمیشان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره. مجله علوم و فنون دریایی دوره ۱۰. شماره ۴.
- گله داری، ح. و فروغمند، ع. ۱۳۸۵. مهندسی ژنتیک جامع، انتشارات گلهای بهشت.
- لالوئی، ف.، رضوانی گیل کلائی، س.، فاطمی، ر. و تقوی، ج. ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال هفدهم، شماره ۲.
- لطفی، ح.، بقایی، ح.، موسوی، ر.، خیامباشی، س. ۱۳۸۹. محیط زیست خلیج فارس و حفاظت از آن. فصلنامه علمی پژوهشی جغرافیای انسانی. سال سوم. شماره اول.
- محمدیان، س.، رضوانی گیل کلائی، س.، کاظمیان، م.، کمالی، ا.، تقوی، م. ج.، روح الهی، ش.، لالوئی، ف.، نیرانی، م. ۱۳۸۹. مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی ماهی سیاه کولی (*Vimba vimba persa* (Pallas, 1814) در سواحل شرقی و غربی دریای خزر (رودخانه های حویق و گرگانرود) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال دوم، شماره پنجم.

- ملکیان، م. ۱۳۹۲. بوم شناسی مولکولی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- نعمت زاده، م.، رضوانی گیل کلایی، س.، خالصی، م.ک.، لالویی، ف. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ۶ گونه از کفال ماهیان آبهای ایران به روش PCR-sequencing با استفاده از ژنوم mtDNA. کتاب اولین کنفرانس ملی آبزی پروری ایران.
- نقوی، م.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ دوم.
- نویدی، م. ۱۳۸۵. بررسی ساختار جمعیتی ماهی آزاد (*Salmo trutta*) دریای خزر با استفاده از روش مولکولی ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان.
- هاشم زاده سقرلو، ا. ۱۳۸۴. اصول و روشهای مطالعات ژنتیکی ماهیان، جلد اول، انتشارات نقش مهر.
- هالرمز، ا. ۱۳۸۴. اصول و روش های مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول و دوم)، ترجمه ایرج هاشم زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر، تهران.
- Brighitte, J., Hansen, M., Loeschcker, V., 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. *Biology Journal of Linnean Society*.(84) 1-11.
- Dahle, G., Jorstad, K. E., Rusas, H. E. and Ottera, H., 2006. Genetic characteristics of brood stock collected from four Norwegian coastal cod (*Gadus morhua*) populations. *ICES Journal of Marine Science*. (63): 209-215.
- Dewoody, J. A. and Avise, J. C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. (56): 461-473.
- Diz, P. A. and Persa, P., 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). *Aquaculture*. (287): 278-285.
- Fei, C., Wei, Y. and Fu- Ling, Y., 2007. Isolation of DNA microsatellites and preliminary genomic analysis of Mud crab (*Cirrhina molitorolla*). *Zoological research*, 28 (2): 119-125.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M., 2004. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.*(5): 150-163.
- Rezvani Gilkolaei, S., Imanifar, A., Aghili, R. and Laloei, F., 2007. PCR- RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, *Iranian Journal of Marine Biology Association*. U. K.(86): 1463-1467.
- Thai, B. T., Pham, T. A. and Austin, G. M., 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*,(258): 228-240.
- Hebert, P.D.N. and Gregory, T.R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy." *Systematic Biology*,54(5): 852-859.
- Aboim, M.A., Menezes, G.M., Schlitt, T. and Rogers, A.D., 2005. Genetic structure and History of Population of the deep Sea Fish *Helicolenus dactyloptenus*(Delaroche,1809) inferred from mtDNA sequence Analysis. *Molecular Ecology*. 14:1343-1354.
- Adams B.K., Hutchings, J.A., 2003. Microgeographic population structure of brook charr:a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology* 62:517-533.
- Alam, M.S., and Islam, M.S. (2005). "Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers" published in the *Aquaculture (The Netherlands)* , vol no 246, pp. 151-160.
- Alvarado Bremer, J.R., Stequert , B., Robertson, N.W. and Ely, B. 1998. Genetic evidence for interoceanic subdivision of big eye tuna (*Thunnus abesus*) population. *J. Exp. Marine Biology and ecology and Policy Institute East-West Center, Honolulu Association, Japan*. (197): 547-557.
- Atabeyoglu, K., 2007. Determination of genetic differences between mtDNA D-Loop F1 and 12S1-H region of native salmon(*Salmo trutta*) caught in the Rivers of Aras , Karasu and Coruh in our district using PCR-RFLP and microsatellite methods. MS thesis, Department of Fisheries, institution of Natural and Applied Sciences, Ataturk University, 62p.

- Avise, J. C., and R. C.vrijenhoek., 1987. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *Poeciliopsis* . *Molecular biology and Evolution*. (4):514-525.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* Second Edition. Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Bahy, A. Ali., Tian-Hua Huang., Da- Nian Qin and Xiao- Mei Wang., 2005. A review of random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.(14): 443- 453.
- Balloux, F., Brunner, H. and Lugon- Moulin, N., 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, (11): 321-323.
- Bardakci,f., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers.*Turk Journal of Biology*, (25):185-196.
- Bilington, n., 1998. Genetic variation in percids determined by mitochondrial DNA analysis. *Italian journal of zoology* (65) :35-40.
- Blaber, S.J.M., 2002 'Fish in hot water': The challenges facing fish and fisheries research in tropicalestuarines. *Journal of Fish Biology*, (61): S1-S20.
- Blegvad, H. and B. Loppenthin, 1944. Fishes of the Iranian Gulf. Danish Scient. Invest. Iran, Einar Munksgaard, Copenhagen. 247 p.
- Botstein, D., White, R. L., Skolmick, M., Davis, R.W., 1980: Construction of a geneticlinkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, (6):314-332.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., and Willson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of molecular evolution*. (18):225-239.
- Brown,W. M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In" Evolution of gene and protein" (Eds: Nei, M. And Koehn, R.K.). Sinauer Associates Inc Publishers Sanderland, MASSACHUSETTS. U.S.A. pp.62-88.
- Carvalho, G.R., 1998. Advanced in the molecular analysis of fish population structure. *Zoology* (65):21-23.
- Castro, J.A., Picornell, A., And Ramon, M., 1988. Mitochondrial DNA: a tool for population genetics studies. *Interna.Microbiol*. (1):327-332.
- Chakraborty, A., Aranishi, F. and Iwatsuki, Y., 2006.Genetic Differentiation of *Trichiurus japonicas* and *T.lepturus* (Perciformes:Trichiuridae)Based on Mitochondrial DNA Analysis.45(3):419-427.
- Charrier, G., Durand, J., Quiniou, L. and Laroche, J., 2006. An investigation of the population genetic structure of Pollack (*Pollachius pollachius*) based on microsatellitemarkers, (1): 1705-1709.
- Chawla, H.S., 2000. Introduction to plant biotechnology. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India.
- Clayton, D.A., 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNA, *Int. Rev. Cyt*. 141 (1992): 217-232.
- Coast of South Africa. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*,50(2):259-269.
- Cotton, R.G., 1993. Current methods of mutation detection. *Mutat. Res*. (285):125-144.
- Cox, D.R., Burmeister, M., Price, E., Kim, S., Myers, R.M., 1990. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution map of mammalian chromosomes.*Science* 250, 245-250.
- Desjardins, P., and Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of molecular evolution*. 212:599-634.
- Dewoody, J. A., and Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of FishBiology*, (56): 461-473.
- Edward, C., 982. Reproductiye cycle and biometric relation in Practices in China. SPC Beche-de-mer INFORMATION Bulltin. (29):334-357.
- Fennessy, S. T. (2000). Aspects of the biology of four species of Sciaenidae from the East.
- Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodohl, P.A., Mcmeel, O., Thompson, C., Stone C., Mcginnity, P. and Hynes, R.A., 1995. The application of molecular marker to the study and conservation of fish populations, with special refrence to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, (47): 103- 126.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., Kleunen, M.V.and Schmid, B., 2000. RAPD variation among and withinsmall and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal Botany*, (87): 1128–1137.
- Frankham, R., 1994. Conservation of genetic diversity for animal improvement. 5th World Congres on Genetics Applid to Livestock Production. University of Guelph. Guelf, Ontario, Canada, (21):385-392.
- Fry, J.C., 1993. *Biological data analysis, a practical approach*. Oxford University Press. New York. 207p.
- Gai, Y.H., Song, D.X., Sun, H.Y., Zhou, K.Y., 2008. The complete mitochondrial genom of *Symphylella sp.*(Myriapoda:Symphyla): Extensive gene order rearrangement and evidence in favor of Progoneata. *Mol. Phylogent. EVOL*. (49) 547-585.

- Garesse, R., Carrodeguas, J.A., Santiago, J., Perez, M.L., Marco, R., and Vallejo, C.G., 1997. Artemia mitochondrial genom: molecular biology and evolutive consideration. *Comp.Biochem.Physio.* (117B):357-366
- Gold stein, D.B., Schlottere, C., 1998. *Microsatellit: Evolution and Aplication.* Oxford University press, 320pp.
- Grewe, P.M., 1993. Mitochondrial DNA variation among lake trout (*salvelinus namaycush*) strains stocked into lake Ontario. *Can. J.Fish. Aguat. Sci.* (50):2397-2403.
- Gross, R. ; Kohlman, K. and Keresten, P., 2002. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and east asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture.* (204):507-516.
- Guaksia, P.S., Kemp, S.J. and Teal, A.J., 1994. Characterization of cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Animal Genetics*, (25): 85-94.
- Guo, Y. S. Yan C. Z., Zhang, Y. L., Zheng, J. N., Xu, Y. M., Du, T., Wang, Z. D., Lid, C.W., 2013. SSR analysis in four wild populations of silver sillago *Sillago sihama*. *Oceanologia et limnologia Sinica*. 44(2): 267-276
- Gutierrez, A.A., Gushwa, W.T., Anderson, G.B. and Medrana, J.F., 1997. Ovine specificity-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. *Animal Genetics*, (28): 135-138.
- Gyllester, U.B., Wharton, D., Josefsson, A., and Willson, A.C., 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature.* (352):255-257.
- Hall, H., Beardmore, J., and Skibinski, D.O.F., 1995. A study of mitochondrial DNA variation in brown trout in Wales. In "Assessment Methodologies and Management" (Eds: Sakagawa, G.). Proceeding of the world fisheries congress, theme 5. Oxford and IBH publishing, New York, NY, USA.
- Hansen, M., 2004. Application of Molecular Markers in Population and Conservation Genetics, With Special Emphasis on Fishes. MSc thesis, Submitted to the Faculty of Natural Science, University of Aarhus, 100p.
- Hardy, G. H., 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* (28): 49-50.
- Hauser, L., Adcock, G., Smith, P., Bernal Ramirez, J., Carvalho, G., 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc/Nat/Acad Sci USA.* 99(18):11742-11747.
- Hauswirth, W.W., Clayton, D.A., 1985. Length heterogeneity of a conserved sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research displacement-loop.* (13):8093-8104.
- Hebert, P., Penton, E., Burns, J., Janzen, D., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.
- Hedrick, P.W., 1998. Genetic of population. Arizona State university. 553p.
- Hedrick, P. W., 1999. Genetic of population. Arizona State University, 553 p.
- Heemstra, P.C., 1986. Sciaenidae. p. 616-619. In M.M. Smith and P.C. Heemstra (eds.) *Smiths' sea fishes.* Springer-Verlag, Berlin.
- Herwerden, L.V., McIlwain, J., Al- Ouf, H., Al- Amry, W. and Reyes, A., 2006. Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes of Teleostei) to a population genetic study Arabian Peninsula stocks. *Fisheries Research.* (79): 258- 266.
- Hildbrandt, F., and Igarashi, P., 1999. *Techniques in molecular medicine.* Springer Lab Manual.
- Hillis, D.M., Moritz, C., 1990. *Molecular taxonomy.* Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U.S.A., 120pp.
- Hoeck, W.R., Blakley, K.H., and Brown, W.M., 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science.* (251):1488-1490.
- Horne, J.B., van Herwerden, L., Choat, J.H. and Robertson, D.R., 2008. High population connectivity across the Indo-Pacific: Congruent lack of phylogeographic structure in three reef fish congeners. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (49): 629-638.
- Hualkasin, W., Sirimontaporn, P., Chotigeat, W., Querci, J. and Phongdara, A., 2003. Molecular phylogenetic analysis of white prawns species and the existence of two clades in *Penaeus merguensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* (296):1-11.
- Hurst, C.D. ; Bartlett, W. ; Davidson, S. and Bruce, I.J., 1999. The complete mitochondrial sequence of the Atlantic salmon, *Salmo salar* Gene. (239):237-242.
- Hutchinson, C.A.; Newbold, J. E.; Potter, S. S. and Edgell, M.H., 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature(London)* (251):536-538.
- Hynes, R. A., Ferguson, A., and McCann, M. A., 1996. Variation in mitochondrial DNA and postglacial colonization of north western Europe by brown trout. *Journal of fish Biology* (48):54-67.

- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, A.D., 1998. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. (85):9436-9440.
- Jothi, M.P., 2008. Genetic distance and phylogenetic inference, Course notes, University of Putra Malaysia.
- Jug, T., Berrebi, P. and Snoj, A., 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout population as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, (123): 381-388.
- Kaiser, M. G., N. Yonash, A. Cahaner, and S. J. Lamont. 2000. Microsatellite polymorphism between and within broiler populations. *Poult. Sci.* (79):626–628
- Kawasaki, T. (1987). Fisheries problems in the Yellow and East China Seas. Environment and Policy Institute East-West Center, Honolulu.
- Kazianis, S., Morizot, D.C., McEntire, B.B., Nairn, R.S. and Borowsky, R.L., 1996. Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP-PCR, rRAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups. *Genome Research*, (6): 280–289.
- King, T.L., Kalinowski, S.T., Schill, W.B., Spidle, A.P., Lubinski, B.A., 2001. Population Structure of Atlantic Salmon Range Wide Perspective from Microsatellite DNA Variation. *Molecul. Apr*:pp.807-821.
- Kohlmann, K., Gross, R., Murakaeva, A. and Keresten, P., 2003. Genetic variation and structure of common carp populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mtDNA marker. *Aquatic Living Resources*.(16):421-431.
- Lankford, T.E., Targett, T.E. and Gaffney, P.M. 1999. Mitochondrial DNA analysis of population structure in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulates* (perciformes: Sciaenidae). *Fish Bulletin*, (97): 884- 890.
- Lavery, S., Chan, T.K., Tam, Y.K. and Chu, K.H. 2004. Phylogenetic relationship and evolutionary of the Shrimp genus *Penaeus* L. derived from mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetic Evolution*. (31): 396-49.
- Lehoczky, I., Jeney, Z., Magyary, I., Hancz, C. and Kohlmann, K., 2005. Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio*) strains kept at the live gene bank at research Institute for fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. *Aquaculture*. (247):45-49.
- Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, Z. and Liang, L., 2007. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Genetics and Genomics*, (34): 984-993.
- Lin, Y.S., Poh, Y.P., Lin, S.M. and Tzeng, C.S., 2002. Molecular techniques to identify freshwater eels. *Zoological Studies*, 41(4): 421- 430.
- Ludwig, A.N., Jenneckens, I., Debus, L., Ludwig, A., Beeker, J. and Kirschbaum, F. 2000. Genetic analysis archival specimens of the Atlantic turgeion (*Acipenser sturio*). *Biology Lnst. ESP. Oceanography*. 16(44): 181-190.
- Magoulas, A., Batargias, C., Sofronidis, K., Kotoulas, G. and Zouros, E., 1994. The use of DNA markers for rapid identification of genetically superior parents in mass crosses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. In: *Methods et Techniques pour Amelioration Genetique en Aquaculture*, *Aquaculture* (94): 76-84.
- Martin, C., Wasko, A.P., Oliveria, C. and Foresti, F. (2003). Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongates* from the Parana river basin. *Genetic and molecular Biology*. 26(1): 33-38.
- May, B., and Grewe, P. M., 1993. Fate of maternal mtDNA following 60Co inactivation of maternal nuclear DNA in unfertilized salmonid eggs *Genome* (36):725-730.
- Mburu, D. and Hanotte, O., 2005. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics, A manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterisation of small ruminant genetic resources of Asia, Nairobi, Kenya.
- Meksem, K., Ruben, E., Hyten, D., Titiwitayakom, K., Lightfoot, D.A., 2001. Conversion of AFLP bands into high throughput DNA markers. *Mol. Ge net. Genomics* (265):207-214.
- Menezes, M.R., Parulekar, A.H., 1998. Genetic variations in marine natural population - Measurement and utility in resource management and conservation, A review. *Indian Journal of Marine Sciences*.(27): 267-273.
- Meyer, A. 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in fishes. In: *Biochemistry and Molecular Biology of fishes*, 2 Molecular Biology frontiers. Ed. Hochachka, pp:1-33.
- Morgan, T.H., 1961. Random segregation versus coupling in Medelian inheritance. *Science* 34, pp 384.
- Moritz, C., Dowling, T., and Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. (18):269-292.

- Mortitz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* (3):401-411.
- Murphy, r.w., Siter, J.W., Buth, J.R.D.G., and Hufler, C.H., 1996. Protein:isozyme electrophoresis. In "Molecular systematics" (Eds: Hilis, D.M., Moritz, C, and Mabel, B.K.). Sinauer Associates Inc Publishers. Sanderland, Massachusetts. U.S.A. PP. 51-120.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, Vol.106, pp. 283-292.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, Vol.(89): 583-590.
- Nelson, J.S., 2006. Fishes in the world. Canada, John Wiley & Sons, Inc.
- Ovenden, J. R., 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review *Australian Journal of marine and Freshwater Research* (41):835-853.
- Ovenden, J.R., Brasher, D.J. and White, R.W.G., 1992. Mitochondrial DNA Analysis of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivision through out Australia. *Marine biology*, (112): 319- 329.
- Peakall, M. and Smouse, A., 2005. GeneAlex 6. 41: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian national university, Canberra, Australia.
- Peakall, R., and Smouse, P.E., 2006. GenAlix 6.41: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, (6): 288-295.
- Pherson, M. M., Moller, S. and Moller, S. G., 2000. PCR (Basic: from background to bench). Bios Scientific Publishers Ltd.
- Phillips, R.L., Vasil, I.K., 2001. DNA-Based Markers in Plants. 2nd Edition, Kluwer Academic Pub.
- Pirchner F. and Krosigk, M. (1969) Population Genetics in Animal Breeding. W. H. Freeman San Francisco. populations. *Poult. Sci.* (79):626-628
- Pourkazemi, M., 1996. Molecular and Biochemical Genetic Analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. Shool of Biological Sciences, university of Wales, Swan Sea. pp 260.
- Pourkazemi, M., 1996. Molecular and Biochemical Genetic Analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D Thesis. Shool of Biological Sciences, university of Wales, Swan Sea.
- Raje, S. G. (1988). Occurrence of black mouth croaker, *Atrubucca nibe*.
- Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. Ph. D Thesis. School of biological sciences, university of Wales, Swansea, U. K. pp 196.
- Rocha-Olivares, A. Leal-Navarro, R. A. Kimbrell, C. Lynn, E. A. Vetter. R. D. 2003. Microsatellite variation in the Mexican rockfish *Sebastes macdonaldi* In *Scientia Marina*, 67(4):451-460 .
- Rousset, F., 2004. Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations. Princeton: Princeton University Press.
- Royce, W.F., 1992. Introduction to the practice of fishery science. Academic press London and New York. pp122.
- Saccone, C., Giorgi, C.O., Gissi, C., Pesole, G., and Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*. (238):195-209.
- Saiki, R., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, R., and Higuchi, G., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. (239):487-491.
- Sambrook, J. and Russell, D. W., 2006. The conserved protocols from Molecclar cloning. ColdSpring Harbor laboratory press. pp: 705-762.
- Samonte, I.E., Canlas, R.A., Alvia, K. and Carvajal, T. 2009. Multivariate analyses of the biometric features Philippine sardines implications for the phylogenetic relationship of the fresh water *Sardinella tawilis* (Teleostei, Clupeomorpha). *Zool Syst Evol Res*.47(1):21-24.
- Sasaki, K., 2001. Sciaenidae. The living marine resources of the Western Central Pacific. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae). Rome, FAO.(5): 2791-3380.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., Davis, R.W., 1996. Parallel human genom analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93,10614-10619. y press, 320pp.
- Schlotterer, C., 2004. The evolution of molecular markers– justa matter of fashion *National Revision Genetic*, (5): 63-69.
- Shaklee, J. B., Tamaru, C. S. and Waples, R. S., 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*, (36): 141-157.

- Sheldlock, A.M., Parker, J.D. and Burmer, G.C. 1991. Evolutionary relationship of pacific salmon based on PCR – direct sequencing of the mitochondrial DNA D-loop. *American Zoology*. 35 (5): 128 A.
- Shen, X., Ren, J., Cui, Z. and Wang, B. 2007. The complete mitochondrial genomes of two common shrimp (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene*. (403): 98-109.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C., and Beynon, C.M., 1994a. Mitochondrial-DNA inheritance. *Nature*. (368):817-818.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non- equilibrium population. *Evolution*, (47): 264-279.
- Sorgeloos, P., 1997. Determination and identification of biological characteristics of *Artemia Urumiana* for application in aquaculture. In: Sorgeloos, P.(Ed.), The Lake Urumiah Cooperation Project, Item A. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, Belgium, pp: 1-50.
- Stepien, C.A. (1999). Phylogeographical structure of Dover sole *Microstomus pacificus*: the larval retention hypothesis and genetic divergence along the deep continental slope of the northeastern Pacific Ocean. *Molecular Ecology*, (8): 923-939
- Surzycki., 2002. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A. and Ferguson A., 1992. Amplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Fish Biology*, (40): 963- 965.
- Talwar, P.K. and R.K. Kacker, 1984. *Commercial sea fishes of India*. Zoological Survey of India, Calcutta. 997 p.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S . 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (101): 11030-11035.
- Targon, M.L.P., Machado, M.A., Colettafilho, H.D., Cristofani, M., 2000. Genetic polymorphism of sweet orange varieties by random amplified polymorphic DNA. *Proceeding of the first International Symposium on Citrus Biotechnology*, pp.51-54.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* (17):6463-6471.
- Templeton, N.S., 2004. *Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies*, Marcel Dekker, New York.
- Thompson) off Veraval coast. *Indian Journal of Fisheries*, 35(4), 302-303.
- Tianxiang, G., Jian, L., Qingyin, W. 2003. Partial sequence analysis of mitochondrial COI gene of the chinese shrimp, *fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Ocean University of China* . 2(2):167-170.
- Tilman, D., Wedin, D., Knopps, J., 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, (379):718-720.
- Tjensvoll, K., Holdneland, K., Nilsen, F., Nylund, A., 2005. Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* (Crustacea;Copepoda). A new the gene organization revealed. *Gene*.(353):218-230.
- van der Elst, R., 1993. *A guide to the common sea fishes of southern Africa*. 3rd Edition. Struik Publishers, Cape Town. 398 p.
- Waldman, I. D., Robinson, B. F. and Rowe, D. C., 1999. A logistic regression based extension of the TDT for continuous and categorical traits. *Annals of Human Genetics*. (63): 329-340.
- Wang, U., Su, Y.Q. and Quan, C.G., 2007. Genetic diversity of the wild and reared *Pseudosciaena crocea*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, (19):152-156.
- Wang, Z.Y., Tosi, K.H., Chu, K.H., 2003. Application of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology* (32):399-407.
- Waples, R.S., 1990. Conservation genetics of Pacific salmon. Estimating effective population size. *Journal of Heredity* (81):277-289.
- Waples, R.S., 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, (98): 438- 450.
- Ward, R.D., Zemlak, T.s., Innes, B.H., Last, P.R. and Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the royal society*, doi: 10.1098. Published online.
- Waugh R. and Poowell W., 1992 . Using RAPD markers for crop improvement . *Tibtechnology*, (10): 186-191.
- Welch, D.J., Ballagh, A., Newman, S.J., Lester, R.J., Moore, B., Herwerden L., Horne J., et al., 2010. Defining the stock structure of northern Australia, s threadfin salmon species, FRDC project, NO. 2007/032.

- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. (18):7213-7218.
- Whitmore, H., 1990. Electrophoresis and isoelectric focusing technique in fisheries management, PCR. Press, INC. 150P.
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E., Benzie, J., 2000, The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon* : *Mol. Biol. Evol.*, 863-874.
- Wirgin, I., Waldman, J., stabile, J., Lubinski, B. and King, T., 2002. Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analysis in estimating population Structure and gene flow rate in Atlantic Sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *Ichthyology*. (18): 313-319.
- Wright, S., 1969. *The Theory of Gene Frequencies*. London: The University of Chicago Press.
- Wright, S., 1969. *The Theory of Gene Frequencies*. London: The University of Chicago Press.
- Xu, Z., Primavera, J.H., de la Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren, A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*. (199): 13-40
- Yamada, U., S. Shirai, T. Irie, M. Tokimura, S. Deng, Y. Zheng, C. Li, Y.U. Kim and Y.S. Kim, 1995. Names and illustrations of fishes from the East China Sea and the Yellow Sea. Overseas Fishery Cooperation Foundation, Tokyo, Japan. 288 p.
- Yamada, U., and Tokimura, M. (1994). Blackmouth croaker (in Japanese), pp. 184-193 in
- Zhang, J., and Nei, M., 1996. Evolution of antennapedia-class homeobox genes. *Genetics* (142):259-303.
- Zheng, X., Ilkeda, M., Kong, L., Lin, X., Li, Q., Taniguchi, N., 2009. Genetic diversity and population structure of golden cuttlefish, *Sepia esculenta* (*Cephalopoda: Sepiidae*) indicated by microsatellite DNA variations. *Mar. Ecol.* (30):448-454
- Zhou, J.F., Ye, Y.Z. and Tong, J.G., 2003. Genetic divergence between *Cyprinus carpio haematopterus* as assessed by mitochondrial DNA analysis, with emphasis on origin of European domestic carp. *Genetica*, (119):93-97.
- Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., and Pogeson, G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*. (359):412-414.

پیوست

توالی های هاپلوتیپ های مشاهده شده:

Hap_1 GTGTACGCCTGTTTGTGATCCA-AATG-----CCAATCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_2 TGGTACCAACCTTT-TGT--GCTTACGGA----CCT-TTCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_3 -----CCTTTATTTGGG-CTCCAAAGA-----GCTATCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_4 -----CGGGGGCTGTAACGGGA---GGCATTCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_5 GGGGAAAGGGCCTTTTGTG--CTTACGGA-----GCTATCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_6 AGGAACAA-GCTTT-TGT--GCTTACGGA----GCT-TTCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_7 CTGTACCGCCTTTTGTGC---T-TACGGG-----CCAATCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGACACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAA
TAGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTG
TTAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_8 ATGTACCAACCTTT-TGT--GCTTACGGA----CCT-TTCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCGTGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_9 AGGTACCAAGCTTT-TGT--GCTTACGGA----CCT-ATCTAG-GGCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_10 CTGTAGGC-TGA---GTAGGAC---CAGAT----GCCAATTGAG--GCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_11 AGAACGATCTGTACGTAGGAAC---CAAAT----GCCAAACGGA-ACCTCAT-
CCCAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAA
TAGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTG
TTAGTGATCCCAGGAGTGTGGGGGGTAG

Hap_12 CTGTCGGC-TGA---TTAGGAC---C-GAT----GCCAAACGGG--CCCCAT-GCCAAC-
TCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAATAGATAC
ATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGTTAGTGAT
CCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_13 CTGTCGGCCTGA---GTAGGAC---CAAAT----GCCAATCGGG--GCCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_14 ATGTCGGCTGAT---TAGGAGC---CAAAT----GCCAATTTGA-
AGCCCATCGCTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAAT
ATTGTAAATAGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTAC
AGGAGTGTTAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_15 TTTTCGGCCTGTTT--GTGATC-CACA-AT---GCCAAT-CTAG-GGCCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_16 A-GGACCA-GCTTT-TGTGCTCT-ACGGA--G--CCTATTCTAG-GGCTCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_17 CTGTCGATCTGT-CGTACGAAC---CAGAT----GCCAAGTGGA--CCCCAT-
GCCAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAA
TAGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTG
TTAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_18 CTGTCGGCCTGA-TTA-TGAAC---CAAAT----GCCATTCTAG-GGCCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

Hap_19 CAGGTAGGCTGATTGTGAACCACAATG-----CCAATCGAG-GGCCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTGTGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCTTGTGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTACAGGAGTGT
TAATGATCCCAGGAGTGATGGGGGGTAG

Hap_20 CTGTAGGCCTGA-TTAGTGAAC---CAAAG----GCCTTTCTAG-GGCCCCAT-
CTTAACATCTTCAGCGTTATGCTTTTATTAAGCTACGTTAGCATGCGCGTCATTTTAATATTGTAAAT
AGATACATTTTGGACCAAAAAATACTACTAGGGGTTTTCTGTTTCCGGGGGGTTTGCAGGAGTGT
TAGTGATCCCAGGAGTGTTGGGGGGTAG

فروانی هاپلوتیپ های مشاهده شده در مناطق مورد مطالعه:

Haplotype:	Jask (15)	Fojairah (14)	Chabahar (12)
Hap_1	0.0667	0	0
Hap_2	0.267	0.286	0.333
Hap_3	0.0667	0	0
Hap_4	0.133	0	0
Hap_5	0.133	0	0
Hap_6	0.2	0.0714	0.25
Hap_7	0.0667	0	0
Hap_8	0.0667	0	0
Hap_9	0	0.0714	0
Hap_10	0	0.0714	0
Hap_11	0	0.0714	0
Hap_12	0	0.0714	0
Hap_13	0	0.0714	0
Hap_14	0	0.0714	0
Hap_15	0	0.0714	0
Hap_16	0	0.0714	0
Hap_17	0	0.0714	0
Hap_18	0	0	0.167
Hap_19	0	0	0.0833
Hap_20	0	0	0.167

Abstract

Black Mouth Croaker (*Atrobuca nibe*) is of significant value from the economics point of view. In the following study, the genetic diversity of *Atrobuca nibe* has been investigated using the PCR-sequencing method from three different regions of the Persian gulf and Oman Sea, namely Chabahar in the Sistan and Baluchestan and Jask in Hormozgan Province of Iran and Fujairah in the Fujairah Emirate of the United Arab of Emirates. The purpose of the following exploration has essentially been coined to further the study of *Atrobuca nibe* genetic diversity and its population structure in the Persian Gulf and Oman Sea. For this purpose, a number of 54 fish have been collected from the aforementioned regions. The DNA of the fish had been extracted through the Ammonium Acetate method and the quality of the DNAs were analyzed via the spectrophotometry and furthermore the quantity of the extracted DNA were assessed via electrophoresis. Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted on the targeted DNAs and thenceforth DNA sequencing was carried out. Subsequently, through sequencing it was discovered that the D-loop region in the mitochondrial DNA (mtDNA) of Black Mouth Croaker, contained 270 base pairs (bp). For the purpose of analyzing the genetic diversity of *Atrobuca nibe* and its population structure in the Persian Gulf and Oman Sea, the following softwares have been conducted, namely the BioEdit, Arlequin, Dnasp and Mega5 software. Furthermore, the Kimura 2-parameter was used for the purpose of genetic distance analysis. Through observations of average levels of F_{ST} between the regions, it can be summed up that genetic differences do exist among the present populations. On the grounds of the obtained results from the Persian Gulf and Oman Sea, it can be concluded that there currently are three different populations of *Atrobuca nibe* residing in the waters of Sistan & Baluchestan, Hormozgan and Fujairah.

Keywords: *Atrobuca nibe*, Genetic diversity, PCR-Sequencing, Oman Sea

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Persian Gulf and Oman Sea Ecology
Research Center**

Project Title : Population genetic study on Croaker species *Atrubucca nibe* in persian Gulf and Oman Sea using molecular methods

Approved Number: : 14-12-12-91147

Author: Sohrab Rezvani Gilkolaei

Project Researcher : Sohrab Rezvani Gilkolaei

Collaborator(s) : T. Valinasab, F. Laloee, S.J. Taghavi, N. Niameymandi, A. Salarpouri, R. Nouri Defzari, A. Sistani, H. Pourgholam, S. H. Hosseini

Advisor(s): –

Supervisor: A. Mojahedi

Location of execution : Hormozgan Province

Date of Beginning : 2013

Period of execution : 1 Year

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute**

**Project Title :
Population genetic study on Croaker species *Atrubucca
nibe* in persian Gulf and Oman Sea using molecular
methods**

Project Researcher :

Sohrab Rezvani Gilkolaei

Register NO.

48232