

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

عنوان:

مطالعه و شناسایی ساختار ژنتیکی و
جمعیت ماهیان سس، سوف، کلمه،
سفید و آزاد حوزه جنوبی دریای خزر
با استفاده از روشهای مولکولی
(ریز ماهواره ها) و تشکیل بانک DNA

مجری:

فرامرز لالوئی

شماره ثبت

۴۹۹۳۹

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

عنوان پروژه : مطالعه و شناسایی ساختار ژنتیکی و جمعیت ماهیان سس، سوف، کلمه، سفید و آزاد حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از روشهای مولکولی (ریز ماهواره ها) و تشکیل بانک DNA
شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۶۴-۸۹۱۱۴-۱۲-۲۶-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : فرامرز لالوئی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :-
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : فرامرز لالوئی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مهدی یوسفیان، سهراب رضوانی، احمد غرقی، رضا پورغلام، حسن فضلی، محمدجواد تقوی، فرامرز باقرزاده، حسین طالشیان، شهریار بهروزی، حسن ملائی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : محمد پورکاظمی
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱
مدت اجرا : ۳ سال و ۳ ماه
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 مسئول / مجری»

پروژه : مطالعه و شناسایی ساختار ژنتیکی و جمعیت ماهیان سس،
سوف ، کلمه ، سفید و آزاد حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از
روشهای مولکولی (ریز ماهواره ها) و تشکیل بانک DNA

کد مصوب : ۸۹۱۶۴-۸۹۱۴-۱۲-۷۶-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۹۹۳۹ تاریخ : ۹۵/۵/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای فرامرز لالوئی دارای مدرک
تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته بوم شناسی دریا می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان

در تاریخ ۹۴/۱۲/۲۲ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت معاون پشتیبانی و برنامه ریزی در پژوهشکده اکولوژی

دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
چکیده	۱
کلیات	۳
۱- مقدمه	۳
۱-۱- ماهی سفید <i>Rutilus frissi kutum</i> (Kamansky 1901)	۳
۱-۲- ماهی کلمه <i>Rutilus rutilus</i>	۴
۱-۳- ماهی آزاد <i>Salmo trutta caspius</i>	۵
۱-۴- ماهی سوف <i>Lucioperca lucioperca</i>	۶
۱-۵- سس ماهی <i>Barbus brachycephalus</i>	۷
۲- مروری بر تحقیقات انجام شده	۸
۳- ماهی سفید	۱۱
۳-۱- روش کار	۱۱
۳-۱-۱- نمونه برداری	۱۱
۳-۱-۲- استخراج DNA	۱۱
۳-۱-۳- واکنش PCR	۱۲
۳-۱-۴- آنالیز آماری	۱۳
۳-۲- نتایج	۱۳
۳-۲-۱- آللهای واقعی و موثر	۱۹
۳-۲-۲- تنوع ژنتیکی	۲۰
۳-۲-۳- تعادل هاردی- واینبرگ	۲۱
۳-۲-۴- فاصله و شباهت ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})	۲۲
۳-۳- بحث و نتیجه گیری	۲۳
۴- ماهی کلمه	۲۸
۴-۱- روش کار	۲۸
۴-۱-۱- نمونه برداری	۲۸
۴-۱-۲- استخراج DNA و واکنش PCR	۲۸
۴-۱-۳- آنالیز آماری	۲۹

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
۴-۲- نتایج	۳۰
۴-۲-۱- آللهای واقعی و موثر	۳۳
۴-۲-۲- تنوع ژنتیکی	۳۴
۴-۲-۳- تعادل هاردی- واینبرگ	۳۵
۴-۲-۴- فاصله و شباهت ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})	۳۵
۴-۳- بحث و نتیجه گیری	۳۷
۵- ماهی آزاد	۴۰
۵-۱- روش کار	۴۰
۵-۱-۱- نمونه برداری	۴۰
۵-۱-۲- استخراج DNA	۴۰
۵-۱-۳- واکنش PCR	۴۰
۵-۱-۴- آنالیز آماری	۴۱
۵-۲- نتایج	۴۱
۵-۲-۱- تنوع ژنتیکی	۴۲
۵-۲-۲- فاصله ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})	۴۳
۵-۲-۳- رسم درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining	۴۴
۵-۳- بحث و نتیجه گیری	۴۶
۶- سس ماهی	۴۸
۶-۱- روش کار	۴۸
۶-۱-۱- نمونه برداری	۴۸
۶-۱-۲- استخراج DNA	۴۸
۶-۱-۳- واکنش PCR	۴۹
۶-۱-۴- آنالیز آماری	۴۹
۶-۲- نتایج	۴۹
۶-۲-۱- تنوع ژنتیکی	۵۱
۶-۲-۲- فاصله ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})	۵۲
۶-۲-۳- رسم درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining	۵۳

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
۶-۳- بحث و نتیجه گیری	۵۴	۵۴
۷- ماهی سوف	۵۶	۵۶
۷-۱- روش کار	۵۶	۵۶
۷-۱-۱- نمونه برداری	۵۶	۵۶
۷-۱-۲- استخراج DNA	۵۶	۵۶
۷-۱-۳- واکنش PCR	۵۷	۵۷
۷-۱-۴- آنالیز آماری	۵۷	۵۷
۷-۲- نتایج	۵۸	۵۸
۷-۲-۱- آللهای واقعی و موثر	۶۱	۶۱
۷-۲-۲- تنوع ژنتیکی	۶۲	۶۲
۷-۲-۳- تعادل هاردی - واینبرگ	۶۳	۶۳
۷-۲-۴- فاصله و شباهت ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})	۶۴	۶۴
۷-۳- بحث و نتیجه گیری	۶۵	۶۵
منابع	۶۸	۶۸
چکیده انگلیسی	۷۳	۷۳

چکیده

در این بررسی تعداد ۶۱۱ عدد ماهی سفید (۲۴۰ نمونه)، کلمه (۱۶۰ نمونه)، آزاد (۷۵ نمونه)، سس (۴۶ نمونه) و سوف (۹۰ نمونه) از نواحی غربی (سواحل استان گیلان)، میانی (سواحل استان مازندران) و شرقی (سواحل استان گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر و همچنین تالاب انزلی، رودخانه تجن، گرگانرود، سفیدرود و خلیج گرگان جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها پس از صید، در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شده است. پس از استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به هر ماهی انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Gene Alex، MEGA و Arlequin محاسبه شد. - ماهی سفید: از مجموع از ۱۰ جایگاه ریزماهواره بررسی شده، ۹ جایگاه پلی مورف و یک جایگاه مونومورف بود. میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $7/26 \pm 0/49$ و $4/37 \pm 0/35$ بوده است. همچنین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار بترتیب $0/55 \pm 0/03$ و $0/69 \pm 0/02$ بوده است. بررسی‌ها نشان داده که کلیه نمونه‌ها به جز نمونه‌های گلستان و تجن در جایگاه *LOC4* و نمونه‌های منطقه گیلان در جایگاه *MF2* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($P < 0/05$). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گلستان با گیلان، گلستان با سفیدرود، گلستان با تجن، مازندران با سفیدرود و گیلان با تجن معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

- ماهی کلمه: در این بررسی از ۷ جایگاه ریزماهواره استفاده شد که هر ۷ جایگاه پلی مورف بود. میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $5/75 \pm 0/30$ و $4/76 \pm 0/25$ بوده است. همچنین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $0/58 \pm 0/18$ و $0/73 \pm 0/01$ بوده است. علاوه بر این کلیه نمونه‌ها به جز نمونه‌های گلستان در جایگاه *LOC3* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P < 0/05$) را نشان دادند. بر اساس آنالیزهای انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گلستان با گیلان، گیلان با مازندران و گیلان با خلیج گرگان معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

- ماهی آزاد: در این بررسی از روش تعیین توالی استفاده شده که در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۴۵ هاپلوטיפ مشاهده گردید. میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $0/61 \pm 0/35$ و $0/33 \pm 0/12$ بوده است. بیشترین تنوع هاپلوتایپی ($0/89 \pm 0/04$) مربوط به رودخانه سردابرو و کمترین آن در نمونه‌های آستارا مشاهده شد ($0/81 \pm 0/02$). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی $0/13 \pm 0/07$ در رودخانه‌های سردابرو و چالوس و کمترین آن $0/11 \pm 0/06$ در رودخانه تنکابن بود. نتایج بدست آمده از مقدار F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن ($0/08$) و حداقل F_{ST} ($0/01$) مشاهده شده است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های آستارا با چالوس، آستارا با تنکابن، چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

- ماهی سس: طول قطعه DNA تکثیر شده در تمامی نمونه‌ها ۸۰۰ جفت باز بود که ۲۴ جایگاه متغیر در توالی‌های مختلف مشاهده گردید. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۲ هاپلو تیپ مشاهده گردید که بیشترین تعداد در منطقه گیلان (۸ هاپلو تیپ) بوده است. میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $0/003 \pm 0/035$ و $0/42 \pm 0/125$ بود. نتایج نشان دادند که تنوع هاپلوتاپی نمونه‌های رودخانه سفید رود با سایر نمونه‌ها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0/05$). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی $0/005 \pm 0/003$ در سفیدرود و کمترین آن $0/001 \pm 0/001$ در تجن مشاهده شده است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های تجن با گیلان، مازندران با سفیدرود معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

- ماهی سوف: جهت بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سوف از روش ریزماهواره استفاده شده است. برای این منظور ۷ جایگاه مورد ارزیابی قرار گرفت که تمامی جایگاه‌ها پلی مورف بودند. میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $6/14 \pm 0/45$ و $3/88 \pm 0/34$ بوده است. میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $0/62 \pm 0/03$ و $0/70 \pm 0/02$ بود. نتایج نشان داد که اکثر نمونه‌ها در جایگاه‌های *PflaL6*، *PflaL7* و *PflaL8* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P < 0/05$) معنی‌دار بود. همچنین نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن ($0/30$) بین نمونه‌های گیلان با مازندران که دارای کمترین میزان جریان ژنی ($8/18$) است، مشاهده می‌شود. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گیلان با مازندران و گلستان با مازندران معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، ماهی سفید، کلمه، آزاد، سس، سوف، دریای خزر

کلیات

۱- مقدمه

استفاده از منابع آبزیان دریائی به صورت مطمئن و پایدار، یکی از ملزومات صید از دریاها است. صید بی‌رویه باعث صدمه اکوسیستم‌های دریایی شده و حتی به از بین رفتن برخی گونه‌ها می‌انجامد. به همین دلیل و با افزایش رشد جمعیت و نیاز به منابع دریایی، اهمیت مدیریت اصولی ذخایر روشن می‌شود. بسیاری از محدودیتهای روشهای مختلف اصلاح نژاد و شناسائی ساختارهای ژنتیکی آبزیان دریائی ریشه در فقدان ابزارهای مناسب برای مطالعات ژنتیکی دارد. مارکرهای مولکولی و نشانگرهای DNA ابزار مناسبی هستند که بر اساس آن می‌توان جایگاه ژنی و کروموزمی ژنهای تعیین کننده صفات مطلوب را شناسائی کرد.

امروزه شناسایی گونه‌ها، زیر گونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره برداری مناسب موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها یا جمعیت‌های با ارزش و بازسازی ذخایر خواهد شد. هدف مدیریت شیلاتی، ماکزیمم برداشت پایدار از ذخایر ماهیان است که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می‌باشد. در ابتدا تشخیص گونه‌ها، جمعیت‌ها، نژادها و ارزیابی ساختار ذخایر با استفاده از صفات مرفومتريک و مریستیک مثل طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی، تکهای مصنوعی صورت می‌گرفت. اما با توجه به حساسیت بالای صفات مرفومتريک و مریستیک به تغییرات محیطی و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان و از طرفی محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها (Santi-Rampazzo et al., 2008) مشکلاتی را برای محققین بوجود می‌آورد. پیشرفت علم و استفاده از نشانگرهای مولکولی مثل Microsatellite، RAPD، AFLP، RFLP و تعیین توالی که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Ryman, 1991).

بر اساس تعریف جمعیت، در یک اکوسیستم آبی هر فرد به عنوان یک خزانه ژنی محسوب می‌شود که عواملی همچون فاصله نسلیها، صید بی‌رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاهها منجر به کاهش اندازه جمعیت‌های موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می‌گردد.

هدف اصلی از اجرا این پروژه، شناسائی ساختار ژنتیکی ماهیان اقتصادی دریای خزر است که ذخایر آنان کاهش یافته و یا در معرض خطر قرار دارند. این مطالعه مقدمه ای برای ایجاد بانک ژنی اینگونه ماهیان می‌باشد.

۱-۱- ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum* (Kamansky 1901)

ماهی سفید عمدتاً در حوزه جنوبی خزر از رودخانه کورا واقع در ضلع غربی تا رودخانه اترک واقع در جنوب شرقی پراکنده است. در حوزه جنوبی دریای خزر ذخایر این ماهی در منطقه گیلان به مراتب بیشتر از منطقه مازندران و گلستان است. این ماهی در حوزه دریای خزر بیشتر در قسمت جنوبی و میانی دیده می‌شود و از این نواحی جهت تخم ریزی به رودخانه های دیناچال، گرگانرود، شلمان رود، فیدرود، تنکابن، شفلرود،

حویق، لنگرود، آستارا، و غره وارد می‌شود، در قسمت آذربایجان وارد رودخانه اترک و کورا و تعداد بسیار کمی هم وارد دلتای رودخانه و لنگران می‌گردد. ماهی سفید نه تنها قبل از سن بلوغ به طور پیوسته در دریا زندگی می‌کند بلکه پس از رسیدن به سن بلوغ فقط به مدت کوتاهی آن هم صرفاً برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوزه جنوبی مهاجرت می‌کند و بقیه ایام سال را برای تغذیه و رشد در دریا به سر می‌برد. ماهی سفید در دریا فقط در فصول مختلف با توجه به درجه حرارت آب و مواد غذایی موجود در بستر دریا و جریانهای دریایی محیطهای زندگی خود را تغییر داده و بنا به نیاز خود مهاجرتها را انجام می‌دهد. مطالعات انجام گرفته در طی سالهای متمادی در ارتباط با مهاجرت ماهی سفید نشان می‌دهد که مهاجرت پس از شروع سیرکولاسیون بهاره و با توجه به به حرارت هوا ممکن است از اواخر بهمن یا اسفند آغاز شود. ماهی سفید رفته رفته از نقاط عمیق دریا به ساحل مهاجرت می‌کند و با گرم شدن تدریجی آب در نقاط کم عمق بر میزان مهاجرت افزوده می‌شود به طوریکه در یک شرایط تقریباً مساعد و در اواخر اسفند ماه گله‌های ماهی سفید به سمت ساحل هجوم می‌آورند. در این هنگام ماهیانی که به سن بلوغ رسیده‌اند تمایل بیشتری به ساحل و آب شیرین رودخانه‌ها نشان می‌دهند و این ماهیان بنا به خواستگاه طبیعی خود رودخانه‌های مورد نظر را به منظور زاد و ولد تعقیب می‌نمایند. مهاجرت به رودخانه‌ها تا پایان تخم‌ریزی که عمدتاً تا اواخر اریبشت ماه است ادامه دارد و ماهیان گروه گروه به این رودخانه‌ها مهاجرت می‌نمایند.

۲-۱- ماهی کلمه *Rutilus rutilus*

ماهی کلمه از توان سازگاری بالایی برخوردار بوده و در رودخانه‌ها و دریاچه‌های نواحی پست زندگی می‌کند. اصولاً آبهای با جریان بطئی را ترجیح می‌دهد اما در نهرهایی با جریان سریع مشاهده گردیده است. نسبت به تغییرات درجات حرارت مقاوم بوده و در آبهایی با مقادیر نسبتاً اندک اکسیژن به زندگی خود ادامه می‌دهد. این ماهی آبهای لب شور را نیز تحمل می‌کند و در مناطق با شوری پایین نیز زندگی می‌کند. کلمه در شرایط مناسب تا دوازده سال زندگی می‌کند. این گونه به استثناء شبه جزیره لیبول، ایتالیا، یونان، نروژ و اسکاتلند در سایر نقاط اروپا وجود دارد. در سواحل شمالی ایران، مرداب انزلی و خلیج گرگان مناطق مناسب برای ماهی کلمه می‌باشد.

بطور کلی دو نوع مهاجرت برای کلمه شناخته شده است:

۱- مهاجرت تولید مثلی که از دریا به رودخانه‌ها صورت می‌گیرد. بنظر می‌رسد درجه حرارت آب و طول روز در این نوع مهاجرت نقش داشته باشند. بطور کلی ماهیانی که در قسمت شمالی دریای خزر زیست می‌کنند در فصل تخم‌ریزی، زمانی که دمای آب کمتر از ده درجه سانتی‌گراد است به رودهایی چون ولگا، اورال، امبا و ترک مهاجرت می‌کنند و در سواحل جنوبی نیز به رود اترک و رودهای گرگانرود، قره سو، تالار لاریم،

شلمانرود و مرداب انزلی مهاجرت می کنند. در هنگام مهاجرت به رودخانه ابتدا ماهیان بزرگتر وارد رودخانه می شوند در اواخر فصل تخمیزی نرها در رودخانه در اکثریت هستند.

۲- مهاجرت برای زمستان گذرانی: در اواخر تیر ماه، ماهیان کلمه بصورت متفرق در آبهای دور از ساحل در اعماق ۵-۶ متر پدیدار می گردند و در ماههای شهریور و مهر به سواحل نزدیک می شوند. در ابتدا دسته های متفرق هستند ولی از مهر ماه این دسته ها بهم می پیوندند و گله های متراکم، بزرگ و انبوهی را تشکیل می دهند. این گله ها به آهستگی به دلتای رودها نزدیک می شوند. هنگامیکه به عمق یک الی یک و نیم متر رسیدند به شکل توده های انبوهی در گودیها به خواب زمستانی فرو می روند و نهایتاً در حوالی اسفند ماه وارد رودخانه می شوند.

۳-۱- ماهی آزاد *Salmo trutta caspius*

ماهی آزاد حوضه جنوبی دریای خزر در واقع نوعی قزل آلای قهوه ای است که به خاطر جنه ی بزرگ و محیط زیست دریایی آن، به ماهی آزاد دریای خزر معروف گردیده است (عمادی، ۱۳۶۴).

ماهی آزاد دریای سفید حدود ۱۵-۱۰ هزار سال قبل به دریای خزر راه یافته و از آنجا به دو طریق مختلف به دریاها ی سیاه و آرال نفوذ کرده است (عمادی، ۱۳۶۴). ماهی آزاد در ایران در قسمتهای جنوبی، غربی و شمالی دریای خزر پراکنش دارد. این ماهی دریازی و رود کوچ بوده و در ایران برای تخمیزی به رودخانه های استان های گیلان، مازندران از جمله آستارا، کرگانرود، شفارود، ناورود، سفیدرود، صفارود، تنکابن، سردآبرود، چالوس، بابل رود و ... وارد می شود (عباسی و همکاران، ۱۳۷۸).

ماهی آزاد بیشتر عمر خود را در دریا سپری می کند. پس از ورود به دریا، ۳-۵ سال در دریا تغذیه و رشد کرده و پس از رسیدن به سن بلوغ به رودخانه مادری مهاجرت می کند (کریم پور و حسین پور، ۱۳۶۷).

آزاد ماهیان شکارچی و دارای رژیم گوشتخواری می باشند و جانوران ریز آبی را شکار می کنند و می بلعند. تغذیه ی بچه ماهیان آزاد در طبیعت ابتدا از زئوپلانکتون ها، لارو حشرات، پاروپایان، کرمها و سپس از بچه ماهیان ریز می باشد. پس از ورود به دریا از انواع ماهیان نظیر کیلکا ماهیان، گل آذین ماهیان، شگک ماهیان جوان، سایر بچه ماهیان و کفزیان تغذیه می کنند (Kazancheev, 1981).

ماهیان آزاد در سن ۳-۴ سالگی و حداکثر ۵ سالگی بالغ می شوند (Kazancheev, 1981). ۴۵٪ ماهیان آزاد مهاجر به رودخانه ها را ماهیان نر و ۵۵-۵۰٪ آنها را ماهیان ماده تشکیل می دهند. بدین ترتیب نسبت تقریباً متعادلی از ماهیان نر و ماده جهت تکثیر به رودخانه ها کوچ می نمایند (کریم پور و حسین پور، ۱۳۶۷). مکان مناسب رودخانه برای تکثیر طبیعی این ماهی باید دارای مشخصاتی نظیر آب زلال، خنک، سرشار از اکسیژن و بستر سنگریزه ای و شنی (منطقه اپی لیتورال رودخانه) باشد. مولدین ماهی آزاد حوضه جنوبی دریای خزر ایران در آب با دمای ۱۰-۴ °C و اشباع از اکسیژن بسته به شرایط رودخانه تکثیر می کنند (ستاری، ۱۳۸۲). دمای بالای

۱۵°C باعث مرگ و میر تخمها می‌شود. تخمهای این ماهی درشت بوده، قطر متوسط آنها ۱.۵ میلی‌متر و حداقل و حداکثر قطر تخم گزارش شده نیز ۴.۳ و ۱.۶ میلی‌متر می‌باشد. مدت زمان انکوباسیون تخمها بسته به شرایط دمای آب ۳۰-۵۵ شبانه روز طول می‌کشد (Kazanchev, 1981).

ماهی آزاد دریای خزر از جمله ماهیان مهاجر رود رو و بومی دریای خزر می‌باشد (بریمانی، ۱۳۵۶). این ماهی دارای دو فرم بهاره و پاییزه می‌باشد. مهاجرت پاییزه این ماهی از ۱۵ شهریور تا ۵ آبان ماه انجام گرفته و برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های کورا، ترک، سامور و رودخانه‌های کوچک سواحل جنوبی دریای خزر از جمله: آستارا، کرگانرود، سفارود، ناورود و به ویژه تنکابن مهاجرت می‌کند ولی در رودخانه‌های ولگا و اورال به ندرت دیده می‌شود. مهاجرت بهاره نیز در ماههای اسفند و فروردین انجام می‌گیرد و ماهیان خود را به قسمتهای بالادست رسانیده و چندین ماه را در آنجا به سر می‌برد. حدود ۷۰٪ ماهی‌های آزاد که جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌های ایران کوچ می‌کنند دارای مهاجرت پاییزه (تخم‌دان رسیده) و ۳۰٪ دارای مهاجرت بهاره (نارس) می‌باشند.

۴-۱- ماهی سوف *Lucioperca lucioperca*

سوف معمولی مهمترین گونه از خانواده سوف ماهیان می‌باشد زیرا علاوه بر سوف معمولی دو گونه سوف دریایی *Lucioperca marina* و سوف حاج طرخان *Perca flaviatilis* نیز در دریای خزر و در محدوده آبهای ایران صید می‌شوند ولی سوف معمولی بیشترین تعداد و گستردگی را نسبت به دو گونه دیگر دارد. ماهی سوف یکی از ماهیان بسیار مهم با گوشت سفید و خوش طعم و تقریباً بدون تیغ است. سوف معمولی دارای بدنی دراز که تا ۵۰-۱۲۰ سانتی متر و وزن ۶ تا ۱۰ کیلو گرم نیز می‌رسد. در آبهای ایران در زمان گذشته به مقدار زیاد در خلیج انزلی و مقدار کمی در خلیج گرگان صید می‌شد.

ماهی سوف آب شور را بخوبی تحمل می‌کند ولی نسبت به آلودگی آب بسیار حساس است و هر گونه کثافت و آلودگی آب بطور اعم در هر دو گونه این ماهی اثر نامطلوبی دارد و می‌تواند در حرکت ماهی چه در داخل رودخانه و چه در منطقه دریا و یا در مصب موثر باشد. سوف معمولی برای تخم‌ریزی در ماههای بهمن تا فروردین به رودخانه مهاجرت می‌کند. این ماهی در نقاط نسبتاً عمیق که بستر آن شنی و ماسه‌ای و از گیاه پوشیده شده باشد بر روی این گیاهان تخم‌ریزی می‌کند. تخم ماهی سوف ریز و بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار می‌رسد. سن بلوغ ماهی سوف جهت تولید مثل سال سوم زندگی است. نوزادان ماهی سوف پس از تفریح در رودخانه می‌مانند ولی از انبوه گیاهان آبی دوری می‌جویند زیرا امکان دارد که در میان این گیاهان سایر ماهیان درنده مانند اردک ماهی درکمین آنها باشد. مناطق اصلی تخم‌ریزی ماهی سوف در تالاب انزلی، خلیج گرگان و رودخانه سفیدرود بوده است. ماهی سوف در تمام کرانه ساحلی دریای مازندران گسترده بوده و لذا رقم چشمگیری را در صید سالیانه شیلات و شرکتهای تعاونی صیادی تشکیل می‌داد بطوریکه در سالهای ۱۳۰۶ تا

۱۳۱۳ میانگین صید آن از ۳ هزار تن بوده است. صید این ماهی از آن پس با کاهش شدیدی همراه بوده بطوریکه در طی سالهای ۱۳۳۰ تا ۱۳۷۰ بجز در موارد نادر کمتر از ۲۵ تن بوده است. از سال ۱۳۶۹ تکثیر مصنوعی ماهی سوف انجام گردید و بمنظور کمک به حفظ این گونه با ارزش هر ساله میلیونها بچه ماهی سوف رهاسازی می گردد حاصل این فعالیت تغییر روند منحنی صید از حالت نزولی به وضعیت صعودی در سالهای اخیر است ولی صید آن دارای نوساناتی بوده است بطوریکه از ۲.۷ تن در سال ۱۳۷۱ به ۹۵ تن در سال ۱۳۷۷ رسید و سپس صید کاهش یافته و به ۱۸ تن در سال ۱۳۷۹ رسید اما در سال ۱۳۸۰ میزان صید مجدداً افزایش یافت. طی دوره ۱۰ سال ۱۳۸۰ - ۱۳۷۱ میزان صید بطور متوسط ۷.۲۳ تن بوده است. در حالیکه متوسط میزان صید طی ۱۰ ساله ۱۳۱۵ تا ۱۳۶۶ برابر ۲۶۶ تن بوده است.

آنچه که در مورد ماهی سوف امید وار کننده است ضریب بازگشت نسبتاً مناسب این ماهی طی سالهای اخیر بوده است بطوریکه ضریب بازگشت آن طی سالهای ۷۴ و ۷۵ به ترتیب ۷ و ۱۰ درصد بوده است ولی آنچه که مایه تاسف است آن است درصد بالایی از آنرا ماهیان غیر استاندارد تشکیل می دهند که توسط پره صیادی صید می شوند و به دلیل خاصیت حساس و ظریف این ماهی حتی با وضع قوانین محکم امکان برگرداندن آن به دریا ممکن نیست و ماهی تلف می شود.

۵-۱- سس ماهی *Barbus brachycephalus*

سس ماهیان گروهی از کپور ماهیان بزرگ آبهای شیرین هستند که با نام زردک نیز معروف هستند. تقریباً تمام خانواده دسته *Barbus* در مقایسه با کپور که بطور نمونه در لجنهای بستر استخرها و آبهای آرام ساکن می شوند، زرده پرها معمولاً در بسترهای شنی و سنگی در آبهایی با جریان تند با حجم اکسیژن حل شده بالا یافت می شوند.

سس ماهی پر بالغ طولی بین ۲۵ تا ۱۰۵ سانتی متر و وزنی بین ۲۰۰ گرم تا ۱۰ کیلوگرم دارد. اگرچه وزنهای حدود ۱ تا ۲ کیلوگرم بیشتر معمول هستند. اندازه زرده پرها در رودخانه های بزرگ از این نیز تجاوز می کند. این ماهیان بدنی کشیده داشته و از طرفین کمی فشرده هستند است. همچنین سر و فلس های بزرگی دارند. نوعی از سس ماهی در حوضه خزر وجود دارد که سری پهن و اندازه ای بزرگ تر دارد اما اخیراً بسیار کمیاب است. نام *Barbel* از واژه لاتین *Barba* به معنی ریش یا هرگونه برآمدگی تیز شبیه مو استنتاج شده است که اشاره به حسگرهای مو مانند رشد کرده در طرفین دهان سس ماهی دارد. تخم ریزی عمدتاً از خرداد تا تیر انجام می شود.

به طور گروهی وارد رودخانه می شوند و در نقاط کم عمق تخم ریزی می کنند. ۳ تا ۹ هزار تخم می گذارند که زرد رنگ و چسبناک است و به سنگ ها و گیاهان می چسبد. نسبت جنسی نر به ماده هفت به یک است.

۲- مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- مطالعات داخل کشور

مطالعات مولکولی جمعیت‌های ماهیان متجاوز از ۳۵ سال پیش آغاز گردیده است (Froufe et al., 2002) / در ابتدا الکتروفورز ژل نشاسته با رنگ آمیزی هیستوشیمیایی همراه بود که اولین مارکرهای ساده ژنتیکی در بررسی جمعیت‌های طبیعی محسوب می‌شود. با توجه به گسترش و پراکندگی کپور ماهیان مطالعات گسترده‌ای بر روی این ماهیان صورت گرفته است. رضوانی و همکاران (۱۳۸۵) تنوع ژنتیکی ۵ گونه از کپور ماهیان (ماهی سفید، سس، ماش، سیم و کلمه) به روش RFLP مورد بررسی قرار داده که ۵ آنزیم از ۱۳ آنزیم مورد استفاده الگوهای چند شکلی را برای هر یک از گونه‌ها نشان داده است. در بررسی دیگر جمعیت ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از آنالیز RFLP مورد مطالعه قرار گرفته است (Rezvani et al., 2007). محصول PCR نمونه‌های کلمه جمع آوری شده از دو منطقه بندر انزلی و بندر ترکمن با ۱۳ آنزیم اندونوکلاز مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که در مجموع ۴ هاپلویتپ متفاوت شناسائی گردید (Rezvani et al., 2007). آنالیز شبیه سازی با هزار بار تکرار، تفاوت معنی داری بین هاپلویتپ‌های مناطق مختلف نشان نداده است ($p \geq 0.05$).

علاوه بر مطالعات فوق، جمعیت سس ماهی بزرگ سر، نیز به روش PCR-RFLP در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر انجام شد که نتایج حاصله پدیده پلی مورفیسم را در نمونه‌های مورد بررسی نشان نداد (لالویی و همکاران، ۱۳۸۲)، همچنین مطالعات متعددی با روش RFLP در مورد کیلکا ماهیان (لالویی و همکاران، ۱۳۸۵) انجام شد. خارا (۱۳۸۳) با بررسی ناحیه ای در میتوکندری با طول ۳۵۰۰ جفت باز توانست جمعیت وارداتی سیم (*Abramis brama*) از آذربایجان را از جمعیت‌های بومی جدا کند. با استفاده از این روش میزان تنوع درون گونه‌ای جمعیت سیم تالاب انزلی و دریای خزر صفر بود و در نمونه‌های ارس خیلی پایین بود که دلیل آن کاهش ذخایر این گونه عنوان گردید. Keyvan shokooh و همکاران (2007)، با استفاده از ۶ جایگاه ریز ماهواره ای تنوع جمعیتی کلمه تالاب انزلی و خلیج گرگان را مورد بررسی قرار دادند و به وجود اختلاف ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه پی بردند.

ریحانی (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) جمعیت این ماهی در روسیه را متفاوت از جمعیت‌های انزلی و خلیج گرگان دانست، اما نتوانست تفاوتی بین جمعیت کلمه انزلی و ترکمن مشاهده نماید. قاسمی و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی ساختار جمعیتی جمعیت‌های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) با استفاده از روش میکروساتلایت این دو جمعیت را از هم جدا دانست.

نویدی مقدم فومنی (۱۳۸۴)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه بچه ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره به وجود تنوع ژنتیکی در آنها پی برد و هتروزیگوسیتی را در هر لوکوس بین ۰/۷۵۶-۰/۴۰۶ به دست آورد. رفیعی (۱۳۸۵)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ نمونه بچه ماهی آزاد دریای خزر از جمعیت غرب استان مازندران (تنکابن) با استفاده از روش PCR-RFLP، به وجود پلی مورفیسم در آنها پی برد

و دامنه هتروزایگوسیتی را بین ۰/۸-۰/۹ و دامنه تعداد آلل را بین ۳-۶ عدد در هر لوکوس به دست آورد. لالویی و همکاران (۱۳۸۷)، در بررسی ژنتیک جمعیت تعداد ۲۶۰ نمونه ماهی کپور معمولی حوضه ی جنوبی دریای خزر (نواحی غربی، میانی و شرقی حوضه جنوبی دریای خزر، تالاب انزلی، رودخانه ی تجن، گرگانرود و خلیج گرگان) با استفاده از روش PCR-RFLP و بهره گیری از ژنهای ناحیه ی ND- 5/6 و ND- 3/4 مولکول mtDNA پرداختند و در مجموع ۱۴ و ۱۲ هاپلوتایپ متفاوت به ترتیب برای ژنهای ND- 5/6 و ND- 3/4 مشاهده کردند. چکمه دوز (۱۳۸۸)، در مطالعه ی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه با استفاده از روشهای تعیین توالی DNA و ریز ماهواره به وجود تفاوت ژنتیکی بین این دو نژاد پی برد.

قریب خانی (۱۳۸۸)، در مطالعه ی ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی ۱۵۸ عدد سوف حاجی طرخان در تالاب های انزلی و امیرکلایه لاهیجان و ۲۰۷ عدد سوف سفید در سد ارس و حوضه جنوب غربی دریای خزر با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریز ماهواره اعلام نمود که حداقل دو جمعیت متمایز از ماهی سوف حاجی طرخان در سه منطقه مورد بررسی و حداقل سه جمعیت متمایز از سوف سفید در چهار منطقه ی مورد بررسی وجود دارد.

رضایی و همکاران (۱۳۸۹)، در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ۲۵ عدد ماهی سفید در سواحل استان گلستان (رودخانه های گرگانرود و قره سو) با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره در همه جایگاه های ژنی پلی مورف را مشاهده نمودند. درافشان و همکاران (۱۳۸۹)، کاربرد نشانگر ریز ماهواره را در بررسی صحت آمیخته گری بین دو گونه اقتصادی آزاد ماهیان ایران (جنس ماده قزل آلاهی رنگین کمان و جنس نر ماهی آزاد دریای خزر) را مورد مطالعه قرار دادند و بیان نمودند که نتایج تولیدی آمیخته حقیقی بوده و توارث کاملی از باندهای اختصاصی والدین را دارا هستند.

عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹)، ساختار ژنتیک جمعیت ۲۹۴ عدد ماهی سفید حوضه ی جنوبی دریای خزر (رودخانه های سفیدرود، شیرود، تجن و لمیر) را با استفاده از روش PCR-RFLP و بهره گیری از مولکول mtDNA و ۳۰ عدد ماهی سفید از هر رودخانه را با استفاده از روش ریز ماهواره مورد بررسی قرار دادند. Yousefian (2011)، در بررسی تنوع ژنتیکی ماهیان آزاد جوان دریای خزر با استفاده از آغازگرهای ریز ماهواره مورد بررسی قرار داده و دامنه ی آلل مشاهده شده در هر لوکوس در والدین و فرزندان را به ترتیب ۱۳-۸ و ۱۱-۷ و دامنه آلل مؤثر در آنها را به ترتیب ۸/۸-۴/۶ و ۹/۲-۵/۲ به دست آورد. Kalbassi و Jamshidi (2011)، در بررسی ارتباط بین شکلهای مهاجر بهاره و پاییزه ۶۲ عدد ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از ۱۶ آغازگر RAPD، ۱۷-۵ عدد آلل به ازای هر جایگاه با متوسط ۱۰/۱۲۵ به دست آوردند و میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت را به ترتیب ۰/۹۸۵۸ و ۰/۱۴۳۰ محاسبه نمودند.

Sourinejad و همکاران (2011) بررسی انتساب نسب فرزندان ۸ عدد مولد ماده و نر ماهی آزاد دریای خزر موجود در مرکز شهید باهنر کلاردشت از جمعیت رودخانه تنکابن با استفاده از ۳ جفت آغازگر ریز ماهواره را بررسی

نمودند/ متوسط تعداد آلل در والدین و فرزندان را به ترتیب ۷ و ۶/۶۶، متوسط هتروزایگوسیتی مشاهده شده در والدین و فرزندان را به ترتیب $0/191 \pm 0/833$ و $0/111 \pm 0/723$ و متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب $0/134 \pm 0/800$ و $0/009 \pm 0/684$ محاسبه نمودند.

۲-۲- مطالعات خارج از کشور

Banks و همکاران (2000)، با استفاده از آنالیز داده‌های میکروستلایت وجود پنج زیر جمعیت مجزا را در ماهیان آزاد چینوک در ناحیه ی مرکزی کالیفرنیا نشان دادند.

Adams و همکاران (2003)، با استفاده از تکنیکهای صید، نشانه گذاری، رهاسازی و صید مجدد و ریز ماهواره به بررسی ساختار جمعیتی قزل آلای جویباری دریاچه‌های حوضه ی آبریز خلیج هند پرداختند و سطح بالایی از هتروزایگوسیتی (۰/۲۷-۰/۶) را مشاهده نمودند.

Beacham و همکاران (2004)، با استفاده از ۱۴ لوکوس ریز ماهواره ساختار جمعیت دو نوع دریاچه ای و رودخانه ای سوکی سالمون را در ۴۷ جمعیت رودخانه های شمال بریتیش کلمبیا بررسی کردند.

Yoon و همکاران (2007)، در مطالعه ی آنالیز میتوکندریایی و ریز ماهواره ای جمعیت‌های (*Oncorhynchus keta walbaum*) تنوع ژنتیکی بالاتری را در روش ریز ماهواره نسبت به روش DNA میتوکندریایی مشاهده و اعلام نمودند بهتر است در مطالعه ی ساختار جمعیتی از هر دو نشانگر استفاده گردد.

Taylor و همکاران (2007)، با استفاده از نشانگر ریز ماهواره به بررسی وضعیت بومی بودن و تمایز تکاملی قزل آلای رنگین کمان در منطقه ی شرق کانادا پرداختند. Vera و همکاران (2011)، ساختار ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر ایران جمع آوری شده از رودخانه های کرگانرود (۸ عدد)، ناورود (۸ عدد) و تنکابن (۶۶ عدد) و ۴۸ عدد بچه ماهی حاصل از جمعیت رودخانه ی سردآبرود را با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره و توالی یابی mtDNA مورد مطالعه قرار دادند. در روش ریز ماهواره همه ی جایگاه ها باندهای پلی مورفیک تولید نمودند و بیشترین تعداد آلل مشاهده شده (۲۳) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰/۹۰۲) در جایگاه *Strutta58* دیده شد.

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

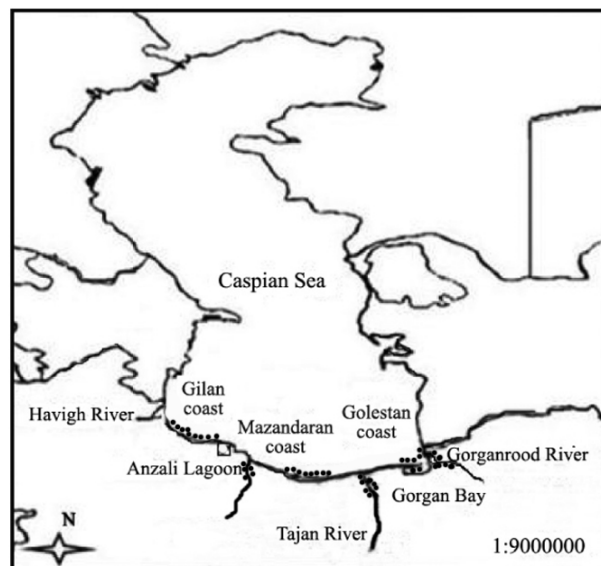
Thai و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۴ لوکوس ریز ماهواره ای به مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) دروینتام پرداخته و تنوع بالایی را در ماهیان وحشی نسبت به ماهیان پرورشی مشاهده کردند. Bonnie و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی ۶ جمعیت از ماهی *Perca flavescens* را با استفاده از ریز ماهواره ها در مناطقی از آمریکای شمالی مورد بررسی قرار دادند. همچنین Osvaldo و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی و فیلوژنی این ماهی را به روش تعیین توالی DNA میتوکندری مطالعه نمودند.

۳- ماهی سفید

۳-۱- روش کار

۳-۱-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهی سفید با استفاده از تور پره (دریا) و صیدبادام گوشگیر رودخانه ها) از نواحی غربی (سواحل استان گیلان)، میانی (سواحل استان مازندران) و شرقی (سواحل استان گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری گردیده است. تعداد کل نمونه ها ۲۴۰ عدد بوده که از دریا ۱۲۰ نمونه (مازندران، گیلان و گلستان) و رودخانه های سفیدرود، تجن و گرگانرود هر رودخانه ۴۰ نمونه جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها پس از صید، باله دمی ماهی در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده است. شکل ۱-۲ محل های نمونه برداری را نشان میدهد.



شکل ۱-۲: موقعیت محل های نمونه برداری ماهی سفید در حوضه جنوبی دریای خزر

۳-۱-۲- استخراج DNA

استخراج DNA با بهینه سازی روش فنل - کلروفرم انجام گردیده است (Fevolden & Pogson, 1997). در این روش مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از بافت باله را درون یک میکروتیوپ قرار داده و پس از خرد کردن، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر STE، ۳۰ میکرولیتر SDS و ۴ میکرولیتر پروتیناز K به آن اضافه شد/ نمونه ها به مدت ۳-۴ ساعت در حمام آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده و سپس مقدار ۵۰۰ μ l فنل به آن اضافه شد. پس از این مدت لوله ها ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفته و سپس در ۱۳۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید/ پس از سانتریفوژ لایه رویی بدقت جدا و به یک میکروتیوپ دیگر منتقل گردید. سپس مقدار ۵۰۰ μ l کلروفرم به آن اضافه و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ مجدداً لایه

روی را جدا و مقدار ۴۰ μl استات سدیم و حدود ۲ برابر حجم برداشت شده (حدود ۸۰۰ μl) الکل مطلق به آن اضافه شد / سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوب شیری رنگ تشکیل شده را با الکل ۷۰ درجه شستشو و پس از خشک شدن مقدار ۵۰ μl آب مقطر استریل به آن اضافه و بمدت ۳۰-۴۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده تا DNA حل گردد. جهت بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید استفاده شد. در روش اسپکتروفتومتری مقدار جذب اتمی نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شده است.

۳-۱-۳- واکنش PCR

برای انجام واکنش PCR ابتدا نیاز به طراحی پرایمر می باشد. در این بررسی از ۱۰ جفت پرایمر مربوط به جایگاه های مختلف ریزماهواره استفاده شد (جدول ۱-۲).

جدول ۱-۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جایگاههای مختلف میکروستالاتی برای ماهی سفید

Locus	Primer sequence	Annealing (°C)	Size (bp)	Accession No/	Reference
<i>Ca1,2</i>	F: AAGACGATGCTGGATGTTTAC R: CTATAGCTTATCCCGGCAGTA	51	112-136	AF277573	Dimoski et al/ 2000
<i>Ca3,4</i>	F: GGACAGTGAGGGACGCAGAC R: TCTAGCCCCCAAATTTTACGG	61	240-280	AF277574	Dimoski et al/ 2000
<i>Ca5,6</i>	F: TTGAGTGGATGGTGCTTGTA R: GCATTGCCAAAAGTTACCTAA	55	140-172	AF277575	Dimoski et al/ 2000
<i>Ca7,8</i>	F: GTGAAGCATGGCATAGCACA R: CAGGAAAGTGCCAGCATAAC	57	132-156	AF277576	Dimoski et al/ 2000
<i>Syp2</i>	F: GCAGGAGCGAAACCATAAAT R: AAACAGGCAGGACACAAAGG	58	204-280	AY318779	Turner et al/ 2004
<i>Syp4</i>	F: CACGGGACAATTTGGATGTTTTAT R: AGGGGGCAGCATAACAAGAGACAAC	60	204-288	AY318777	Turner et al/ 2004
<i>Syp5</i>	F: ATTTTTAGGAGTGATGTTTCAGCAT R: CAAGTGTGTCATTGAGGATGTGAG	53	164-200	AY318778	Turner et al/ 2004
<i>Syp6</i>	F: TTACACAGCCAAGACTATGT R: CAAGTGATTTTGCTTACTGC	57	132-140	AY318776	Turner et al/ 2004
<i>MFW2</i>	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	57	208-224	EF144125	Crooijmans et al/, 1997
<i>Lco4</i>	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	57	104-120	EF144125	Crooijmans et al/, 1997

واکنش PCR با استفاده از ۵ μl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ μM ، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، MgCl_2 با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۰ μl برسد، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته کردن ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمر ۵۱ تا ۶۱ درجه سانتیگراد در جایگاه های مختلف بمدت ۳۰ ثانیه و بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است.

کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰ pb و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۱-۳- آنالیز آماری

فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثر در جایگاه های میکروستلاستی، شاخص شانون، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس χ^2 ، مقادیر F_{ST} و R_{ST} ، جریان ژنی، تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۶ منطقه و ۳ گروه یا ناحیه (شامل ناحیه گیلان، مازندران و گلستان) بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار Gene Alex version 6 محاسبه گردید (Peakall and Smouse, 2005).

درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی بروش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA version 4 ترسیم گردید (Tamura et al., 2007).

۲-۳- نتایج

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه های ماهی سفید انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سفید از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشد. نتایج نشان داده که از مجموع از ۱۰ جایگاه ریزماهواره بررسی شده در ماهی سفید، ۹ جایگاه پلی مورف و یک جایگاه مونومورف (*SYP5*) بوده است که جزئیات آن در جدول ۲-۲ و شکل های ۲-۲ تا ... آورده شده است. همانگونه که جدول نشان می دهد بیشترین تعداد آلل در جایگاه *SYP4* و کمترین آلل در جایگاه *SYP5* می باشد. همچنین جدول ۳-۲ فراوانی هر یک از آللهای را در مناطق مختلف نشان می دهد.

جدول ۲-۲ خصوصیات جایگاههای ریزماهورهبررسی شده در ماهی سفید

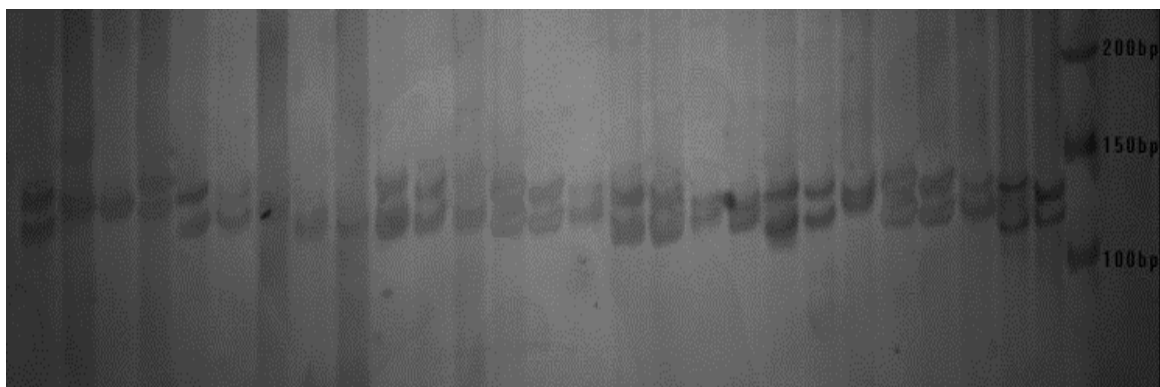
تعداد آئل	محدوده آئلی (pb)	تعداد چرخه	دمای اتصال °C	جایگاه
۷	۱۱۲-۱۳۶	۳۰	۵۱	CA1,2
۱۲	۲۰۴-۲۸۰	۳۰	۶۱	CA3,4
۹	۱۴۰-۱۷۲	۳۰	۵۵	CA5,6
۷	۱۳۲-۱۵۶	۳۰	۵۷	CA7,8
۱۴	۲۰۴-۲۸۰	۳۰	۵۸	Syp2
۱۵	۲۰۴-۲۸۸	۳۰	۶۰	Syp4
۲	۱۶۴-۲۰۰	۳۰	۶۳	Syp5
۳	۱۳۲-۱۴۰	۳۰	۵۷	Syp6
۵	۱۰۴-۱۲۰	۳۰	۵۸	Lco4
۵	۲۰۸-۲۲۴	۳۰	۶۰	MFW2

جدول ۲-۳ فروانی آئله‌ها در جایگاه‌ها و مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید

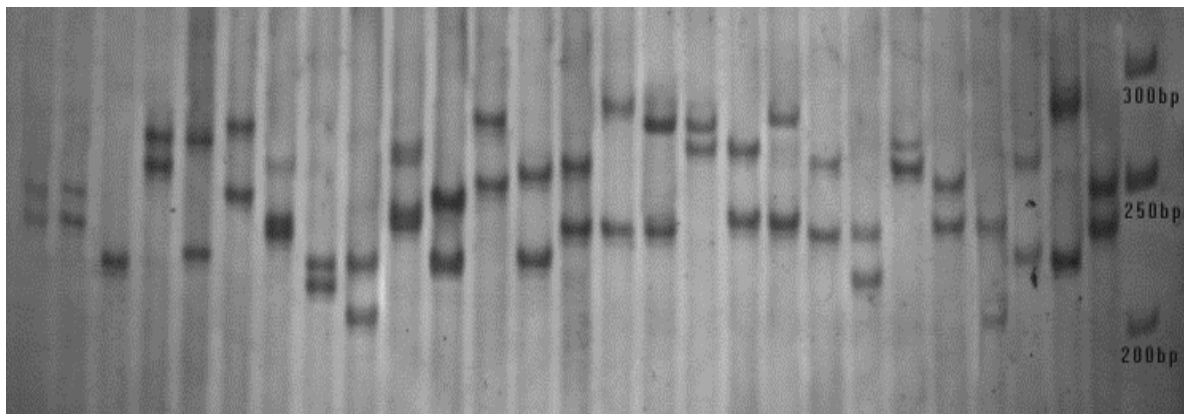
جایگاه	آئل	گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
CA1,2	۱	۰/۲۰	۰/۳۱	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۰۸	۰/۳۶
	۲	۰/۳۹	۰/۳۵	۰/۴۵	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۳۲
	۳	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۴۰
	۴	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۷	۰/۴۰
	۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۷
	۶	۰/۲۴	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۳۰	۰/۲۶	۰/۱۶
	۷	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
CA3,4	۱	۰/۱۱	۰/۳۱	۰/۲۷	۰/۲۵	۰/۱۶	۰/۲۹
	۲	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۱۶	۰/۰۰
	۳	۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۰۰
	۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۰۰
	۵	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۵
	۶	۰/۲۴	۰/۱۹	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۲۱
	۷	۰/۲۱	۰/۱۹	۰/۰۷	۰/۱۶	۰/۰۸	۰/۱۵
	۸	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۹
	۹	۰/۴۰	۰/۰۵	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۰۲	۰/۰۷
	۱۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۹	۰/۰۱
	۱۱	۰/۰۹	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
	۱۲	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۲۰	۰/۱۰

جایگاه	آلل	گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
CA5,6	۱	۰/۲۰	۰/۳۱	۰/۴۰	۰/۲۷	۰/۲۱	۰/۳۲
	۲	۰/۲۰	۰/۱۴	۰/۰۶	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۰
	۳	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۶
	۴	۰/۳۹	۰/۲۴	۰/۲۱	۰/۲۵	۰/۲۹	۰/۲۹
	۵	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۱۱
	۶	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۱۰
	۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰
	۸	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۶	۰/۱۱	۰/۰۷	۰/۰۰
	۹	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰
CA7,8	۱	۰/۲۶	۰/۱۵	۰/۲۲	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۲۱
	۲	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۱۰	۰/۱۷	۰/۰۷	۰/۰۰
	۳	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۵۵
	۴	۰/۱۹	۰/۱۱	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۰
	۵	۰/۰۰	۰/۱۰	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۷
	۶	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۶
	۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰
SYP2	۱	۰/۱۰	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۰۵
	۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۷
	۳	۰/۱۲	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۱۰
	۴	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
	۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۰
	۶	۰/۴۶	۰/۵۰	۰/۳۹	۰/۴۴	۰/۵۴	۰/۴۱
	۷	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲
	۸	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰
	۹	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۶
	۱۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۱۱
	۱۱	۰/۰۰	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۶
	۱۲	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۱۱
	۱۳	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۱
	۱۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۲
SYP4	۱	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۷
	۲	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۱
	۳	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۰	۰/۱۲
	۴	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۱۱	۰/۰۷
	۵	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۵

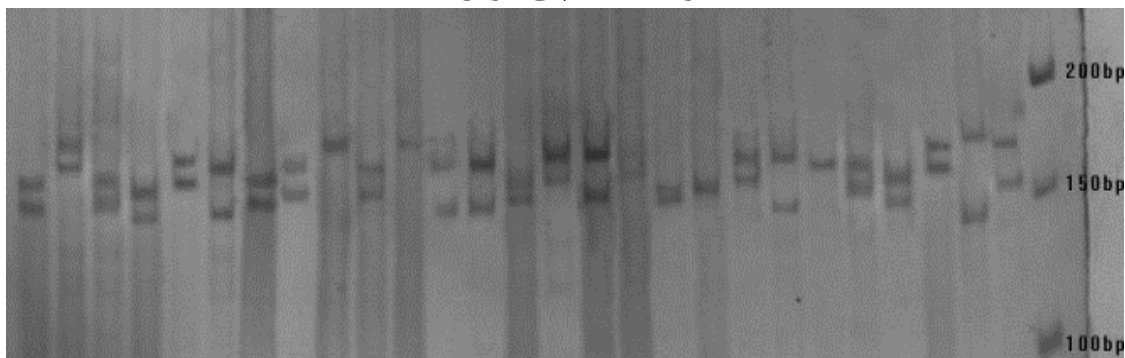
جایگاه	آلل	گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
	۶	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۹
	۷	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵
	۸	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۱۴	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۴
	۹	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۷
	۱۰	۰/۰۹	۰/۱۰	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۵
	۱۱	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۴
	۱۲	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۵
	۱۳	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۲۰	۰/۰۴	۰/۱۲
	۱۴	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۰۱
	۱۵	۰/۱۵	۰/۱۰	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۱۴
<i>SYP6</i>	۱	۰/۸۶	۰/۸۴	۰/۸۵	۰/۸۲	۰/۸۹	۰/۸۲
	۲	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۱۰	۰/۰۵	۰/۰۶
	۳	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۱۱
<i>LOC4</i>	۱	۰/۷۰	۰/۵۲	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۵۱	۰/۵۹
	۲	۰/۱۶	۰/۲۹	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۳۰	۰/۲۰
	۳	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۳۱	۰/۴۰	۰/۱۶	۰/۲۰
	۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۱
	۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۰۰
<i>MW4</i>	۱	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۲۷	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۳۲
	۲	۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۴۷	۰/۴۱	۰/۴۰
	۳	۰/۱۵	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۱۴
	۴	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۱۵	۰/۱۴
	۵	۰/۰۰	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۴	۰/۰۰



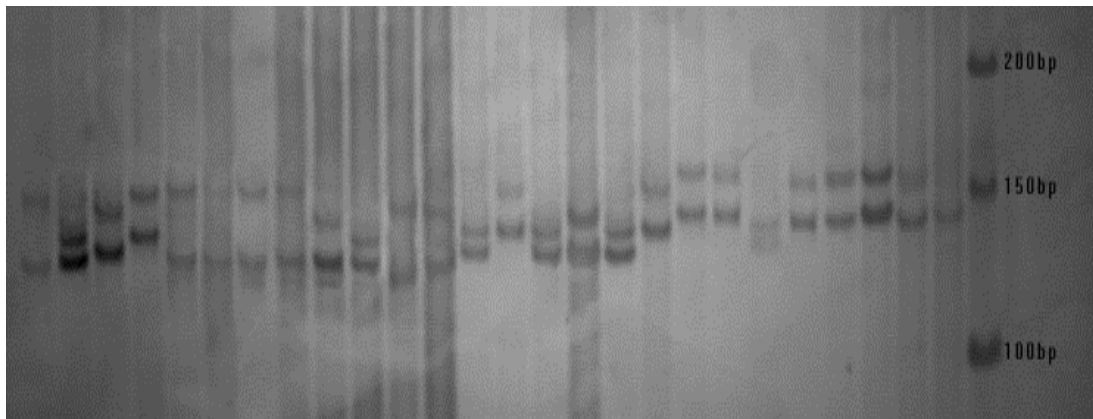
شکل ۲-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *CAI2* مربوط به نمونه‌های ماهی سفید بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪



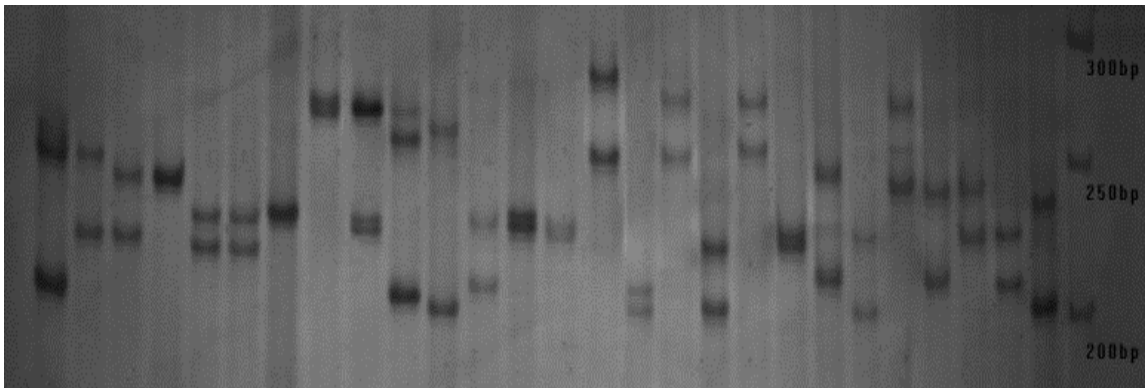
شکل ۳-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA3,4 مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



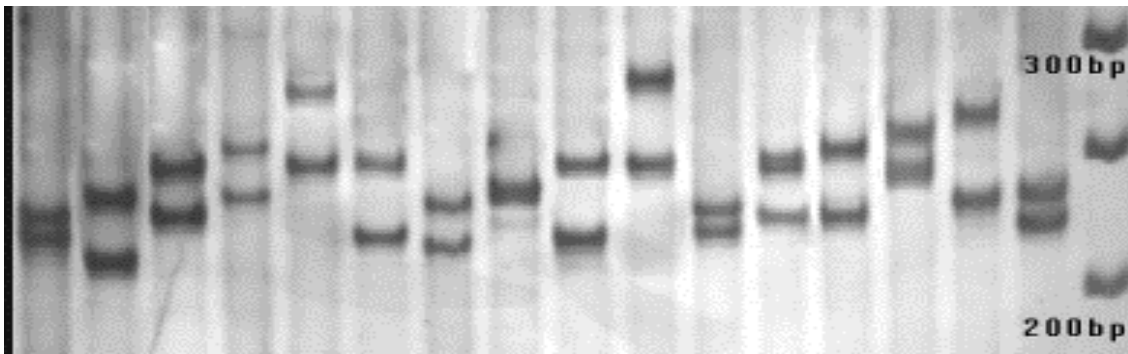
شکل ۴-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA5,6 مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



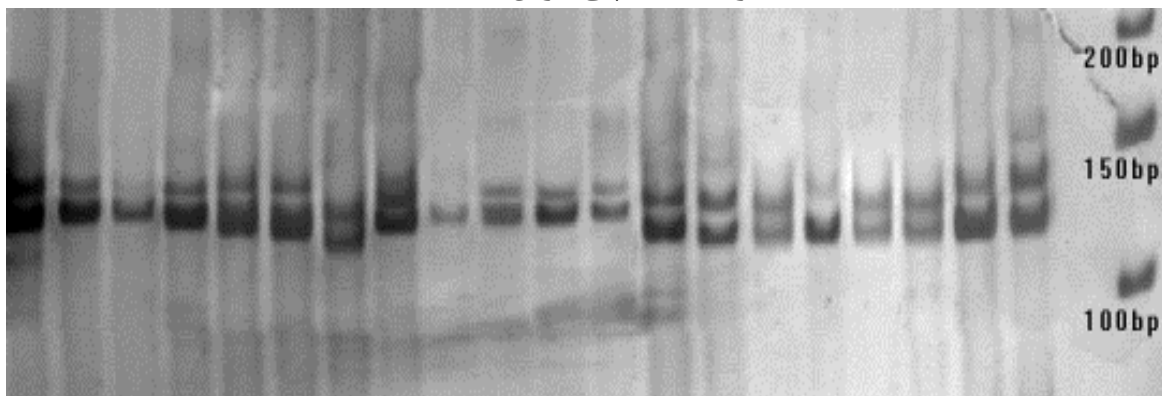
شکل ۵-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA7,8 مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



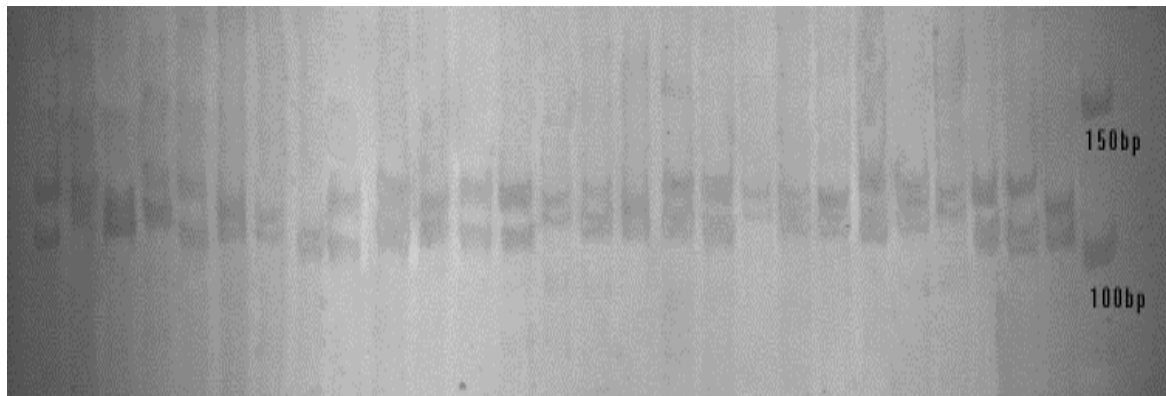
شکل ۶-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *Lco3* مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



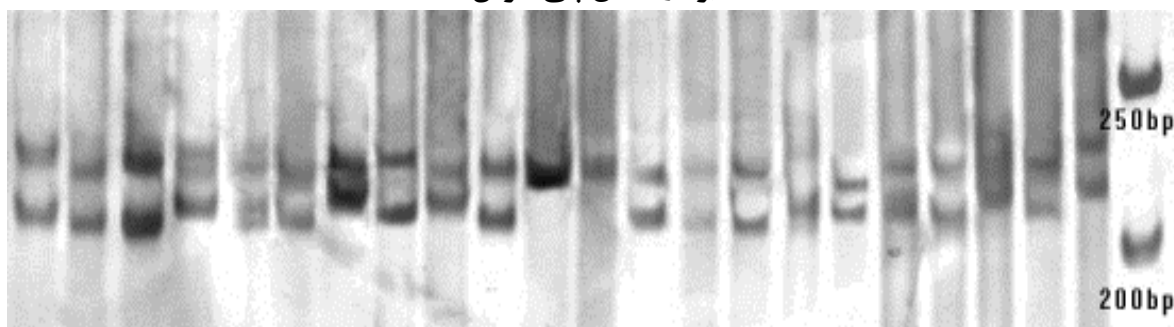
شکل ۷-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *Lco5* مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۸-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *Syp6* مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۹-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *LCO4* مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۱۰-۲- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *MWF2* مربوط به نمونه های ماهی سفید بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪

۱-۲-۳- آللهای واقعی و موثر

همانگونه که جدول ۴-۲ نشان می دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه *SYP4* مربوط به نمونه های مازندران، گیلان و گرگانرود (۱۵ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاههای *SYP6* و *LOC4* (۳ آلل) می باشد. بیشترین تعداد آلل موثر (۱۱/۶۸ آلل) در جایگاه *SYP4* در نمونه های مازندران و کمترین مقدار آن در جایگاه *SYP6* مربوط به نمونه های گرگانرود (۱/۴۳ آلل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل های واقعی (۷/۸۲) در بین نمونه های گیلان و کمترین آن (۷/۲۲) در تجن مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین آلل موثر (۴/۵۲) در نمونه های گیلان و کمترین آن (۴/۲۶) در سفیدرود بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۷/۲۶ \pm ۰/۴۹$ و $۴/۳۷ \pm ۰/۳۵$ بوده است.

جدول ۴-۲ تعداد ال واقعی (N_A) و موثر (N_E) جایگاه‌های بررسی شده در ماهی سفید

جایگاه	گلستان		مازندران		گیلان		سفیدرود		تجن		گرگانرود	
	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A
CAI,2	۳/۸۸	۷	۳/۸۸	۷	۳/۴۳	۷	۳/۴۳	۷	۲/۷۵	۵	۳/۵۰	۶
CA3,4	۷/۰۲	۱۱	۵/۴۳	۱۰	۶/۵۳	۱۱	۶/۵۳	۱۱	۶/۸۸	۹	۷/۶۷	۹
CA5,6	۴/۴۳	۶	۴/۸۶	۶	۴/۱۸	۸	۴/۱۸	۸	۵/۱۵	۸	۵/۲۸	۷
CA7,8	۲/۸۱	۵	۲/۶۳	۵	۲/۶۱	۵	۲/۶۱	۵	۳/۱۵	۶	۲/۵۸	۵
Syp2	۳/۷۵	۹	۳/۴۳	۱۰	۴/۹۵	۱۲	۴/۹۵	۱۲	۴/۳۹	۱۳	۳/۰۹	۱۰
Syp4	۱۰/۳۹	۱۴	۱۱/۶۸	۱۵	۱۰/۱۹	۱۵	۱۰/۱۹	۱۵	۸/۵۳	۱۳	۹/۰۴	۱۵
Syp6	۱/۳۳	۳	۱/۴۰	۳	۱/۳۶	۳	۱/۳۶	۳	۱/۴۴	۳	۱/۲۶	۳
LOC4	۱/۸۷	۳	۲/۵۴	۳	۳/۱۲	۵	۳/۱۲	۵	۲/۹۷	۵	۲/۶۳	۴
MFW2	۳/۳۴	۴	۴/۱۱	۵	۴/۳۴	۵	۴/۳۴	۵	۳/۱۱	۵	۳/۶۳	۴
میانگین	۶/۸۸		۴/۳۱	۷/۱۱	۴/۵۲	۷/۸۹	۴/۵۲	۷/۸۹	۴/۲۶	۷/۴۴	۷/۲۲	۷/۲۶
SE	۱/۲۶		۰/۹۳	۱/۳۱	۰/۹۹	۱/۳۳	۰/۸۶	۱/۳۳	۰/۷۵	۱/۲۰	۰/۸۵	۱/۲۷

۲-۲-۳-نوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۴-۲ نشان می‌دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۹۲) در جایگاه CAI,2 مربوط به نمونه‌های گیلان بوده و کمترین آن در جایگاه SYP6 (۰/۲۲) بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۹۱) در جایگاه SYP4 و در نمونه‌های مازندران و گرگانرود و کمترین مقدار آن در جایگاه SYP6 مربوط به نمونه‌های تجن (۰/۲۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۵۹) در بین نمونه‌های گیلان و کمترین آن (۰/۵۲) در تجن و گرگانرود مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۵) در نمونه‌های مازندران و کمترین آن (۰/۶۷) در سفیدرود بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب 0.55 ± 0.03 و 0.69 ± 0.02 بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها (به غیر از CAI,2) کاهش هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر H_E نسبت به H_0 وجود دارد.

جدول ۲-۵ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد بررسی در ماهی سفید

جایگاه		گلستان		مازندران		گیلان		سفیدرود		تجن		گرگانرود	
H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O
CA1,2	0/82	0/74	0/77	0/74	0/77	0/74	0/92	0/70	1/00	0/71	0/70	0/72	0/70
CA3,4	0/37	0/85	0/35	0/81	0/35	0/45	0/45	0/84	0/25	0/47	0/42	0/82	0/42
CA5,6	0/37	0/77	0/52	0/79	0/52	0/65	0/65	0/76	0/52	0/37	0/65	0/77	0/65
CA7,8	0/47	0/64	0/35	0/62	0/35	0/32	0/32	0/61	0/50	0/32	0/45	0/63	0/45
Syp2	0/42	0/73	0/55	0/70	0/55	0/62	0/62	0/79	0/65	0/52	0/52	0/78	0/52
Syp4	0/62	0/90	0/80	0/91	0/80	0/75	0/75	0/90	0/47	0/55	0/77	0/91	0/77
Syp6	0/27	0/24	0/32	0/28	0/32	0/30	0/30	0/26	0/35	0/22	0/35	0/30	0/35
LOC4	0/45	0/46	0/55	0/60	0/55	0/52	0/52	0/67	0/47	0/60	0/25	0/57	0/25
MFW2	0/92	0/70	0/77	0/75	0/77	0/77	0/77	0/77	0/55	0/60	0/90	0/69	0/90
میانگین	۰/۵۳	۰/۶۷	۰/۵۶	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۷۰	۰/۵۹	۰/۶۹	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۵۲
SE	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷

۳-۲-۳- تعادل هاردی- واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان و تجن در جایگاه LOC4 و نمونه های منطقه گیلان در جایگاه MFW2 انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ ($P < 0/05$)، ($P < 0/001$) را نشان دادند (جدول ۲-۶).

جدول ۲-۶ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید

منطقه	CA1,2	CA3,4	CA5,6	CA7,8	SYP2	SYP4	SYP6	LOC4	MFW2
گلستان	χ^2	۶۱/۳۵	۱۸۵/۳۶	۱۰۹/۷۱	۳۱/۴۷	۱۳۸/۳۳	۱۷۸/۹۷	۲/۹۵	۲۵/۸۴
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۴۰	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	***
مازندران	χ^2	۴۷/۱۱	۱۷۱/۶۳	۹۰/۶۷	۶۲/۷۷	۱۲۵/۳۵	۱۹۷/۱۸	۸/۱۹	۳۰/۹۷
	/Pro	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۴	۰/۰۰۱
	Sig,	***	***	***	***	***	***	*	***
گیلان	χ^2	۴۹/۴۷	۱۶۰/۸۸	۷۱/۴۱	۵۲/۸۵	۱۳۹/۲۰	۲۱۲/۸۳	۳۴/۶۴	۱۱/۲۹
	/Pro	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۳
	Sig,	***	***	***	***	***	***	***	ns
سفیدرود	χ^2	۴۰/۰۰	۱۸۹/۴۵	۶۰/۰۴	۷۸/۵۷	۱۸۲/۶۳	۱۹۲/۲۲	۲۵/۸۲	۵۹/۵۸
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	**	***
ت. ج.	χ^2	۱۰۶/۵۵	۱۸۱/۰۲	۱۱۷/۰۹	۴۱/۹۰	۱۶۲/۷۱	۱۸۶/۵۰	۷/۶۶	۳۲/۷۷

منطقه	CA1,2	CA3,4	CA5,6	CA7,8	SYP2	SYP4	SYP6	LOC4	MFW2
گرگانرود	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۲۶	۰/۸۸	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	ns	ns	***
	χ^2	۴۶/۶۹	۱۱۶/۵۴	۹۲/۱۴	۶۴/۳۹	۱۶۸/۰۹	۲۰۲/۷۳	۱/۸۰	۲۹/۹۰
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۶۱	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	*

ns=not significant, * P<0/05, ** P<0/01, *** P<0/001

۴-۲-۳-فاصله و شباهت ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۷-۲ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۰) بین گرگانرود و سفیدرود می‌باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲) بین نمونه‌های گرگانرود و مازندران مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقاً برعکس فاصله ژنتیکی می‌باشد.

جدول ۷-۲ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی برحسب مناطق مختلف نمونه‌برداری ماهی سفید (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می‌باشد)

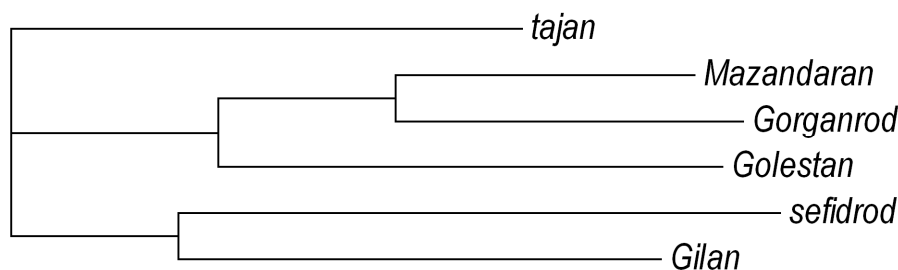
گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
0/00	0/96	0/93	0/91	0/95	0/97
0/04	0/00	0/96	0/91	0/95	0/99
0/07	0/05	0/00	0/96	0/94	0/95
0/09	0/09	0/04	0/00	0/94	0/91
0/05	0/05	0/06	0/06	0/00	0/93
0/03	0/02	0/05	0/10	0/07	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می‌گردد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۰۲) بین نمونه‌های گرگانرود با سفیدرود و تجن که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است مشاهده می‌شود. حداقل F_{ST} (۰/۰۰۱) بین نمونه‌های گرگانرود با گلستان و مازندران که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴/۶۰) است، مشاهده شده است (جدول ۸-۲). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گلستان با گیلان، گلستان با سفیدرود، گلستان با تجن، مازندران با سفیدرود و گیلان با تجن معنی دار بود ($P<0/05$). علاوه بر این طبق محاسبات انجام شده اختلاف بین افراد هر منطقه ۲۲ درصد، داخل افراد ۷۷ درصد و بین جمعیت‌ها ۱ درصد بوده است.

جدول ۸-۲ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سفید (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
0/00	0/12	0/01	0/01	0/04	0/36
0/0.04	0/00	0/13	0/01	0/05	0/47
0/0.17	0/0.04	0/00	0/11	0/03	0/09
0/0.23	0/0.22	0/0.03	0/00	0/02	0/01
0/0.06	0/0.08	0/0.10	0/0.09	0/00	0/01
0/0.01	0/0.01	0/0.05	0/0.24	0/0.16	0/00

علاوه بر آنالیزهای آماری انجام شده، نمودارهای شجره ای نمونه های ماهی سفید در ۶ منطقه مورد بررسی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش Neighbor-joining رسم شد (شکل ۱۱-۲). بر طبق دندروگرام فاصله ژنتیکی حاصل از تمام معیارهای بکار رفته نمونه های جمع آوری شده ماهی سفید از مناطق مختلف، به سه شاخه تقسیم شدند، شاخه اول نمونه های رودخانه تجن، شاخه دوم شامل نمونه های مازندران، گلستان و گرگانرود و شاخه سوم نمونه های گیلان و سفیدرود در آن جای گرفته است.



شکل ۱۱-۲- نمودار شجره ای نمونه های ماهی سفید که بر اساس روش N.J. رسم شده است

۳-۳- بحث و نتیجه گیری

امروزه تنوع ژنتیکی بعنوان نشانگر وضعیت اکولوژیکی در مناطق، نواحی و قبایل متفاوت کاربرد داشته و ابزار منحصر بفرد و توانمندی جهت ارزیابی وضعیت و روند طولانی مدت جوامع زیستی (اعم از آبی و خشکی) می باشد. ارزیابی و کنترل اکولوژی اکوسیستمهای آبی، به نشانگرهای اکولوژیکی نیاز دارد که در طیفی از معیارهای جهانی و جغرافیایی قابل تفسیر باشد. تنوع ژنتیکی بعنوان شاخص شرایط اکوسیستم و قابلیت برداشت منابع آبی می باشد که با روشهای ژنتیک جمعیت قابل بررسی می باشد (Zhou et al., 2004).

طبق مطالعات انجام آنالیز mtDNA می تواند تفاوت های ژنتیکی بین گونه ها و یا جمعیت های درون گونه را آشکار سازد و بنابراین از توان قابل ملاحظه ای جهت حل تناقض های رده بندی آبزبان برخوردار باشد (Nguyer & Nge).

(2001). پلی مورفیسم mtDNA ابزار توانمندی جهت ارزیابی الگوهای جغرافیایی تکاملی ماهیان رود کوچ و آب شیرین می باشد (Thai et al., 2007). هتروزایگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است. و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه نسبت به گونه دیگر و در جمعیت‌های مختلف یک گونه که در هر منطقه می‌باشد متفاوت است. میزان تنوع در ماهیان آب شور بیشتر از ماهیان آب شیرین است و مقدار آن در ماهیان آنادراموس بینابین ماهیان آب شور و شیرین است (Dewoody and Avise, 2000).

در مطالعه حاضر بیشترین هتروزایگوسیتی در ۰/۹۲ در نمونه های گیلان و کمترین آن در ۰/۲۲ مشاهده شده است. ضمن اینکه میانگین هتروزایگوسیتی در کل مناطق بین ۰/۵۵±۰/۰۳ برای جایگاه های مختلف بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزایگوسیتی نشان می‌دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها (به غیر از CAI,2) کاهش هتروزایگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر H_E نسبت به H_D وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی ماهی سفید در حوزه جنوبی دریای خزر کاهش یافته که یکی از دلایل اصلی آن از بین رفتن محل های تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی این ماهی می باشد. در تکثیر مصنوعی به دلیل اینکه انتخاب طبیعی صورت نمی‌گیرد، سطح تنوع ژنتیکی کاهش می یابد. از دست دادن معنی دار تنوع ژنتیکی برای جمعیتها زیان بار بوده و بر میزان برداشت آنها تاثیر گذار می‌باشد. کاهش تنوع ژنتیکی در کوتاه مدت می‌تواند در اصلاح نژاد و پایین بودن سازگاری جمعیتی موثر باشد. این اثر در بلند مدت، بدلیل اینکه پتانسیل پاسخ به استرس در خزانه ژنی محدود می شود، برگشت پذیری جمعیت را کاهش می‌دهد (David et al., 2001). صید بیش از اندازه ماهیان دریایی باعث کاهش تنوع ژنتیکی گردیده و از دست دادن تنوع ژنهای کلیدی می‌تواند موجب کاهش ذخایر گردد (Slechtova et al., 2002). علاوه بر این کاهش تنوع ژنتیکی باعث می‌گردد که ماهیان در مبارزه با تغییرات شرایط اکولوژیکی ناتوان گردند. با تغییرات شرایط اکولوژیکی و قابلیت برداشت از اکوسیستم آبی، اهمیت خصوصیات ژنتیکی ماهیان روشن می‌شود. در ارزیابی و کنترل بیولوژیکی به شاخص‌های اکولوژیکی نیاز است که در طیفی از معیارهای جهانی و جغرافیایی قابل تفسیر باشد.

عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از روش ریزماهواره، جمعیت ماهی سفید را در رودخانه های تجن، شیروود، سفیدرود و لمیر مورد مطالعه قرار دادند. آنان با استفاده از ۸ جایگاه ریزماهواره ای بیشترین هتروزایگوسیتی را (۰/۹۷) در رودخانه شیروود و کمترین آن را (۰/۱۷) در رودخانه تجن بدست آوردند. در مطالعه دیگری که توسط شجاعی (۱۳۸۸) انجام گرفت، مقدار هتروزایگوسیتی اندازه گیری شده در ماهی سفید حوزه جنوبی دریای خزر بین ۰/۰۹ تا ۱ بدست آمد که میانگین آن ۰/۵۲ بود. Thai و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه

تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی در ویتنام، مقدار هتروزیگوسیتی را بین ۰/۴۰ تا ۰/۸۶ بدست آوردند. همچنین LI و همکاران هتروزیگوسیتی را در ماهی کپور معمولی بین ۰/۳۵ تا ۰/۸۰ محاسبه کردند.

Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) با استفاده از روش ریز ماهواره، مقدار هتروزیگوسیتی را ۰/۵۴ و متوسط تعداد الل در هر لوکوس را ۷ اندازه گیری نمودند. آنان علت کمبود هتروزیگوسیتی را اندازه کوچک جمعیت موثر ندانسته اند زیرا نمونه ها مربوط به ماهیانی بودند که قبل از ساخته شدن سد بر روی رودخانه یانگ تسه جمع آوری شده بودند و جمعیت به اندازه کافی بزرگ بود. در این مطالعه هموزایگوسیتی بالا را احتمالاً به وجود اللهای صفر، تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) و تقسیمات جمعیتی نسبت دادند.

قاسمی و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه جمعیت‌های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) میزان هتروزیگوسیتی را در جمعیت‌های ایرانی ۰/۳۵ با متوسط تعداد الل ۳/۹ و در جمعیت آذری ۰/۷ با متوسط تعداد الل ۷/۴ گزارش کرده و پایین بودن هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های ایرانی را به استفاده از تعداد والدین کم در تکثیر مصنوعی و وجود اللهای نول نسبت دادند. Kitanishi و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* با استفاده از روش مایکروستلایت میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۷۳ - ۰/۶۶ با ۶-۲۳ الل برآورد نمودند. Menezes و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه تنوع ژنتیکی *Katsuwonus pelamis* با استفاده از روش میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۵۳ - ۱ با ۷-۳۰ الل برآورد نمودند.

از دیگر مواردی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفته، تعادل هاردی-واینبرگ می باشد. رابطه ای که پیش بینی های ژنوتیپی اخلاف را بر حسب فراوانیهای گامتی (اللی) خزانه ژن والدین بیان می کند، قانون هاردی-واینبرگ نامیده می شود. همانگونه که نتایج نشان داد کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان و تجن در جایگاه *LOC4* و نمونه های منطقه گیلان در جایگاه *MF2* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($P < 0.05$). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ دلایل متعددی می تواند داشته باشد. وجود جمعیت بزرگ با آمیزش اتفاقی (drift)، عدم انتخاب (selection)، عدم مهاجرت (gene flow)، عدم وجود فشار جهش و میوز معمولی در برقراری حالت تعادل موثر می باشند. Menezes و همکاران (۲۰۰۸) انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت‌های *Katsuwonus pelamis* را به وجود اللهای نول و اشتباهات الل خوانی و بالا بودن هتروزیگوسیتی در لوکوسهای میکروساتلایتی نسبت دادند. Kitanishi و همکاران (۲۰۰۷) انحراف از تعادل مشاهده شده در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* را به خطای نمونه برداری نسبت دادند. Zhao و همکاران در سال (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) نیز انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به وجود اللهای صفر (null) و تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) نسبت دادند.

Dahle و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هموزایگوسیتی، آلل‌های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه‌ها

می‌داند. Birgtte و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی جمعیت اردک ماهی (*Esox lucius*) انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در ۱۰٪ جمعیتها به ازای کل جایگاهها مشاهده کرد ($P < ۰/۰۵$, $P < ۰/۰۱$). ایشان این انحراف از تعادل را به اندازه کوچک جمعیت ناشی از حوادث بعد از عصر یخبندان نسبت دادند.

ساختار ژنتیکی جمعیتها به طور قابل ملاحظه ای بسته به رانش، جریان ژنی و مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلند مدت تغییر می‌کند. در بین آبریان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین تری را نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می‌دهند در حالی که ماهیان آب شیرین تنوع ژنتیکی پایین و تمایز ژنتیکی بالاتری را نسبت به ماهیان دریایی نشان می‌دهند. این تمایز به اندازه بزرگ جمعیت موثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیطهای دریایی و اندازه کوچک جمعیت موثر و جریان ژنی محدود در جمعیتهای آب شیرین نسبت داده می‌شود (Brigtte et al., 2005).

در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه برداری کرد. معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم پوشانی نسلی هستند بنابراین اطلاعات ژنتیک جمعیت، اغلب افراد را از نسل‌های مختلف بررسی می‌کند. وقتی نمونه برداری در بیش از یک زمان صورت می‌گیرد راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی تست تمایز بین نمونه‌هاست. مدل‌های مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است، اما هیچ یک از مدل‌های ارائه شده به طور کامل مناسب برای جایگاه ریزماهواره‌ها نیستند. F_{ST} و R_{ST} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییر پذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Meffe and Carool, 1997). در این بررسی نتایج نشان داده که حداکثر F_{ST} (۰/۰۲۳) بین نمونه‌های گرگانرود با سفیدرود و تجن می‌باشد. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گلستان با گیلان، گلستان با سفیدرود، گلستان با تجن، مازندران با سفیدرود و گیلان با تجن معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$). علاوه بر این طبق محاسبات انجام شده اختلاف بین افراد هر منطقه ۲۲ درصد، داخل افراد ۷۷ درصد و بین جمعیت‌ها ۱ درصد بوده است. یکی از دلایل مقدار پائین F_{ST} در نمونه‌های مورد مطالعه، وجود جریانهای ژنی بین مناطق نمونه برداری شده، می‌باشد.

در مطالعه شجاعی و همکاران (...) مقدار F_{ST} بین نمونه‌های ماهی سفید مناطق مختلف اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P < ۰/۰۱$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کورا است. بیشترین اختلاف ژنتیکی ($F_{ST} = ۰/۱۸۲$) بین نمونه‌های رودخانه کورا و نژاد پاییزه تالاب انزلی به دست آمد. عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹) حداکثر F_{ST} را برای نمونه‌های ماهی سفید ۰/۰۱۷ و کمترین آن را ۰/۰۰۷ بدست آوردند. Beacham و همکاران (۲۰۰۲) در تعیین جمعیتی افراد *Oncorhynchus nerka* میزان F_{ST} را ۰/۰۶ تخمین زدند و ۸۹٪ از افراد مورد بررسی در دریاچه‌ها به یک دریاچه و ۹۶٪ افراد

مورد بررسی در رودخانه ها به یکی از دو رودخانه تعلق داشتند. Charrier و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار F_{ST} و فاصله جغرافیایی را مشاهده نکردند و ساختار ژنتیکی ضعیف این ماهی را نشان دهنده جریان ژنی بالای بین مولدین اعلام کردند.

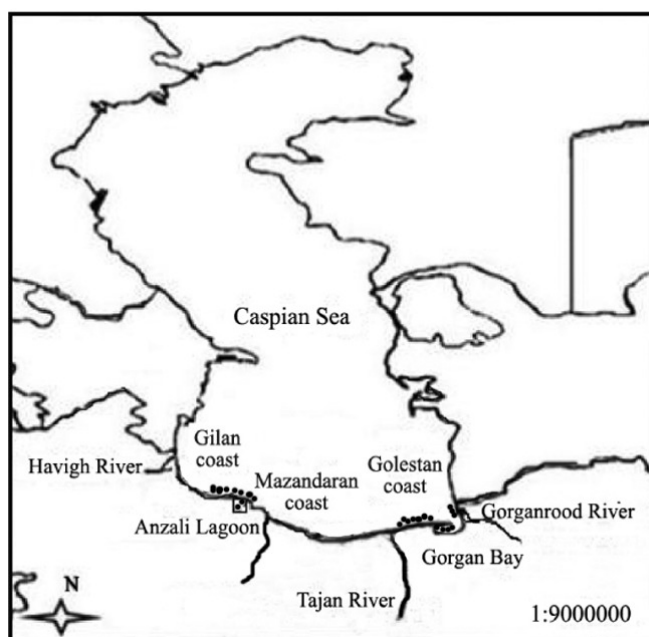
بطور کلی حفظ تنوع ژنی و ذخایر ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. نتایج بررسی ها نشان داده که متاسفانه در حال حاضر تنوع ژنتیکی ماهی سفید در حد پائین می باشد که این کاهش می تواند اثرات منفی بر ذخایر این گونه ارزشمند داشته باشد. وجود تنوع ژنوتیپی، شانس بقای جمعیت را افزایش می دهد. اگر شرایط محیط تغییر کند، ژنوتیپ های سازگار با شرایط جدید حفظ می شوند و ژنوتیپ های ناسازگار کاهش می یابند. بنابراین، تنوع ژنوتیپی باعث می شود که حداقل بعضی از افراد جمعیت در برابر تغییر شرایط محیط زنده بمانند. ولی از سوی دیگر، انتخاب طبیعی با گزینش افراد سازگارتر سبب می شود تا فراوانی ژنوتیپ های سازگارتر افزایش یابد.

۴- ماهی کلمه

۴-۱- روش کار

۴-۱-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهی کلمه با استفاده از تورپره (دریا) از سواحل گیلان (محدوده انزلی)، سواحل مازندران (محدوده امیرآباد)، سواحل گلستان (محدوده گمیشان) و خلیج گرگان جمع آوری گردیده است (شکل ۱-۳). تعداد کل نمونه ها ۱۶۰ عدد بوده که از سواحل هر استان ۴۰ نمونه و خلیج گرگان نیز ۴۰ نمونه جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها پس از صید، باله دمی ماهی در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده است.



شکل ۱-۳: موقعیت محل های نمونه برداری از ماهی کلمه در حوضه جنوبی دریای خزر

۴-۱-۲- استخراج DNA و واکنش PCR

استخراج DNA مطابق روش ذکر شده در بند ۲-۱-۲ (فصل دوم) انجام شد. برای انجام واکنش PCR ابتدا نیاز به طراحی پرایمر می باشد. در این بررسی از ۷ جفت پرایمر مربوط به جایگاه های مختلف ریزماهواره استفاده شد (جدول ۱-۳).

جدول ۱-۳ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جایگاههای مختلف ریزماهوره برای ماهی کلمه

Locus	Primer sequence	Annealing temp/ (°C)	Size (bp)	Accession No/	Reference
<i>Ca1,2</i>	F: AAGACGATGCTGGATGTTTAC R: CTATAGCTTATCCCGGCAGTA	51	104-132	AF277573	Dimsoski et al., 2000
<i>Ca3,4</i>	F: GGACAGTGAGGGACGCAGAC R: TCTAGCCCCCAAATTTTACGG	60	208-272	AF277574	Dimsoski et al., 2000
<i>Ca5,6</i>	F: TTGAGTGGATGGTGCTTGTA R: GCATTGCCAAAAGTTACCTAA	55	148-172	AF277575	Dimsoski et al., 2000
<i>Ca7,8</i>	F: GTGAAGCATGGCATAGCACA R: CAGGAAAGTGCCAGCATAACAC	57	128-160	AF277576	Dimsoski et al., 2000
<i>Lco3</i>	F: GCAGGAGCGAAACCATAAAT R: AAACAGGCAGGACACAAAGG	58	256-284	AY318779	Turner et al., 2004
<i>Lco5</i>	F: TTA CAC AGC CAA GAC TAT GT R: CAA GTG ATT TTG CTT ACT GC	57	104-128	AY318776	Turner et al., 2004
<i>MFW 2</i>	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	57	208-224	EF144125	Crooijmans et al., 1997

واکنش PCR با استفاده از ۵µl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl₂ با غلظت ۲/۵mM، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۰µl برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته کردن ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمر ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد در جایگاه های مختلف بمدت ۳۰ ثانیه و بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بوده است. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰ pb و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۱-۴- آنالیز آماری

فراوانی آللی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثر در جایگاه های میکروستلایتی، شاخص شانون، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، تعادل هاردی-واینبرگ بر اساس χ^2 ، مقدار F_{ST} ، جریان ژنی، تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۴ منطقه و ۳ گروه یا ناحیه (شامل ناحیه گیلان، مازندران و گلستان) بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار Gene Alex version 6 محاسبه گردید. (Peakall and Smouse, 2005).

درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA version 4 ترسیم گردید (Tamura et al., 2007).

۲-۴- نتایج

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه‌های ماهی کلمه انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی کلمه از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. همچنین تمامی ۷ جایگاه ریزماهوره بررسی شده در ماهی کلمه، پلی‌مورف بوده که جزئیات آن در جدول ۲-۳ و شکل‌های ۲-۳ الی ۳-۸ آورده شده است. همانگونه که جدول نشان می‌دهد بیشترین تعداد آلل در جایگاه SYP4 و کمترین آلل در جایگاه SYP5 می‌باشد. همچنین جدول ۳-۳ فراوانی هر یک از آللها را در مناطق مختلف نشان می‌دهد.

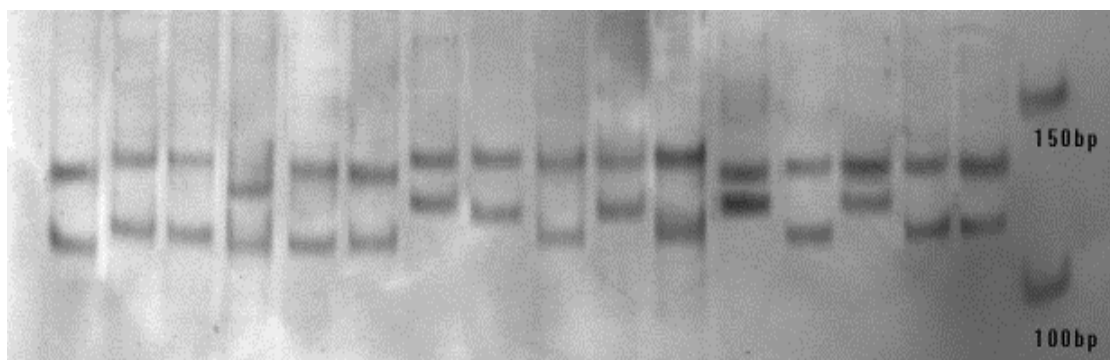
جدول ۲-۳ خصوصیات و نتایج بدست آمده از بررسی جایگاههای ریزماهوره در ماهی کلمه

جایگاه	دمای اتصال °C	تعداد چرخه	محدوده آللی (pb)	تعداد آلل
CA1,2	۵۱	۳۰	۱۱۲-۱۳۲	۶
CA3,4	۶۰	۳۰	۲۰۸-۲۷۲	۹
CA5,6	۵۵	۳۰	۱۴۸-۱۷۲	۷
CA7,8	۵۷	۳۰	۱۲۸-۱۶۰	۸
LCO3	۵۸	۳۰	۲۵۶-۲۸۴	۶
LCO5	57	۳۰	۱۰۴-۱۲۸	۶
MFW2	۶۰	۳۰	۲۰۸-۲۲۴	۵

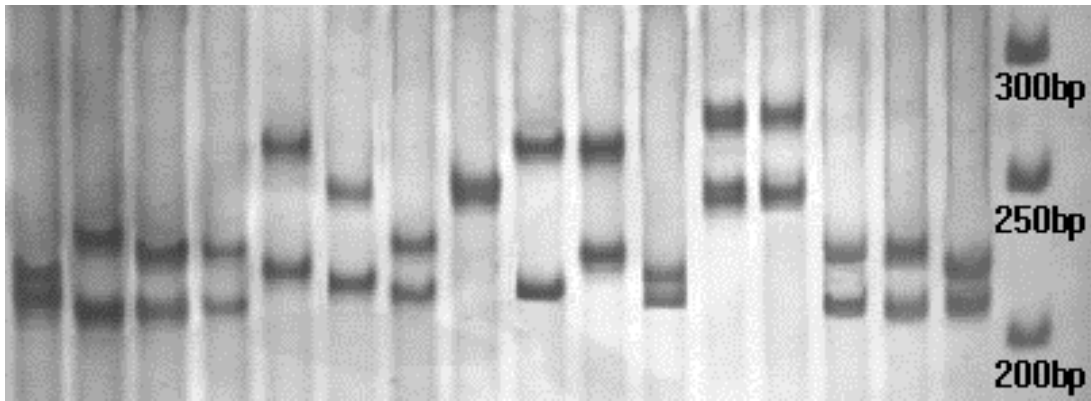
جدول ۳-۳ فراوانی آللها در جایگاه‌ها و مناطق مختلف نمونه برداری ماهی کلمه

جایگاه	آلل	گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
CA1,2	112	0/24	0/25	0/25	0/15
	116	0/29	0/33	0/31	0/21
	120	0/25	0/15	0/13	0/21
	124	0/00	0/00	0/06	0/13
	128	0/19	0/18	0/13	0/16
	132	0/04	0/10	0/13	0/14
CA3,4	208	0/01	0/21	0/15	0/16
	212	0/13	0/26	0/21	0/21
	216	0/14	0/05	0/06	0/05
	220	0/13	0/11	0/15	0/13
	228	0/13	0/11	0/15	0/13
	248	0/08	0/06	0/06	0/09
	260	0/16	0/06	0/08	0/08
	264	0/08	0/06	0/06	0/09
	272	0/16	0/06	0/08	0/08
	148	0/13	0/08	0/05	0/04
CA5,6					

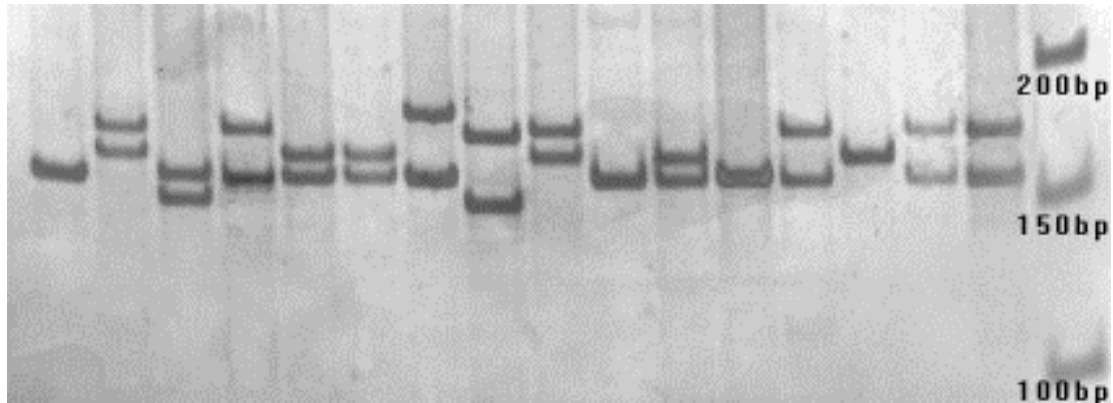
جایگاه	آلل	گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
	152	0/41	0/19	0/20	0/23
	156	0/08	0/00	0/00	0/00
	160	0/29	0/11	0/15	0/14
	164	0/05	0/21	0/18	0/16
	168	0/05	0/31	0/30	0/30
	172	0/00	0/10	0/13	0/14
CA7,8	128	0/06	0/00	0/00	0/00
	132	0/08	0/18	0/26	0/21
	136	0/21	0/18	0/26	0/21
	140	0/18	0/33	0/24	0/29
	144	0/18	0/33	0/24	0/29
	148	0/08	0/00	0/00	0/00
	156	0/11	0/00	0/00	0/00
	160	0/11	0/00	0/00	0/00
LCO3	256	0/15	0/10	0/11	0/16
	268	0/04	0/00	0/00	0/03
	272	0/38	0/45	0/35	0/20
	276	0/00	0/00	0/15	0/24
	280	0/26	0/28	0/25	0/21
	284	0/18	0/18	0/14	0/16
LCO5	104	0/21	0/21	0/20	0/20
	108	0/04	0/00	0/00	0/00
	116	0/21	0/19	0/23	0/19
	120	0/28	0/30	0/25	0/20
	124	0/26	0/30	0/29	0/28
	128	0/00	0/00	0/04	0/14
MW4	208	0/46	0/51	0/31	0/18
	212	0/15	0/14	0/18	0/28
	216	0/24	0/28	0/19	0/23
	220	0/09	0/04	0/16	0/16
	224	0/06	0/04	0/16	0/16



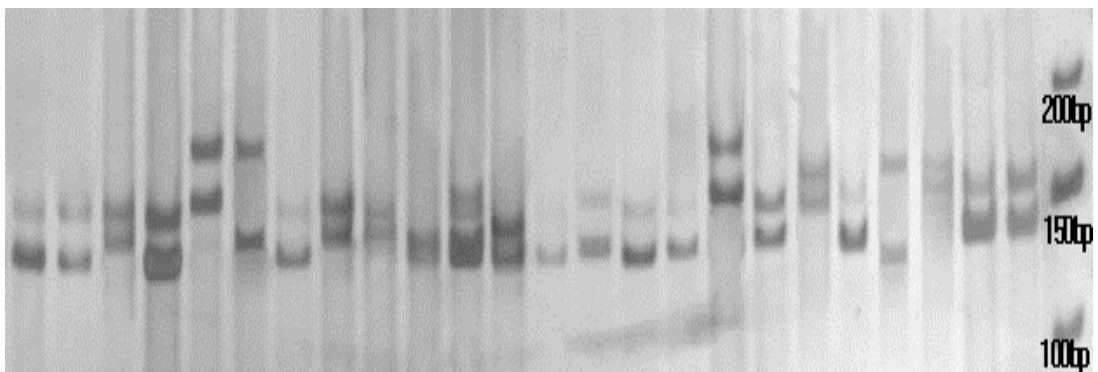
شکل ۲-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA1,2 مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



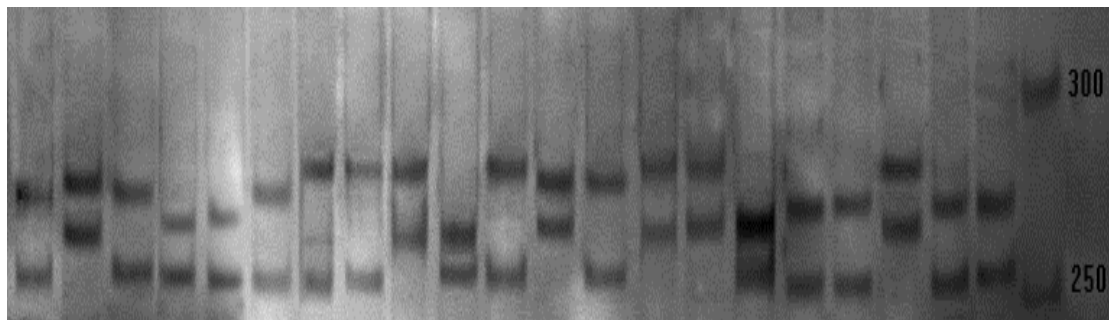
شکل ۳-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA3,4 مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



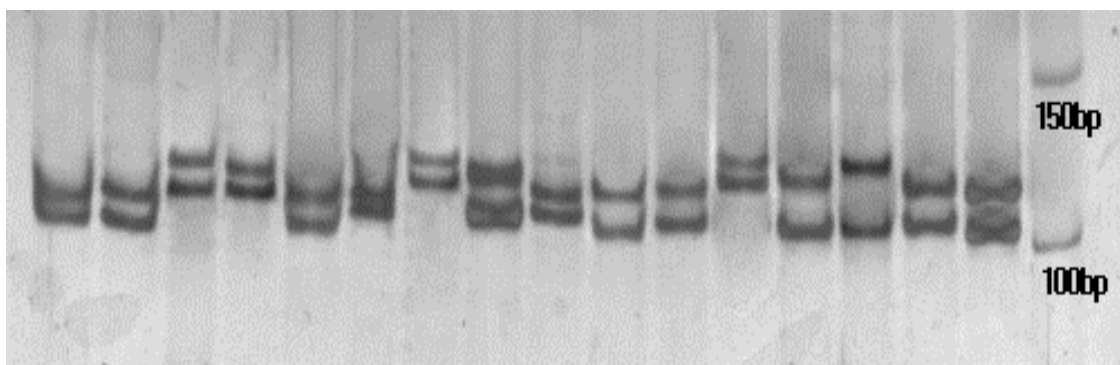
شکل ۳-۴- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA5,6 مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



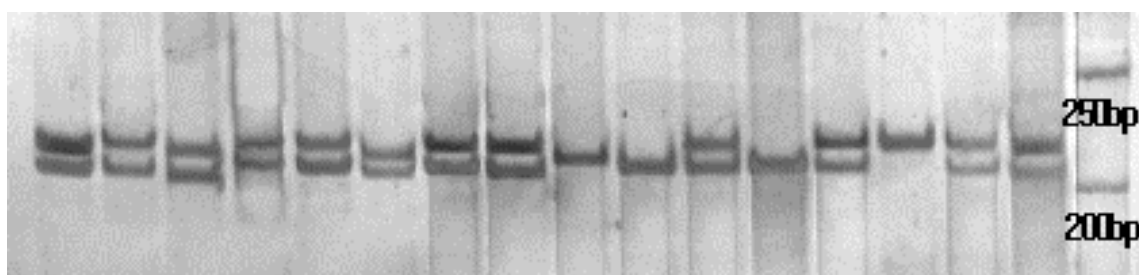
شکل ۳-۵- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر CA7,8 مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۶-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *LCO3* مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۷-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *LCO5* مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۸-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *MFW2* مربوط به نمونه های ماهی کلمه بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪

۱-۲-۴- آللهای واقعی و موثر

همانگونه که جدول ۳-۴ نشان می دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه CA3,4 مربوط به نمونه های مازندران، گیلان، گرگانرود و خلیج گرگان (۹ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاه CA7,8 (۴ آلل) می باشد. بیشترین تعداد آلل موثر (۷/۵۸ آلل) در جایگاه CA3,4 در نمونه های خلیج گرگان و کمترین مقدار آن در جایگاه MFW2 مربوط به نمونه های مازندران (۲/۷۸ آلل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل های واقعی (۶/۱۴) در نمونه های گیلان و کمترین آن (۵/۲۹) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین آلل موثر (۴/۸۷)

در نمونه های گلستان و کمترین آن (۴/۱۳) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۵/۷۵ \pm ۰/۳۰$ و $۴/۷۶ \pm ۰/۲۵$ بوده است.

جدول ۴-۳ تعداد الل واقعی (N_A) و موثر (N_E) جایگاه های بررسی شده در ماهی کلمه

خلیج گرگان		گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	
5/76	6/00	4/74	6/00	4/32	5/00	4/20	5/00	CA1,2
7/58	9/00	7/37	9/00	6/35	9/00	7/69	9/00	CA3,4
4/85	6/00	4/97	6/00	4/85	6/00	3/58	6/00	CA5,6
3/91	4/00	3/99	4/00	3/67	4/00	6/81	8/00	CA7,8
5/13	6/00	4/18	5/00	3/14	4/00	3/79	5/00	LC03
4/77	5/00	4/22	5/00	3/84	4/00	4/23	5/00	LOC5
4/77	5/00	4/62	5/00	2/78	5/00	3/29	5/00	MFW2
۵/۲۵	۵/۸۶	۴/۸۷	۵/۷۱	۴/۱۳	۵/۲۹	۴/۸۰	۶/۱۴	میانگین
۰/۴۴	۰/۵۹	۰/۴۴	۰/۶۱	۰/۴۵	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۶۳	SE

۲-۲-۴- تنوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۵-۳ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۷) در جایگاه CA3,4 در نمونه های گیلان و خلیج گرگان و کمترین آن در جایگاه MEF2 (۰/۴۴) در مازندران بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۲) در جایگاه CA3,4 در نمونه های خلیج گرگان و کمترین مقدار آن در جایگاه MFW2 مربوط به نمونه های مازندران (۰/۵۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۰) در بین نمونه های خلیج گرگان و کمترین آن (۰/۵۴) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۴) در نمونه های خلیج گرگان و کمترین آن (۰/۷۲) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۰/۵۸ \pm ۰/۱۸$ و $۰/۷۳ \pm ۰/۰۱$ بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار وجود دارد.

جدول ۵-۳ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد بررسی در ماهی کلمه

خلیج گرگان		گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	
۰/۷۹	0/۶۳	۰/۷۷	0/۵۹	۰/۷۸	0/۵۷	0/۷۵	0/۵6	CA1,2
۰/۸۲	0/۶۷	۰/۸۱	0/۶۶	۰/۸۰	0/۶۴	۰/۸۰	0/۶7	CA3,4
0/۷۵	0/۵۹	۰/۷۹	0/۶۰	۰/۷۹	0/۵۹	0/۷۳	0/۵2	CA5,6
۰/۷۵	0/۵۴	۰/۷۱	0/۵۵	۰/۷۵	0/۵۳	۰/۸۱	0/۶۵	CA7,8

جایگاه	گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
LC03	0/54	0/48	0/56	0/58
LOC5	0/56	0/54	0/78	0/73
MFW2	0/50	0/44	0/58	0/73
میانگین	0/57	0/54	0/57	0/74
SE	0/02	0/03	0/01	0/03

۳-۲-۴- تعادل هاردی- واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان در جایگاه LOC3 انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ ($P < 0/05$) را نشان دادند (جدول ۳-۶).

جدول ۳-۶ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید

منطقه	CA1,2	CA3,4	CA5,6	CA7,8	LOC3	LOC5	MFW2
گیلان	χ^2	۷۴/۴۱	۲۸۰/۰۰	۱۶۰/۰۰	۲۰۰/۰۰	۵۷/۳۳	۷۱/۵۰
	/Pro	0/00	0/00	0/00	0/00	0/00	0/00
	Sig,	***	***	***	***	***	***
مازندران	χ^2	۹۳/۶۳	۲۵۱/۷۸	۱۲۰/۰۰	۱۲۰/۰۰	۴۷/۵۰	۱۵/۸۴
	/Pro	0/001	0/00	0/00	0/00	0/00	0/001
	Sig,	***	***	***	***	***	***
گلستان	χ^2	۱۱۲/۰۰	۲۴۶/۸۳	۱۲۰/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳/۸۳	۸۹/۷۲
	/Pro	0/00	0/00	0/00	0/00	0/11	0/03
	Sig,	***	***	***	***	ns	*
خلیج گرگان	χ^2	۱۴۸/۸۰	۲۴۹/۵۱	۱۰۴/۲۰	۱۲۰/۰۰	۵۷/۰۲	۲۴/۶۸
	/Pro	0/00	0/00	0/00	0/00	0/00	0/02
	Sig,	***	***	***	***	***	*

ns=not significant, * P<0/05, ** P<0/01, *** P<0/001

۴-۲-۴- فاصله و شباهت ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۳-۷ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می شود بیشترین فاصله ژنتیکی (0/21) بین نمونه های خلیج گرگان و گیلان می باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (0/04) بین نمونه های گلستان و خلیج گرگان مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقا برعکس فاصله ژنتیکی می باشد.

جدول ۲-۳ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری ماهی کلمه (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشد)

گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	0/88	0/87	0/81
0/05	0/00		0/89
0/06	0/05	0/00	0/95
0/21	0/12	0/04	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می دهد که حداکثر آن (0/04) بین نمونه های گیلان با خلیج گرگان که دارای کمترین میزان جریان ژنی (9/6) است، مشاهده می شود. حداقل F_{ST} (0/001) بین نمونه های خلیج گرگان با گلستان که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (43/63) است، مشاهده شده است (جدول ۳-۸ و ۳-۹). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های گلستان با گیلان، گیلان با مازندران، گیلان با خلیج گرگان معنی دار بود ($P < 0/05$).

جدول ۳-۸ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی کلمه (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

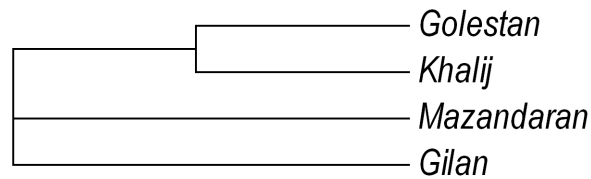
گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	0/01	0/01	0/01
0/028	0/00	0/08	0/05
0/026	0/006	0/00	0/37
0/039	0/025	0/001	0/00

جدول ۳-۸ میزان Nm محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی کلمه

گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	13/66	13/69	9/61
	0/00	28/84	13/68
		0/00	43/63
			0/00

علاوه بر آنالیزهای آماری انجام شده، نمودارهای شجره ای نمونه های ماهی سفید در ۴ منطقه مورد بررسی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش Neighbor-joining رسم شد (شکل ۳-۹). بر طبق دندروگرام فاصله ژنتیکی حاصل از تمام معیارهای بکار رفته نمونه های جمع آوری شده ماهی کلمه از مناطق مختلف، به سه شاخه تقسیم

شدند، شاخه اول نمونه های گلستان و خلیج گرگان، شاخه دوم شامل نمونه های مازندران و شاخه سوم نمونه های گیلان در آن جای گرفته است.



شکل ۹-۳ نمودار شجره ای نمونه های ماهی کلمه که بر اساس روش N.J. رسم شده است

۳-۴- بحث و نتیجه گیری

ارزیابی و کنترل اکولوژی اکوسیستمهای آبی، به نشانگرهای اکولوژیکی نیاز دارد که در طیفی از معیارهای جهانی و جغرافیایی قابل تفسیر باشد. تنوع ژنتیکی بعنوان شاخص شرایط اکوسیستم و قابلیت برداشت منابع آبی می باشد که روشهای ژنتیک جمعیت قابل بررسی می باشد (Zhou et al., 2004). شناسایی گونه‌ها، زیر گونه‌ها و جمعیت‌های آبریان از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره برداری مناسب موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها یا جمعیت‌های پر ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در تکثیر و پرورش این موجودات خواهد شد. هدف مدیریت شیلاتی، ماکزیمم برداشت پایدار از ذخایر ماهیان می باشد که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از ذخایر گونه‌ها و جمعیت‌ها می باشد. از جمله تکنیک‌های مولکولی رایج در تعیین تفاوت‌های نوکلئوتیدی، تشخیص جمعیت‌ها و پلی مورفیسم در بین جمعیت‌ها استفاده از ریزماهوره‌ها است. یک نشانگر ایده آل باید دارای جایگاههایی با تغییر پذیری بالا، قابلیت رتبه دهی و آلل‌های همباز بوده و به طور یکنواخت در سراسر ژنوم پخش شده باشد. ریزماهوره‌ها این خصوصیات را یک جا دارند و همین باعث شده تا در این مطالعه از این نشانگر استفاده شود. به علاوه سادگی تکنیک، هزینه نسبتاً کم، فراوانی و توزیع در سراسر ژنوم و چند شکلی بالا، از دیگر مزایای این نشانگر می باشد. در این مطالعه طبق جدول ۴-۳ از ۷ جفت پرایمر ریزماهوره ای استفاده شد که تمام آنها پلی مورف بودند. نتایج بدست آمده نشان داده که بیشترین تعداد آلل واقعی مربوط به نمونه های مازندران، گیلان، گرگانرود و خلیج گرگان (۹ آلل) و کمترین آن ۴ آلل بوده، ضمن اینکه حداکثر آلل موثر (۷/۵۸ آلل) در نمونه های خلیج گرگان و حداقل آن در مازندران (۲/۷۸ آلل) بوده است. علاوه بر این میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $5/75 \pm 0/30$ و $4/76 \pm 0/25$ بود. تعداد آللهای واقعی همان تعداد آللهای مشاهده شده برای یک جایگاه در یک جمعیت می باشد. از آنجاییکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه قرار می گیرد، مقایسه بین جمعیت‌هایی که تعداد نمونه‌های آنها متفاوت می باشد، باید با احتیاط صورت گیرد.

تعداد آللهای موثر برابر $\frac{1}{F}$ می باشد که F نسبت هموزیگوت ها بوده و به عبارتی نسبت هموزیگوت ها معادل عکس تعداد آللهای موثر برای یک لوکوس در یک جمعیت خواهد بود. چون آللهای فراوانی یکسانی ندارند، تعداد آلل موثر از تعداد آلل واقعی کمتر است.

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد. میکروستلایت‌ها شاخص حساسی در اندازه گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری‌های همخون هستند بنابر این برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب می‌باشند (Alarcon et al., 2004).

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۶۷-۰/۴۴ با میانگین ۰/۵۸ بود. همچنین دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۷۴-۰/۷۲ با میانگین ۰/۷۳ بود. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی جایگاه ها هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی در نمونه‌ها است. از علل اصلی آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس‌های زیست محیطی، تخریب زیستگاه‌های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می‌شود. در مطالعه ای که ریحانی (۱۳۸۹) با استفاده از ریزماهواره ها بر روی ماهی کلمه انجام داد، سطح بالایی از تنوع (۰/۷) را در در مناطق مختلف اندازه گیری نمودند. در این بررسی تعداد آللهای مشاهده شده و موثر به ترتیب ۷/۲۵ و ۴/۸۵ بود. Laloei و همکاران (2013) در مطالعه ای بر روی ماهی کپور معمولی دریای خزر میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار را بین ۰/۲۰ تا ۰/۹۲ محاسبه نموده و تعداد آلل موثر نیز ۱/۲۶ تا ۱۲/۲۵ بدست آمد. Cui و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تنوع ژنتیکی *T. pseudommus* و *T. rubripes* در سواحل چین با استفاده از ۹ لوکوس مایکروساتلایت توانستند سه جمعیت را از یکدیگر تفکیک نمایند. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی در این ۹ لوکوس ۰/۶۴۶ تا ۰/۹۴۷ بود، شاخص تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که کاهش معنی داری بین جمعیت‌های پرورشی در مقایسه با جمعیت‌های وحشی دیده می‌شود. دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر برای کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های پرورشی ذکر شده است.

در این مطالعه تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی، کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان در جایگاه LOC3 انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($P < 0/05$). Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هموزیگوس، آلل‌های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه‌ها می‌داند. Lucentini و همکاران در

سال ۲۰۰۶ علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را وجود جهش های محلی در پرایمرها که موجب نارسایی در تولیدات تکثیرشده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزایگوتها همانند هوموزایگوتها می شود اعلام کردند. علاوه بر این Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی اعلام نمودند. در بررسی حاضر در اکثر مناطقی که میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده پایین تر از هتروزایگوسیتی مورد انتظار بود عدم تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شد. چنین نتیجه ای می توند ناشی از روش رتبه دهی به باندهای فریب دهنده یا وجود آلل های نول باشد که هوموزایگوس ها را جایگزین هتروزایگوس ها می کند. در واقع وجود آلل های نول در ماهیان پدیده ای معمول است. وجود عدم تعادل همراه با هتروزایگوسیتی بالا نشان دهنده وجود ساختار زیر جمعیت در منطقه نمونه برداری می باشد. فقدان کامل انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در این مطالعه شاید به علت نمونه برداری در محدوده های زمانی متفاوت می باشد اما مهمترین دلیل وجود آلل های نول است که در بسیاری از مطالعات میکروستلایت گزارش می شود. همچنین رانش ژنتیکی، مخلوط شدن جمعیت ها، کافی نبودن نمونه ها، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری، آمیزش های خویشاوندی و وجود جهش های محلی در جایگاه های میکروستلایتی که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزایگوتها همانند هوموزایگوتها می شود را می توان از دلایل عدم تعادل هاردی-واینبرگ اعلام کرد.

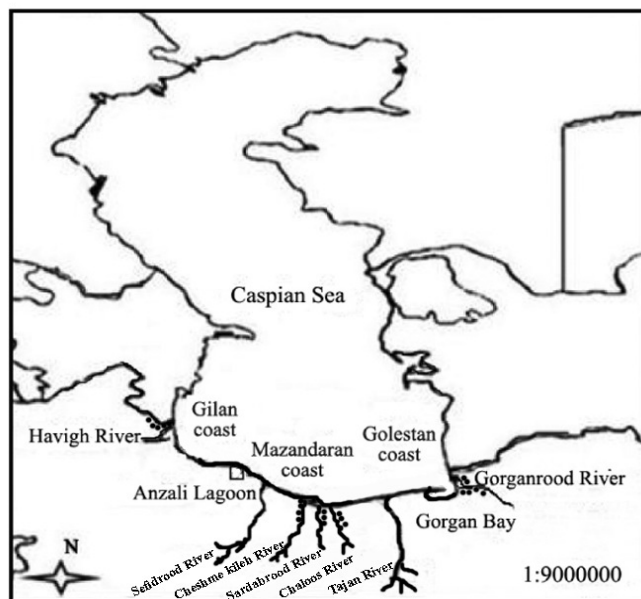
از دیگر شاخص هائی که در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد، شاخص F_{ST} می باشد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان داده که حداکثر آن (۰/۰۴) بین نمونه های گیلان با خلیج گرگان و حداقل F_{ST} (۰/۰۱) بین نمونه های خلیج گرگان با گلستان است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های گلستان با گیلان، گیلان با مازندران، گیلان با خلیج گرگان معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$). در مطالعه ای که ریحانی (۱۳۸۹) بر روی ماهی کلمه دریای خزر انجام دادند، مقدار F_{ST} بین ۰/۱۰ تا ۰/۳۰ بود. ضمن اینکه نتایج بدست آمده از F_{ST} اختلاف معنی داری بین نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان نشان نداد ولی اختلاف نمونه های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P < 0.01$). در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده می توان عنوان نمود که نمونه های ماهی کلمه دریای خزر مربوط به یک جمعیت نبوده و از گروه های ژنتیکی متفاوتی تشکیل شده است که در برنامه های مدیریت شیلاتی و تکثیر این ماهی باید مد نظر قرار گیرد.

۵- ماهی آزاد

۱-۵- روش کار

۱-۱-۵- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهی آزاد با استفاده از سد شیل و تورهای سالیک و دام از رودخانه های چالوس، سردآبرود، چشمه کیله، کرگانرود و آستارا (از هر رودخانه ۱۵ نمونه) در فصول پاییز و زمستان، جمع آوری گردید (شکل ۱-۴). تمامی نمونه ها پس از صید، باله دمی ماهی در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده است.



شکل ۱-۴: موقعیت محل های نمونه برداری از ماهی آزاد در حوضه جنوبی دریای خزر

۲-۱-۵- استخراج DNA

استخراج DNA مطابق روش ذکر شده در بند ۲-۱-۲ (فصل دوم) انجام شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد از روش تعیین توالی DNA استفاده شد. برای این منظور یک جفت پرایمر مربوط به ناحیه D-Loop میتوکندری ماهی آزاد مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱-۴).

جدول ۱-۴- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش توالی یابی ماهی آزاد (Atabeyoglu, 2007)

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

۳-۱-۵- واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از ۱۰μl بافر PCR (۱۰X)، dNTP با غلظت ۲۰۰μM، ۲ واحد آنزیم TaqDNA polymerase، MgCl₂ با غلظت ۲/۵mM، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به

۵۰µl برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته کردن ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها ۵۸ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه وبسط پرایمرها ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۴۵ ثانیه برای ۳۰ چرخه بوده است. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و مارکر ۵۰ pb مشاهده مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین توالی DNA، نمونه ها به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

۴-۱-۵- آنالیز آماری

برای آنالیز آماری، ابتدا توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) همتراز گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثر، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از مربع کای، مقدار FST، جریان ژنی و تنوع ژنتیکی با استفاده از تست AMOVA با سطح احتمال ۰/۰۱ و با نرم افزارهای Arlequin version 3.1 (Excoffier et al., 2005)، PowerMarker V3.0 Manual (Librado و Rozas, 2009) DnaSP version 5 محاسبه گردید. درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی بروش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA version 4 ترسیم شد (Tamura et al., 2007).

۲-۵- نتایج

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه های ماهی ازاد انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی آزاد از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشد. طول قطعه تکثیر شده در تمامی نمونه ها ۶۵۰ جفت باز بود. توالی قطعه D-loop نمونه های ماهی آزاد، با استفاده از برنامه BioEdit همتراز شدند. از مجموع ۶۵۰ جفت نوکلئوتید همتراز شده، بطور میانگین تعداد ۲۶۰ جایگاه متغیر در توالی های مختلف شناسائی شد. همچنین در بین نمونه های جمع آوری شده، ۴۵ هاپلوتیپ مشاهده گردید که بیشترین تعداد در رودخانه چالوس (۱۳ هاپلوتیپ) و کمترین هاپلوتیپ در رودخانه آستارا (۹ هاپلوتیپ) بود. در بین هاپلوتیپ های مشاهده شده، هاپلوتیپ شماره ۵ مشترک بین نمونه های رودخانه های چالوس و سردابرو، هاپلوتیپ ۱۵ مشترک بین رودخانه های سردابرو و آستارا، هاپلوتیپ های ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۲ مشترک بین رودخانه های تنکابن و سردابرو و هاپلوتیپ های ۴۱، ۴۳، ۴۴ و ۴۵ مشترک بین رودخانه های آستارا، سردابرو و سردابرو بود.

ترکیب نوکلئوتیدها در هر یک از مناطق نمونه برداری در جدول ۲-۴ نشان داده شده است. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی و میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در جدول ۳-۴ محاسبه شده است. طبق محاسبات انجام شده درصد ترکیب بازهای نوکلئوتیدی در مجموع نمونه‌ها برای A، T، C و G بترتیب ۰/۳۴، ۰/۲۹، ۰/۲۶ و ۰/۱۱ بوده است. همچنین نسبت جانشینی transition/transversion، برای بازهای پورین و پیریمیدین k1 برابر با ۰/۶۴ و k2 برابر ۰/۷۸ محاسبه شد. نرخ کل transition/transversion یا میزان (R) نیز برابر با ۰/۲۶ بود.

جدول ۲-۴ ترکیب نوکلئوتیدها (درصد) در مناطق مختلف نمونه برداری شده از ماهی آزاد

	G	A	T	C	
آستارا	۱۳/۰۵	۳۲/۷۸	۲۷/۹۷	۲۶/۱۹	
چالوس	۱۳/۴۲	۳۲/۸۸	۲۷/۴۸	۲۶/۲۳	
تنکابن	۱۳/۲۲	۳۲/۶۱	۲۸/۵۵	۲۵/۶۲	
کرگانرود	۱۳/۰۹	۳۲/۵۸	۲۸/۰۴	۲۶/۲۹	
سردابرو	۱۳/۵۷	۳۲/۵۵	۲۷/۶۵	۲۶/۲۳	

جدول ۳-۴ برآورد حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی در قطعه D-loop ماهی آزاد. (میزان احتمال transition بصورت رنگی و بقیه اعدادی که شامل احتمال جانشینی Transversion هستند به صورت ایتالیک مشخص شده اند.)

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	-	۱۰/۶۱	۹/۵۲	۷/۷۲
T	۱۲/۴۰	-	۷/۴۷	۴/۲۶
C	۱۲/۴۰	۸/۳۲	-	۴/۲۶
G	۷/۹۱	۱۰/۶۱	۹/۵۲	-

۱-۲-۵-نوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۴-۴ نشان می‌دهد، بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۷) مربوط به نمونه‌های چالوس بوده و کمترین آن در رودخانه تنکابن (۰/۶۲) بوده است. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰/۳۷) در نمونه‌های سردابرو و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه‌های کرگانرود (۰/۳۱) بوده است. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب ۰/۳۵±۰/۶۱ و ۰/۱۲±۰/۳۳ بوده است. بیشترین تنوع هاپلوتایپی (۰/۰۴±۰/۸۹) مربوط به رودخانه سردابرو بوده و کمترین آن در نمونه‌های آستارا مشاهده شده است (۰/۰۲±۰/۸۱). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۷±۰/۱۳ در رودخانه‌های سردابرو و چالوس و کمترین آن ۰/۰۶±۰/۱۱ در رودخانه تنکابن

مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در ماهی آزاد دریای خزر در سطح پائینی می باشد.

جدول ۴-۴- سطوح تنوع ژنتیکی نمونه های ماهی آزاد در مناطق مختلف (تنوع هاپلوتایپی $h \pm S.D$ و تنوع نوکلئوتیدی $\pi \pm S.D$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده H_0 ، هتروزیگوسیتی قابل انتظار H_E)

H_E	H_0	π	h	هاپلوتیپ	
0.32 ± 0.16	0.46 ± 0.11	0.12 ± 0.06	0.81 ± 0.02	۹	آستارا
0.32 ± 0.15	0.67 ± 0.09	0.13 ± 0.07	0.82 ± 0.01	۱۳	چالوس
0.32 ± 0.15	0.62 ± 0.08	0.11 ± 0.06	0.86 ± 0.03	۱۲	تنکابن
0.31 ± 0.15	0.66 ± 0.07	0.12 ± 0.05	0.87 ± 0.02	۱۰	کرگانرود
0.37 ± 0.14	0.65 ± 0.06	0.13 ± 0.07	0.89 ± 0.04	۱۱	سردابروود

۲-۲-۵- فاصله ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei 1972) محاسبه شده و در جدول ۵-۴ آمده است. همانطور که در جدول ملاحظه می شود بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۱۲ و کمترین آن ۰/۰۹ می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه های جمع آوری شده از مقدار کمی برخوردار می باشد. علاوه بر این فاصله ژنتیکی بین نمونه های هر یک از رودخانه ها بترتیب آستارا ۰/۱۰، چالوس ۰/۱۲، تنکابن ۰/۰۹، کرگانرود ۰/۱۰ و سردابروود ۰/۱۰ بود.

جدول ۵-۴ ماتریس فاصله ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری ماهی آزاد

آستارا	چالوس	تنکابن	کرگانرود	سردابروود	
0/00	0/11	0/10	0/09	0/10	آستارا
	0/00	0/11	0/12	0/11	چالوس
		0/00	0/11	0/10	تنکابن
			0/00	0/10	کرگانرود
				0/00	سردابروود

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد. نتایج بدست آمده از مقدار F_{ST} نشان می دهد که حداکثر آن (۰/۰۸) بین نمونه های چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود و حداقل F_{ST} (۰/۰۱) بین نمونه های کرگانرود با آستارا مشاهده شده است (جدول ۶-۴). براساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های آستارا با چالوس، آستارا با تنکابن، چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۶-۴ مقدار F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی آزاد (اعداد پائین ماتریکس مقدار F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

سردابروود	کرگانرود	تنکابن	چالوس	آستارا	
۰/۱	۰/۸	۰/۰۱	۰/۰۱	0/00	آستارا
۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۰۵	0/00	۰/۰۵	چالوس
۰/۰۶	۰/۰۱	0/00	۰/۰۳	۰/۰۵	تنکابن
۰/۰۱	0/00	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۱	کرگانرود
0/00	۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۳	سردابروود

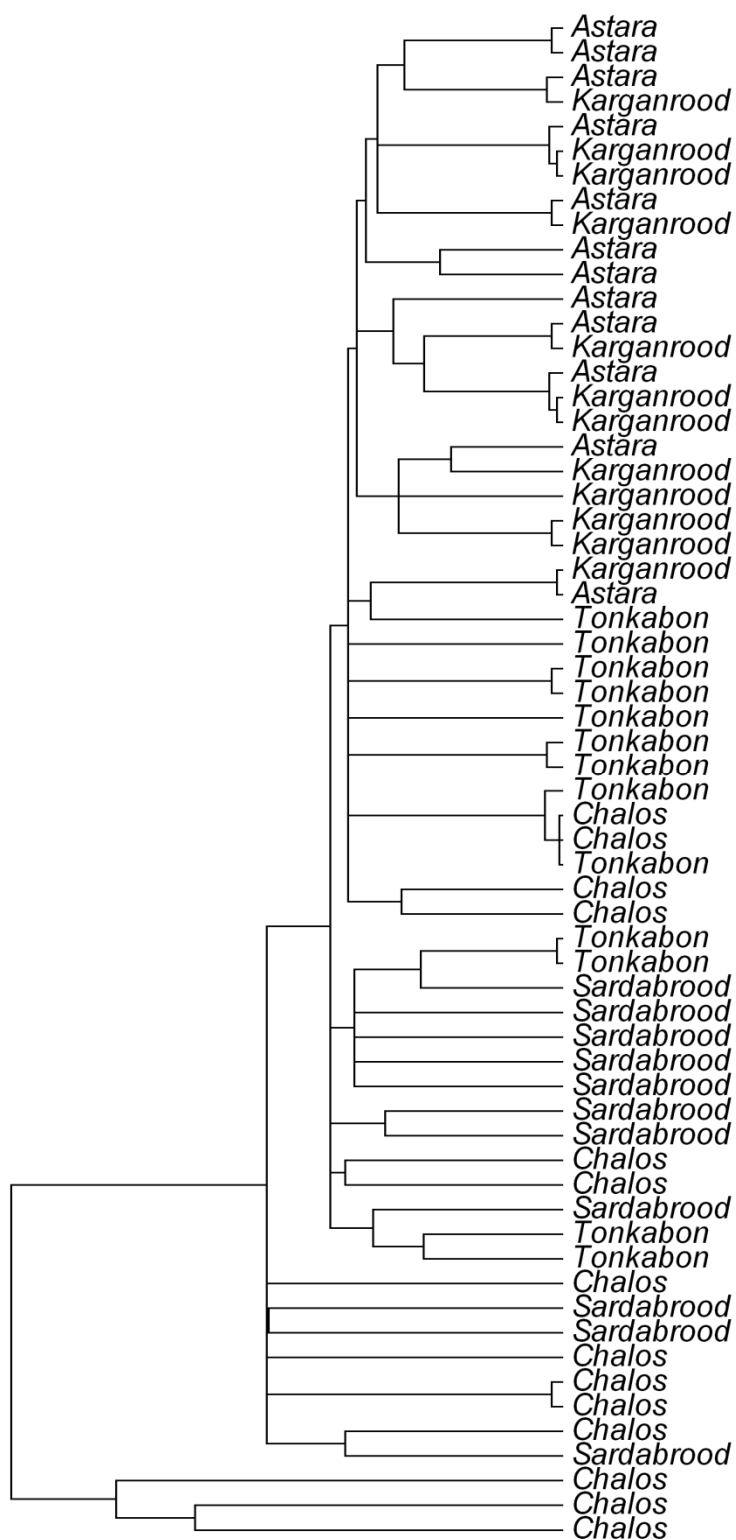
میانگین درجه خویشاوندی ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه با استفاده از آزمون Tajima محاسبه و مقدار $0/۲۹ \pm ۰/۰۵$ - بدست آمد. بر این اساس بیشترین درجه خویشاوندی (۰/۳۴) در رودخانه سردابروود و کمترین آن (۰/۴۲-) در رودخانه کرگانرود مشاهده شد (جدول ۷-۴). با توجه به نتایج بدست آمده اختلاف درجه خویشاوندی بین رودخانه های نمونه برداری شده، معنی دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۷-۴- درجه خویشاوندی ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه

آستارا	چالوس	تنکابن	کرگانرود	سردابروود	میانگین	انحراف معیار
-۰/۲۴	۰/۰۱	۰/۰۵	-۰/۴۲	۰/۳۴	-۰/۰۵	۰/۲۹

۳-۲-۵- رسم درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining

در روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی حاصله به دو شاخه ی اصلی تقسیم شد که هر یک مجدداً به شاخه های مختلف تقسیم شده اند. در یک شاخه که به سه خوشه تقسیم شده است فقط نمونه های رودخانه چالوس جدا از سایر نمونه ها قرار گرفتند که نشان دهنده ی وجود فاصله ی ژنتیکی بین آنها می باشد (شکل ۲-۴). سایر نمونه ها نیز در خوشه های مختلف قرار دارند. بطور کلی می توان نتیجه گیری کرد که توالی نوکلئوتیدی ماهیان آزاد دریای خزر به هم نزدیک می باشند.



شکل ۲-۴- نمودار شجره ای نمونه های ماهی آزاد دریای خزر که بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei,1972) و روش N.J. رسم شده است.

۳-۵- بحث و نتیجه گیری

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط جهان باعث شده تا محققین علوم شیلاتی جهت مدیریت ذخایر آبزیان قبل از هر اقدام عملی، به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه‌های با ارزش آن منطقه از طریق روشهای مولکولی روی آورند. این مطالعات در برنامه‌های بهره‌برداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبی پروری و برنامه‌های اصلاح نژاد دارای اهمیت زیادی می‌باشد. در سالهای اخیر، روند آسیب‌پذیری آبزیان دریای خزر به علت برداشت بی‌رویه، ورود آلودگی‌های گوناگون و ...، لزوم اجرای مطالعات بنیادی و کاربردی، جهت اطلاع از جمعیت یا جمعیت‌های احتمالی، طرح برنامه‌های حمایتی و حفاظتی مثل تکثیر و پرورش، مدیریت ذخایر و ارائه الگوی پایدار صید و برداشت را ضروری نموده و اهمیت این موضوع فقط به منظور بهره‌برداری از منابع شیلاتی نیست بلکه جهت حصول اطمینان از تنوع زیستی و حفظ عملکرد اکولوژیک اکوسیستم‌های دریایی نیز می‌باشد. تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط اتحادیه بین‌المللی حفاظت از گونه‌ها و طبیعت برای برنامه‌های حفاظت از ذخایر است (Lucentini et al., 2009). در صورتی که این استراتژی بر پایه‌ی روشهای دقیق و قوی مثل داده‌های مولکولی باشد، می‌تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره‌برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai et al., 2006). نخستین گام جهت حفاظت از ساختار ژنتیکی و تنوع زیستی جمعیت‌های در حال بهره‌برداری آبزیان، تدوین استراتژی مدیریت برداشت پایدار است.

در مطالعه حاضر ساختار ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش توالی‌یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۷) در رودخانه چالوس و کمترین آن در رودخانه تنکابن (۰/۶۲) بوده است. ضمن که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب 0.61 ± 0.35 و 0.33 ± 0.12 بود. علاوه بر این بیشترین تنوع هاپلوتایپی (0.89 ± 0.04) مربوط به رودخانه سرداب‌رود بوده و کمترین آن در نمونه‌های آستارا مشاهده شده است (0.81 ± 0.02) . علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی 0.13 ± 0.07 در رودخانه‌های سرداب‌رود و چالوس و کمترین آن 0.11 ± 0.06 در رودخانه تنکابن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در ماهی آزاد دریای خزر در سطح پائینی می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط نجار لشکری (۱۳۹۲) انجام گرفت، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سه رودخانه چالوس، سرداب‌رود و آستارا 0.03 ± 0.00 و بیشترین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (0.37 ± 0.14) در رودخانه سرداب‌رود و کمترین میانگین آن (0.31 ± 0.14) در رودخانه‌ی چالوس بدست آمد.

برای تعیین میزان اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن با اختلاف ژنتیکی کل در بین مناطق هر ناحیه از فاکتور FST استفاده می‌شود. حداکثر آن (۰/۰۸) بین نمونه‌های چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود و حداقل FST (۰/۰۱) بین نمونه‌های کرگانرود با آستارا مشاهده شده است. طبق نظریه Dorak (2005) تمایز ژنتیکی بین مناطق نمونه برداری ماهی آزاد در محدوده متوسط به بالا می‌باشد. FST بیشتر شامل

اندازه گیری تمایز در زیر جمعیتها است و بیشترین کاربرد را در آزمون واگرایی ژنتیکی در بین زیر جمعیتها دارد و مقدار آن همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود جمعیت و جدایی کامل جمعیتها) متغیر است. وجود اختلاف ژنتیکی درون و بین جمعیتها گونه های مختلف، تحت تأثیر عوامل مختلفی چون تاریخچه مشترک، جدایی جغرافیایی، جریان ژنی حال و گذشته و همینطور فرآیندهای مختص جمعیت، مانند رانش ژنتیکی و انتخاب انطباقی قرار دارد (Dorak, 2005; Li et al., 2007). Vera و همکاران (2011)، در مطالعه ی ساختار ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر (رودخانه های گرگانرود، ناورود، تنکابن و سردآبرود) که با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره انجام گرفت، میزان اختلاف ژنتیکی را ۰/۰۵ به دست آوردند. همچنین در بررسی که توسط نجار لشکری (۱۳۹۲) انجام گرفت، مقدار FST بین نمونه های ماهی آزاد رودخانه چالوس و سردآبرود (۰/۰۳)، چالوس و آستارا (۰/۰۶) و سردآبرود و آستارا (۰/۰۱) بود و میزان شاخص جریان ژنی نیز در رودخانه های مورد مطالعه (۲/۷۸) به دست آمد. به طور معمول مقدار FST زیر ۰/۰۵ مطرح می شود و محققین ممکن است ساختار بین زیر جمعیتها را ضعیف تفسیر کنند، در حالیکه این مطلب نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست. نکته دیگر اینکه میزان FST در اکثریت موارد به یک نمی رسد زیرا اثر پلی مورفیسم ناشی از جهش به طور موثری میزان FST را تغییر می دهد (Charlesworth, 1998; Hedrick, 1999).

میزان اختلاف های نوکلئوتیدی در هر توالی به صورت فاصله ی ژنتیکی تخمین زده می شود. بنابراین بسته به میزان تفاوت نوکلئوتیدها در هر توالی، اختلاف های درون گونه ای و بین گونه ای مشخص می شود. این عامل به طور مستقیم یا از طریق ارتباط با مهاجرت مؤثر، برآورد کننده ی تمایز ژنتیکی است. در مطالعه حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۱۲ بین رودخانه های گرگانرود و چالوس و کمترین آن ۰/۰۹ بین رودخانه سردآبرود و تنکابن می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه های جمع آوری شده از مقدار کمی برخوردار بوده است. بر اساس مطالعات نجار لشکری (۱۳۹۲) بیشترین فاصله ی ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی بین رودخانه های چالوس و آستارا و کمترین فاصله ی ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی بین رودخانه های سردآبرود و آستارا مشاهده شد. در مطالعات Vera و همکاران (2011)، که با استفاده از روش توالی یابی mtDNA انجام گرفته، میانگین فاصله ی ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر ۰/۲۲ ($P < 0.001$) محاسبه گردید که بر اساس نظریه Thorpe و همکاران (1994)، در محدوده ی گونه های هم جنس (۰/۰۳-۰/۶۱) قرار می گیرد و با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری کلی

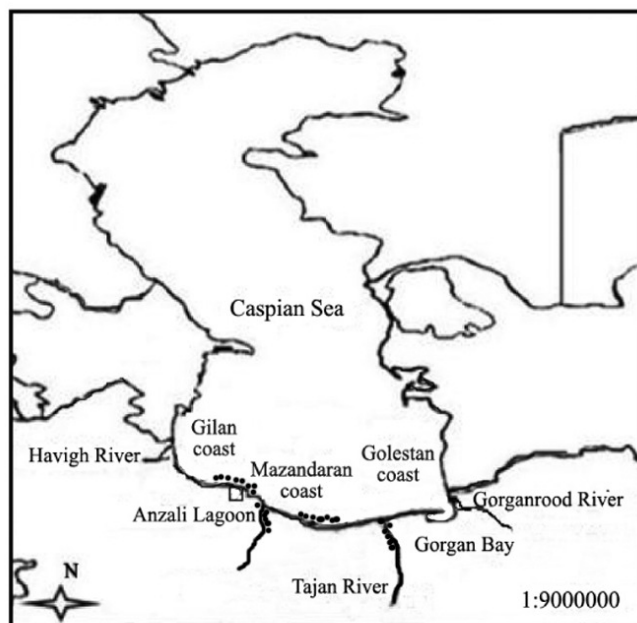
نتایج حاصل از مطالعه حاضر بر روی پنج رودخانه مهم شیلاتی در شمال کشور نشان داد که جمعیت یکسانی از ماهی آزاد در این رودخانه ها وجود نداشته و گروه های ژنتیکی متفاوتی زیست می نمایند. بر اساس نتایج بدست آمده سه گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه در رودخانه های مورد مطالعه تشخیص داده شد.

۶- سس ماهی

۶-۱- روش کار

۶-۱-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از سس ماهی با استفاده از دستگاه الکتروشوکرو دام از رودخانه های تجن و سفیدرود انجام و از هر رودخانه ۸ نمونه جمع آوری گردید. همچنین از طریق تورپره شرکت های تعاونی صیادی نیز ۳۰ نمونه از دریا (استان مازندران منطقه نوشهر و چالوس ۱۵ نمونه و استان گیلان منطقه انزلی ۱۵ نمونه) صید شد (شکل ۱-۵). تمامی نمونه ها پس از صید، باله دمی ماهی در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده است.



شکل ۱-۵- موقعیت محل های نمونه برداری از سس ماهی در حوزه جنوبی دریای خزر

۶-۱-۲- استخراج DNA

استخراج DNA مطابق روش ذکر شده در بند ۲-۱-۲ (فصل دوم) انجام شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی سس ماهی از روش تعیین توالی DNA استفاده شد. برای این منظور یک جفت پرایمر مربوط به منطقه D-Loop میتوکندری ماهی کپور مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱-۵).

جدول ۱-۵- توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش توالی یابی برای سس (Chang et al., 2001)

جایگاه	توالی آغازگر
Primer Forward	5- GGA GGT AGC ACT CCC TTT AT -3
Primer Reverse	5- ATT CCT TGG GGG TGT GGC TT -3

۳-۱-۶- واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از $10 \mu\text{l}$ بافر PCR ($10\times$)، dNTP با غلظت $200 \mu\text{M}$ ، 2 واحد آنزیم TaqDNA polymerase، 50 تا 100 ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به $50 \mu\text{l}$ برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته شدن 94 درجه سانتیگراد بمدت 1 دقیقه، الحاق پرایمرها 54 درجه سانتیگراد بمدت 30 ثانیه و بسط پرایمرها 72 درجه سانتیگراد بمدت 1 دقیقه برای 30 چرخه بوده است. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر 50 pb و الکتروفورز ژل آگارز 1 درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم برماید مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین توالی DNA، نمونه‌ها به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

۴-۱-۶- آنالیز آماری

برای آنالیز آماری، ابتدا توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) همتراز گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثر، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس (Nei 1972) تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از مربع کای، مقدار FST، جریان ژنی و تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی برای 4 منطقه نمونه برداری شده بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال $0/01$ با نرم افزارهای تخصصی Arlequin version 3.1 (Excoffier et al., 2005) و DnaSP version 5 (Librado and Rozas, 2009) محاسبه گردید. درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA4 (Tamura et al., 2007) ترسیم شد.

۲-۶- نتایج

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه‌های ماهی سفید انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز 1% و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سس از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. طول قطعه تکثیر شده در تمامی نمونه‌ها 800 جفت باز بود. توالی قطعه D-loop نمونه‌های سس ماهی، با استفاده از برنامه BioEdit همتراز شدند. از مجموع 800 جفت نوکلئوتید همتراز شده، 24 جایگاه متغیر در توالی‌های مختلف مشاهده گردید. در بین نمونه‌های جمع آوری شده، 12 هاپلوتیپ مشاهده گردید که بیشترین تعداد در منطقه گیلان (8 هاپلوتیپ) بوده است. جدول $2-5$ فراوانی هاپلوتیپ‌ها را در مناطق مختلف نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود، هاپلوتیپ‌های D، E و F مختص منطقه گیلان،

هاپلوتیپ J و K مختص نمونه های سفیدرود و هاپلوتیپ L مربوط به رودخانه تجن می باشد. در نمونه های مازندران هاپلوتیپ اختصاصی مشاهده نگردید.

۲-۵- فراوانی نسبی هاپلوتیپ های مشاهده شده در مناطق نمونه برداری شده سس ماهی

ردیف	هاپلوتیپ	گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
۱	A	۰/۲۳	۰/۳۱	۰	۰
۲	B	۰/۲۳	۰	۰/۲۰	۰
۳	C	۰/۰۸	۰	۰/۲۰	۰
۴	D	۰/۰۸	۰	۰	۰
۵	E	۰/۰۸	۰	۰	۰
۶	F	۰/۰۸	۰	۰	۰
۷	G	۰/۱۵	۰/۴۶	۰	۰/۴۰
۸	H	۰/۰۸	۰/۰۸	۰	۰
۹	I	۰	۰/۰۸	۰	۰
۱۰	J	۰	۰	۰/۴۰	۰
۱۱	K	۰	۰	۰/۲۰	۰
۱۲	L	۰	۰	۰	۰/۲۰

ترکیب نوکلئوتیدها در هر یک از مناطق نمونه برداری در جدول ۳-۵ مشاهده میگردد. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی و میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در جدول ۴-۵ محاسبه شده است. طبق محاسبات انجام شده درصد ترکیب بازهای نوکلئوتیدی در مجموع نمونه ها برای A، T، C و G بترتیب ۰/۳۱، ۰/۲۶، ۰/۲۹ و ۰/۱۴ بوده است.

جدول ۳-۵- ترکیب نوکلئوتیدها (درصد) در مناطق مختلف نمونه برداری شده از سس ماهی

	G	A	T	C	
۱۳/۵۸	۳۰/۸۵	۲۶/۳۹	۲۹/۱۸	گیلان	
۱۳/۴۹	۳۰/۹۱	۲۶/۳۴	۲۹/۲۶	مازندران	
۱۳/۶۶	۳۱/۰۰	۲۶/۲۵	۲۹/۱۰	سفیدرود	
۱۳/۴۹	۳۰/۹۷	۲۶/۲۷	۲۹/۲۶	تجن	

جدول ۴-۵- برآورد حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی در قطعه D-loop سس ماهی. میزان احتمال جانشینی انتقالی با خانه های رنگی و بقیه اعدادی که شامل احتمال جانشینی Transversion هستند به صورت ایتالیک مشخص شده اند.

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	-	۱۳/۱۷	۱۴/۶۰	۰
T	۱۵/۴۵	-	۰	۶/۷۷
C	۱۵/۴۵	۰	-	۶/۷۷
G	۰	۱۳/۱۷	۱۴/۶۰	-

۱-۲-۶-تنوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۵-۵ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۰۰۵) مربوط به نمونه های سفیدرود بوده و کمترین آن در رودخانه تجن (۰/۰۰۱) بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۵۷) در نمونه های سفیدرود و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه های گیلان (۰/۲۷) بوده است. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.003 ± 0.035 و 0.42 ± 0.125 بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در تمامی مناطق نمونه برداری افزایش هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر H_E نسبت به H_O وجود دارد که بیانگر افت شدید تنوع ژنتیکی در سس ماهی دریای خزر می باشد. بیشترین تنوع هاپلوتایپی (0.910 ± 0.021) مربوط به منطقه گیلان بوده و کمترین آن در نمونه های مازندران مشاهده شده است (0.730 ± 0.014). نتایج نشان دادند که تنوع هاپلوتایپی نمونه های رودخانه سفید رود با سایر نمونه ها از نظر آماری اختلاف معنی داری دارد ($P < 0.05$). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی 0.003 ± 0.005 در سفیدرود و کمترین آن 0.001 ± 0.001 در تجن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در سس ماهی دریای خزر در سطح پائینی می باشد.

جدول ۵-۵- سطوح تنوع ژنتیکی نمونه های سس ماهی در مناطق مختلف (تنوع هاپلوتایپی $h \pm S.D$ و تنوع

نوکلئوتیدی $\pi \pm S.D$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده H_O ، هتروزیگوسیتی قابل انتظار H_E)

هاپلوتایپ	h	π	H_O	H_E
گیلان	۸	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.910 ± 0.021
مازندران	۵	0.002 ± 0.002	0.002 ± 0.001	0.730 ± 0.014
سفیدرود	۴	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.900 ± 0.012
تجن	۳	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.810 ± 0.011

۲-۲-۶-فاصله ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei 1972) محاسبه شده و در جدول ۶-۵ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۰۴ و کمترین آن ۰/۰۰۲ می‌باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مقدار کم برخوردار می‌باشد.

جدول ۶-۵ ماتریس فاصله ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری سس ماهی

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
0/00	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳
	0/00	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲
		0/00	۰/۰۰۳
			0/00

به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می‌گردد. نتایج بدست آمده از مقدار F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۳۱) بین نمونه‌های سفیدرود و تجن و حداقل F_{ST} (۰/۰۴) بین نمونه‌های مازندران و تجن مشاهده شده است (جدول ۷-۵). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های تجن با گیلان، مازندران با سفیدرود معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۷-۵ مقدار F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری سس ماهی (اعداد پائین ماتریکس

مقدار F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالامقادیر احتمال با ۹۹ بار تکرار)

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
0/00	۰/۱۳	۰/۰۶	۰/۰۴
۰/۰۵	0/00	۰/۰۱	۰/۳۵
۰/۱۸	۰/۲۸	0/00	۰/۰۳
۰/۲۲	۰/۰۴	۰/۳۱	0/00

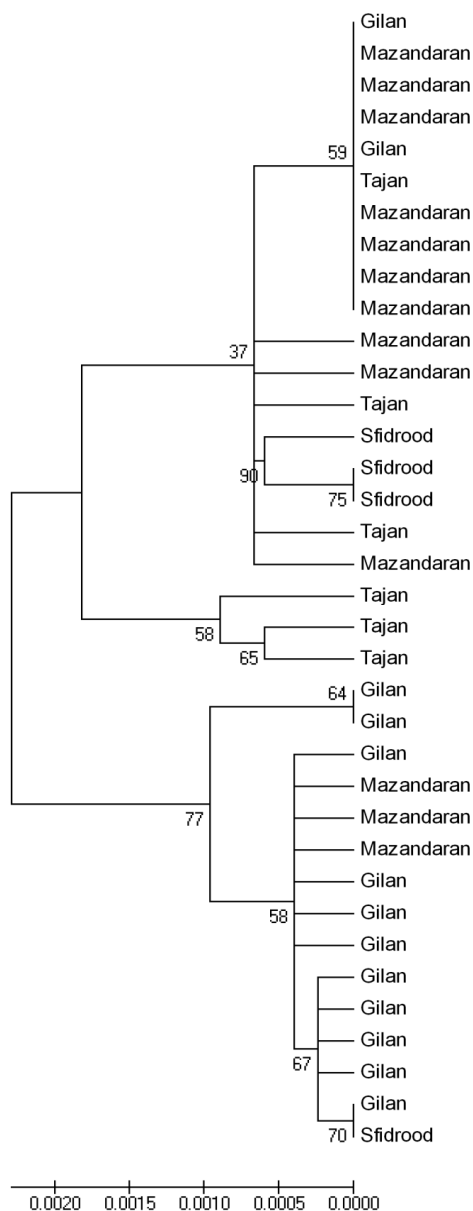
میانگین درجه خویشاوندی سس ماهی دریای خزر در رودخانه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون Tajima محاسبه و مقدار $۰/۶۹ \pm ۰/۳۶$ بدست آمد. بر این اساس بیشترین درجه خویشاوندی (۱/۳۳) در رودخانه سفیدرود و کمترین آن (۰/۳۲-) در منطقه گیلان مشاهده شد (جدول ۸-۵). با توجه به نتایج بدست آمده اختلاف درجه خویشاوندی بین رودخانه‌های نمونه برداری شده، معنی دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۸-۵ درجه خویشاوندی سس ماهی دریای خزر در رودخانه‌های مورد مطالعه

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن	میانگین	انحراف معیار
-۰/۳۲	۰/۱۸	۱/۳۳	۰/۲۴	۰/۳۶	۰/۶۹

۳-۲-۶- رسم درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining

در روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی حاصل به دو شاخه اصلی تقسیم شد هر یک به شاخه های مختلف تقسیم شده اند. در یک شاخه بیشتر نمونه های گیلان و تعداد کمی از نمونه های مازندران قرار گرفته و در شاخه دیگر سایر نمونه های منطقه مازندران و رودخانه های تجن و سفیدرود قرار گرفته است. عدم تفکیک کامل نمونه ها از یکدیگر نشانه وجود فاصله ژنتیکی کم بین آنها می باشد (شکل ۲-۵). بطور کلی می توان نتیجه گیری کرد که توالی نوکلئوتیدی ماهیان آزاد دریای خزر به هم نزدیک می باشند.



شکل ۲-۵- نمودار شجره ای نمونه های سس ماهی دریای خزر که بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) و روش N.J. رسم شده است.

۳-۶- بحث و نتیجه گیری

سس ماهی دیگر ماهی نادر و با ارزش دریای خزر است که هم اکنون به دلیل کاهش جمعیت آن در دریا اهمیت شیلاتی آن از بین رفته است ولی از لحاظ حفظ ذخایر ژنتیکی نیاز به برنامه ریزی و حمایت دارد. نمودار صید سس ماهی در دریای خزر بسیار ناهموار و تغییرات زیادی را نشان می دهد. این ماهی در یک دهه بین ۱۳۰۰ تا ۱۳۱۰ میزان بسیار کمی از این ماهی را پره صیادان صید پره نشان داده است. به یکباره و به دلایل نامشخص در طی ۵ سال پس از آن صید آن افزایش چشمگیری داشته و در سال ۱۳۱۱ بیش از ۲۵ تن رسید. پس از آن دوره، رکود صید این ماهی فرا رسید و تا سال ۱۳۱۹ مجدداً ماهی قابل ملاحظه ای صید نگردید. از این سال به بعد با افزایش و کاهش صید مواجه بوده بطوریکه میزان صید عمدتاً در حدود ۱۵ - ۱۰ تن و در سالهای ۱۳۴۵ و ۱۳۴۸ به بیش از ۵۰ تن نیز رسید و در سال ۱۳۷۹ میزان آن مجدداً به کمترین میزان خود رسید. در حال حاضر ذخایر این ماهی به شدت کاهش یافته، بطوری که بسختی می توان آن را مشاهده نمود.

در مطالعه حاضر ساختار ژنتیکی سس ماهی خزر با استفاده از روش توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در رودخانه سفیدرود و کمترین آن در استان گیلان بوده است. ضمن اینکه میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.03 ± 0.035 و 0.42 ± 0.12 بود. علاوه بر این بیشترین تنوع هاپلوتایپی مربوط به منطقه گیلان بوده و کمترین آن در نمونه های منطقه مازندران مشاهده شده است. همچنین بیشترین تنوع نوکلئوتیدی در نمونه های سفیدرود و کمترین آن در رودخانه تجن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در سس ماهی در سطح پائینی می باشد.

برای تعیین میزان اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن با اختلاف ژنتیکی کل در بین مناطق هر ناحیه از فاکتور FST استفاده می شود. در این بررسی حداکثر مقدار FST (0.04) بین نمونه های رودخانه تجن با سفیدرود و حداقل آن بین نمونه های تجن با مازندران مشاهده شده است. طبق نظریه Dorak (2005) تمایز ژنتیکی بین مناطق نمونه برداری ماهی آزاد در محدوده متوسط به بالا می باشد.

میزان اختلاف های نوکلئوتیدی در هر توالی به صورت فاصله ی ژنتیکی تخمین زده می شود. بنابراین بسته به میزان تفاوت نوکلئوتیدها در هر توالی، اختلاف های درون گونه ای و بین گونه ای مشخص می شود. این عامل به طور مستقیم یا از طریق ارتباط با مهاجرت مؤثر، برآورد کننده ی تمایز ژنتیکی است. در مطالعه حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و نمونه های منطقه مازندران و کمترین آن بین نمونه های منطقه مازندران و رودخانه تجن می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه های جمع آوری شده از مقدار کمی برخوردار بوده است.

Berrebi و Kotlik (۲۰۰۲) روابط فیلوژنی ماهی *Barbus Potenyi* با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم b در نواحی از رودخانه دانوب را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ۱۷ هاپلوتیپ متفاوت در ۳ منطقه از رودخانه شناسایی شد. تنوع هاپلوتیپی بین ۰/۱۵ تا ۰/۷۵ و تنوع نوکلئیدی بین ۰/۰۰۳ تا ۰/۰۱۱۶ متغیر بود.

Markova و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی *Barbus Prespensis* و *B. rebeli* را با استفاده از توالی نوکلئیدی mt DNA در نواحی از آلبانیا و یونان مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق تنوع هاپلوتیپی بین ۰/۷۴۳ تا ۰/۹۶۱ و تنوع نوکلئیدی بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۵۲ محاسبه گردید. ضمن اینکه تعداد ۱۲ هاپلوتیپ نیز مشاهده گردید.

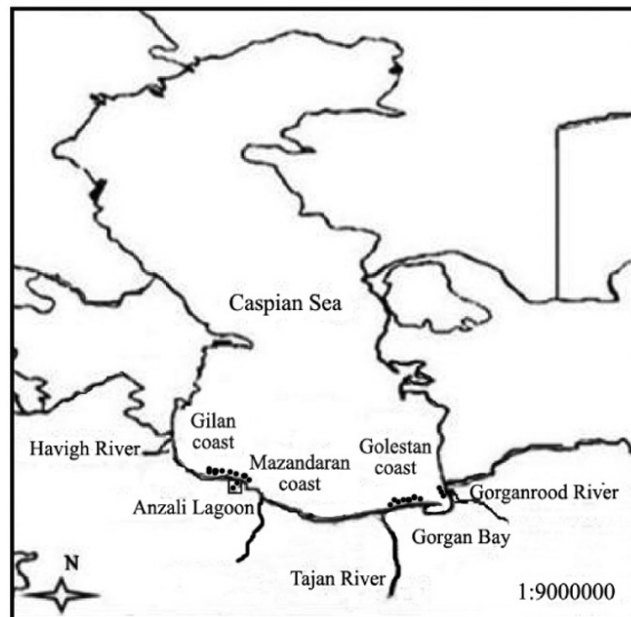
Berrebi و Kotlik (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی *Barbus petenyi* را با استفاده از توالی یابی DNA میتوکندری در نواحی شرقی و جنوبی اروپا مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی تعداد ۲۰ هاپلوتیپ شناسایی گردید. تنوع هاپلوتیپی بین ۰/۱۵ تا ۰/۷۵ و تنوع نوکلئیدی بین ۰/۰۰۳ تا ۰/۰۱۱۶ بدست آمد. ضمن اینکه حداکثر اختلاف بین نوکلئیدی ۳/۵ درصد بود.

۷- ماهی سوف

۷-۱- روش کار

۷-۱-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از ماهی سوف با استفاده از تور پره (دریا) از نواحی غربی (سواحل استان گیلان)، میانی (سواحل استان مازندران) و شرقی (سواحل استان گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری گردیده است. تعداد کل نمونه ها ۹۰ عدد بوده که از هر منطقه ۳۰ نمونه جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها پس از صید، باله دمی ماهی در الکل مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده است. شکل ۱-۶ محل های نمونه برداری را نشان میدهد.



شکل ۱-۶: موقعیت محل های نمونه برداری از ماهی سوف در حوضه جنوبی دریای خزر

۷-۱-۲- استخراج DNA

استخراج DNA مطابق روش ذکر شده در بند ۲-۱-۲ (فصل دوم) انجام شد. برای انجام واکنش PCR ابتدا نیاز به طراحی پرایمر می باشد. در این بررسی از ۷ جفت پرایمر مربوط به جایگاه های مختلف ریزماهواره استفاده شد (جدول ۱-۶).

جدول ۱-۶: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده از جایگاههای مختلف ریزماهواریه برای ماهی سوف

(Leclerc et al., 2000)

Locus	Primer sequence	Size range (bp)	Annealing temp. (°C)	Accession no.
<i>PflaL1</i>	F: AGCAGCCTGATTATATATC R: AGACAATTAACATGCAAC	50	112-132	AF211826
<i>PflaL3</i>	F: GCCGAATGTGATTGAATG R: CGCTAAAGCCAACCTAATG	53	240-285	AF211828
<i>PflaL5</i>	F: TGAGAGCCCATGAATTAC R: GCAAACACAGCCAATTTAG	53	140-172	AF211830
<i>PflaL6</i>	F: GCATACATATAAGTAGAGCC R: CAGGGTCTTCACTATACTGG	52	132-152	AF211831
<i>PflaL7</i>	F: TGTTCTGGTGAGCATTTG R: ACTGGGTTTCCTTCATTAC	53	204-272	AF211832
<i>PflaL8</i>	F: GCCTTATTGTGTGACTTATCG R: GGATCTTTCACCTTTTCTTTTCAG	53	204-288	AF211833
<i>PflaL9</i>	F: GTTAGTGTGAAAGAAGCATCTGC R: TGGGAAATGTGGTCAGCGGC	53	164-200	AF211834

۳-۱-۷- واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از ۵ μl بافر PCR (10X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ μM، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl₂ با غلظت ۲/۵ mM، ۵۰ تا ۱۰۰ ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه‌ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۰ μl برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب: واسرشته کردن ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمر ۵۰ تا ۵۳ درجه سانتیگراد در جایگاه های مختلف بمدت ۳۰ ثانیه و بسط پرایمر ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه بود. کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰ pb و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۱-۷- آنالیز آماری

فراوانی آلی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آللهای واقعی و تعداد آللهای موثر در جایگاه های میکروستلایتی، شاخص شانون، ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس Nei (1972)، تعادل هاردی- واینبرگ بر اساس H_e ، مقدار FST، جریان ژنی، تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۴ منطقه و ۳ گروه یا ناحیه (شامل ناحیه گیلان، مازندران و گلستان) بر اساس تست AMOVA در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم افزار Gene Alex version 6 محاسبه گردید. (Peakall and Smouse, 2005). درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA version 4 ترسیم گردید (Tamura et al., 2007).

۲-۷- نتایج

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه‌های ماهی سوف انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سوف از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. همچنین تمامی ۷ جایگاه ریزماهوره بررسی شده در ماهی سوف، پلی‌مورف بوده که جزئیات آن در جدول ۲-۶ و شکل‌های ۲-۶ الی ۸-۶ آورده شده است. همانگونه که جدول نشان می‌دهد بیشترین تعداد ال در جایگاه PflaL1 و کمترین آلل در جایگاه‌های PflaL7 و PflaL8 می‌باشد. همچنین جدول ۳-۶ فراوانی هر یک از آللها را در مناطق مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۲-۶ خصوصیات و نتایج بدست آمده از بررسی جایگاههای ریزماهوره در ماهی سوف (Boutin-Ganache et al. 2001)

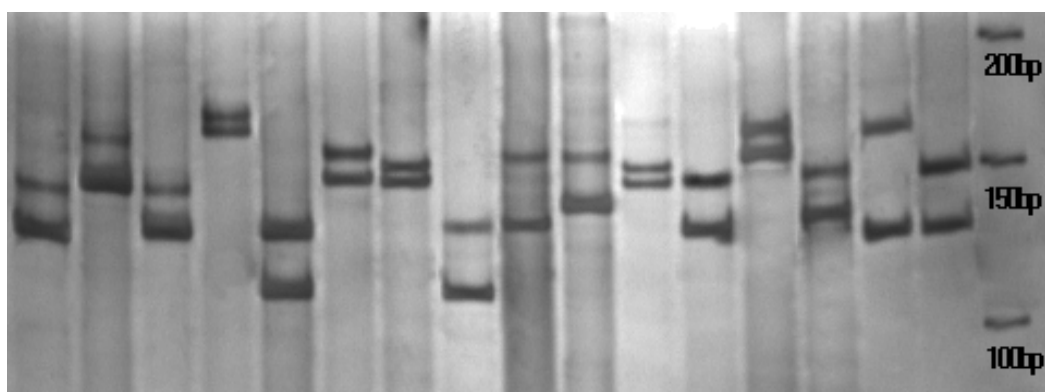
جایگاه	دمای اتصال °C	تعداد چرخه	محداده آللی (pb)	تعداد آلل
<i>PflaL1</i>	۵۰	۳۰	۱۱۲-۱۶۴	۱۱
<i>PflaL3</i>	۵۳	۳۰	۱۳۵-۱۷۱	۸
<i>PflaL5</i>	۵۳	۳۰	۱۳۵-۱۵۵	۶
<i>PflaL6</i>	۵۲	۳۰	۱۴۰-۲۴۸	۷
<i>PflaL7</i>	۵۳	۳۰	۱۶۱-۱۷۳	۴
<i>PflaL8</i>	۵۳	۳۰	۱۳۸-۱۵۰	۴
<i>PflaL9</i>	۵۳	۳۰	۲۳۲-۲۷۲	۱۰

جدول ۳-۶ فراوانی آللها در جایگاه‌ها و مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سوف

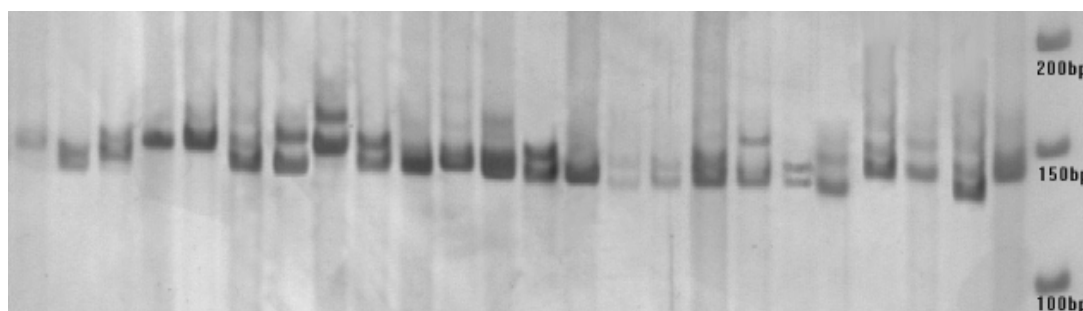
جایگاه	آلل	گیلان	مازندران	گلستان
<i>PflaL1</i>	112	0/03	0/05	0/00
	128	0/1۲	0/00	0/1
	132	0/13	0/0۲	0/18
	136	0/2۲	0/25	0/2
	140	0/1۷	0/25	0/13
	144	0/1۷	0/1۷	0/15
	148	0/1۲	0/18	0/13
	152	0/03	0/08	0/00
	156	0/00	0/00	0/01۷

گلستان	مازندران	گیلان	آل	جایگاه
0/03	0.00	0/01۷	160	<i>PflaL1</i>
0/05	0.00	0.00	164	
0/0۷	0/08	0/1	۱۳۶	<i>PflaL3</i>
0/05	0/03	0/13	۱۴۰	
0/5۲	0/3۲	0/3۷	۱۴۴	
0/1	0/15	0/1۲	۱۴۸	
0/0۷	0/3	0/08	۱۵۲	
0/1	0/0۷	0/05	۱۵۶	
0/05	0/03	0/0۷	۱۶۰	
0/05	0/0۲	0/08	۱۷۲	
0/25	0/2۲	0/33	۱۳۶	
0/18	0/35	0/23	۱۴۰	
0/2	0/23	0/2	۱۴۴	
0/1	0/13	0/1۲	۱۴۸	
0/2	0/03	0/1	۱۵۲	
0/0۷	0/03	0/0۲	۱۵۶	
0/6	0/7	0/55	۱۴۰	<i>PflaL6</i>
0/03	0/0۲	0/03	۱۴۴	
0/1	0/15	0/0۲	۱۵۲	
0/15	0/0۷	0/1	۱۵۶	
0/1	0.000	0/2۷	۱۶۴	
0.000	0/0۷	0/03	۱۷۲	
0/0۲	0.00	0.00	۲۴۸	
0/3۷	0/2۷	0/43	۱۶۰	
0/0۲	0/05	0.00	۱۶۴	
0/15	0/03	0/1۷	۱۶۸	
0/4۷	0/65	0/4	۱۷۲	<i>PflaL8</i>
0/2	0/32	0/23	۱۴۰	
0/25	0/18	0/13	۱۴۴	
0/5	0/5	0/63	۱۴۸	
0/05	0.00	0.00	۱۵۲	
0.00	0/0۷	0.00	232	
0/05	0/03	0/0۲	250	
0/15	0.00	0/2	252	

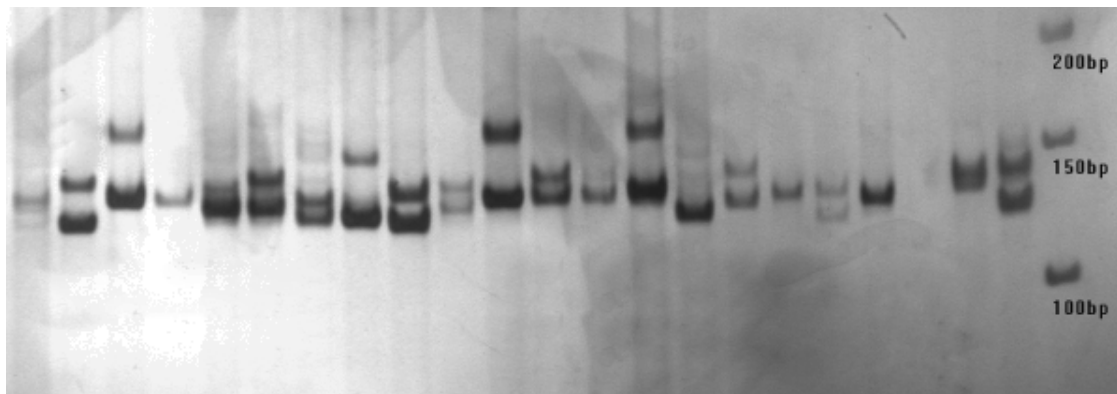
گلستان	مازندران	گیلان	آل	جایگاه
0/15	0/25	0/43	254	<i>PflaL9</i>
0/25	0/3۷	0/0۷	256	
0/0۲	0/05	0.00	258	
0/03	0.00	0/05	260	
0/15	0/05	0/0۸	262	
0/1	0/1۷	0/15	264	
0/1	0/0۲	0.00	272	



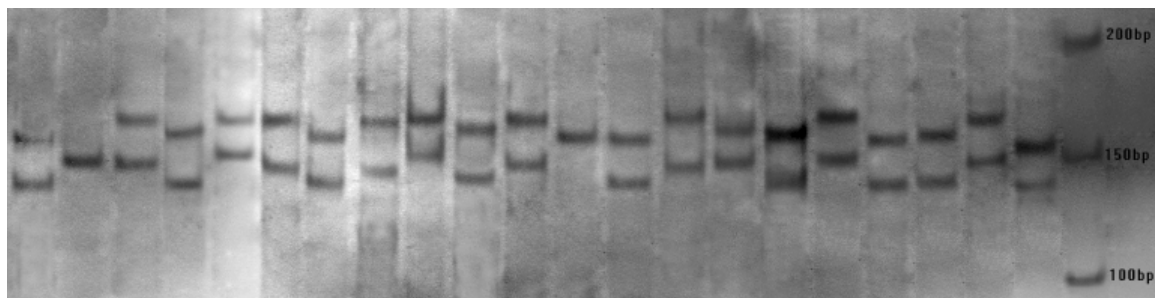
شکل ۲-۶- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *PflatL1* مربوط به نمونه های ماهی سوف بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



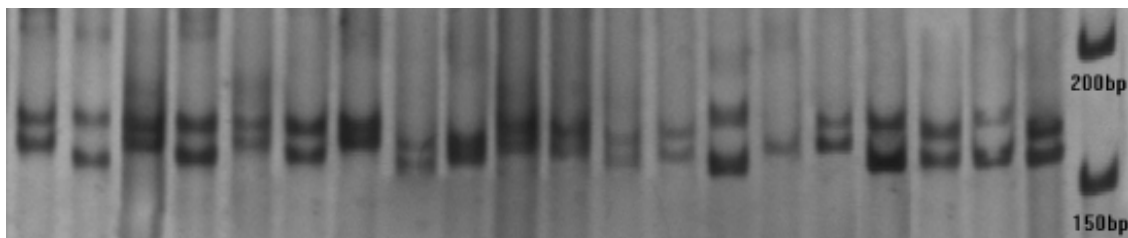
شکل ۳-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *PflatL3* مربوط به نمونه های ماهی سوف بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۴-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *PflatL5* مربوط به نمونه های ماهی سوف بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۵-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *PflatL6* مربوط به نمونه های ماهی سوف بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪



شکل ۶-۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA با استفاده از پرایمر *PflatL8* مربوط به نمونه های ماهی سوف بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪

۱-۲-۷- آللهای واقعی و موثر

همانگونه که جدول ۴-۶ نشان می دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه *PflaL3* و *PflaL9* مربوط به نمونه های مازندران و گلستان (۹ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاه *PflaL8* (۳ آلل) می باشد. بیشترین تعداد الل موثر ۶/۸۷ آلل در جایگاه *PflaL1* در نمونه های گلستان و کمترین مقدار آن در جایگاه *PflaL7* مربوط به نمونه های مازندران (۰/۹۶ آلل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل های واقعی (۶/۵۷) در نمونه های گلستان و کمترین آن (۵/۸۶) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین میانگین آلل موثر (۴/۲۷) در نمونه

های گلستان و کمترین آن (۳/۴۸) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $۶/۱۴ \pm ۰/۴۵$ و $۳/۸۸ \pm ۰/۳۴$ بوده است.

جدول ۴-۶ تعداد آلل واقعی (N_A) و موثر (N_E) جایگاه‌های بررسی شده در ماهی سوف

گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	
6/87	9	1/72	۷	۶/۶۷	۹	<i>PflaL1</i>
3/۳۰	8	1/69	۸	۵/۰۸	۸	<i>PflaL3</i>
5/2۵	6	1/53	۶	۴/۳۶	۶	<i>PflaL5</i>
2/4۸	6	0/96	۵	۲/۵۹	۶	<i>PflaL6</i>
2/6۷	4	0/89	۴	۲/۶۶	۳	<i>PflaL7</i>
2/8۲	4	1/02	۳	۳/۱۱	۳	<i>PflaL8</i>
6/۵۰	9	1/674	۸	۳/۷۸	۷	<i>PflaL9</i>
۴/۲۷	۶/۵۷	۳/۴۸	۵/۸۶	۳/۸۹	۶	میانگین
۰/۷۲	۰/۸۱	۰/۴۸	۰/۷۴	۰/۶۱	۰/۸۷	SE

۲-۲-۷-تنوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۵-۶ نشان می‌دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۸۷) در جایگاه *PflaL5* در نمونه‌های گیلان و کمترین آن در جایگاه *PflaL9* (۰/۲۳) در گیلان بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۵) در جایگاه *PflaL1* در نمونه‌های گیلان و کمترین مقدار آن در جایگاه *PflaL7* مربوط به نمونه‌های مازندران (۰/۴۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۱) در بین نمونه‌های گلستان و کمترین آن (۰/۶۱) در گیلان مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۲) در نمونه‌های گلستان و کمترین آن (۰/۶۷) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $۰/۶۲ \pm ۰/۰۳$ و $۰/۷۰ \pm ۰/۰۲$ بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار وجود دارد.

جدول ۵-۶ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد بررسی در ماهی سوف

جایگاه	گیلان		مازندران		گلستان	
	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O
<i>PflaL1</i>	0/85	0/63	0/80	0/67	0/85	0/57
<i>PflaL3</i>	0/80	0/63	0/77	0/6	0/70	0/77
<i>PflaL5</i>	0/77	0/87	0/76	0/8	0/81	0/63
<i>PflaL6</i>	0/61	0/57	0/48	0/57	0/60	0/63
<i>PflaL7</i>	0/62	0/8	0/50	0/4	0/625	0/57
<i>PflaL8</i>	0/53	0/53	0/67	0/7	0/65	0/53
<i>PflaL9</i>	0/73	0/23	0/76	0/6	0/85	0/73
میانگین	0/70	0/61	0/67	0/62	0/72	0/63
SE	0/04	0/08	0/05	0/05	0/04	0/03

۳-۲-۷- تعادل هاردی-واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که اکثر نمونه ها در جایگاه های *PflaL6*، *PflaL7* و *PflaL8* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P < 0/05$) را نشان دادند (جدول ۶-۶).

جدول ۶-۶ بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سوف

منطقه	<i>PflaL1</i>	<i>PflaL3</i>	<i>PflaL5</i>	<i>PflaL6</i>	<i>PflaL7</i>	<i>PflaL8</i>	<i>PflaL9</i>
گیلان	χ^2	۶۳/۹۸	۵۹/۰۴	۱۲/۴۷	۳۲/۸۳	۵/۱۲	۹۰/۲۷
	/Pro	0/003	0/003	0/64	0/005	0/16	0/000
	Sig,	**	**	ns	**	ns	***
مازندران	χ^2	۴۲/۸۰	۷۲/۷۲	۱۶/۸۳	۹/۷۵	۱۱/۰۹	۶۹/۱۶
	/Pro	0/003	0/00	0/33	0/46	0/88	0/000
	Sig,	**	***	ns	ns	ns	***
گلستان	χ^2	۵۴/۶۷	۶۲/۲۵	۳۵/۱۸	۱۴/۷۲	۵/۲۶	۶۵/۹۵
	/Pro	0/02	0/00	0/002	0/47	0/51	0/002
	Sig,	*	***	**	ns	ns	**

ns=not significant, * $P < 0/05$, ** $P < 0/01$, *** $P < 0/001$

۴-۲-۷-فاصله و شباهت ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۶-۷ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۴) بین نمونه‌های مازندران و گیلان می‌باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۷) بین نمونه‌های گلستان و گیلان مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقاً برعکس فاصله ژنتیکی می‌باشد.

جدول ۶-۷ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه‌برداری ماهی سوف (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می‌باشد)

گیلان	مازندران	گلستان
0/00	۰/۸۷	۰/۹۳
۰/۱۴	0/00	۰/۹۰
۰/۰۷	0/۱۰	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می‌گردد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۳۰) بین نمونه‌های گیلان با مازندران که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۸/۱۸) است، مشاهده می‌شود. حداقل F_{ST} (۰/۰۱۴) بین نمونه‌های گیلان با گلستان که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۱۷/۶۹) است، مشاهده شده است (جدول ۶-۸ و ۶-۹). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گیلان با مازندران و گلستان با مازندران معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۶-۸ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سوف (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

گیلان	مازندران	گلستان
0/00	۰/۰۱	۰/۰۷
۰/۰۳۰	0/00	۰/۰۱
۰/۰۱۴	۰/۰۲۱	۰/۰۰

جدول ۶-۹ میزان Nm محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سوف

گیلان	مازندران	گلستان
0/00	۸/۱۸	۱۷/۶۹
	0/00	۱۱/۹۰
		0/00

۳-۷- بحث و نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از سه عامل ضروری حفاظت از گونه ها بیان شده است (Miller, 1997). مدیریت ذخایر در صورتیکه برپایه اطلاعات دقیق از قبیل مطالعات مولکولی باشد، بهتر می تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Murgia et al., 2002). شناسایی تحولات درون گونه ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می باشد. بررسی ساختار ژنتیکی و مطالعات جمعیتی ماهی سوف از پیشینه مطالعاتی برخوردار نمی باشد.

یکی از روشهای قابل اعتماد بررسی ساختار ژنتیکی استفاده از ریزماهوره ها می باشد. به خاطر تنوع بالای این جایگاه ها، از آنها برای مطالعه روابط تکاملی گونه های نزدیک به هم استفاده می کنند. هرچند در استفاده و کارآمد بودن آنها نیز مسائلی از قبیل مقیاس اندازه گیری برای مسافت ژنتیکی در طراحی و

محاسبه درخت فیلوژنی، تعداد جایگاه های مورد نیاز و تعداد جایگاه برای هر نمونه (Chistiakov et al., 2006). بیشتر مطالعات فیلوژنی که توسط ریزماهوره ها انجام شده است برای روابط زیرگونه یا برای گونه های انشقاق یافته بوده است. مناطق مجاور توالی تکراری که پرایمر بر اساس آن ساخته می شود فوق العاده حفظ شده است، به همین خاطر از آن برای روابط فیلوژنی استفاده می شود. برای مثال در مطالعات فیلوژنی انجام شده روی ماهیان سیچلاید براساس اطلاعات حاصل از توالی DNA مناطق مجاور جایگاه ریزماهوره حفاظت بالایی در چندین نسل از این ماهی مشاهده شد که انشقاق آن مربوط به ۸۰ تا ۱۰۰ میلیون سال پیش بود (Zardova et al., 1996). در اینگونه بررسی ها تعداد نمونه بسته به هدف آزمایش متفاوت می باشد. بر خلاف بررسی های ساختار جمعیتی که نیاز به یک نمونه برداری وسیع در سطح منطقه است، در مطالعات جمعیتی تعداد مارکر کم و تعداد نمونه برداری زیاد ولی در مطالعات فیلوژنی تعداد مارکر زیاد و نمونه ها را کم در نظر میگیرند (Olivares et al., 2002).

در این مطالعه، هر ۷ جفت پرایمر ریزماهوره ای استفاده شده پلی مورف بودند. نتایج بدست آمده نشان داده که بیشترین تعداد آلل واقعی مربوط به نمونه های مازندران و گلستان (۹ آلل) و کمترین آن ۳ آلل بوده، ضمن اینکه حداکثر آلل موثر (۶/۸۷ آلل) در نمونه های گلستان و حداقل آن در مازندران (۰/۹۶ آلل) بوده است. علاوه بر این میانگین تعداد آلل های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۶/۱۴ \pm ۰/۴۵$ و $۳/۸۸ \pm ۰/۳۴$ بود. تعداد آللهای واقعی همان تعداد آللهای مشاهده شده برای یک جایگاه در یک جمعیت می باشد. از آنجائیکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه قرار می گیرد، مقایسه بین جمعیت هایی که تعداد نمونه های آنها متفاوت می باشد، باید با احتیاط صورت گیرد.

همچنین در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۸۷-۰/۲۳ با میانگین ۰/۲ بود. همچنین دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۸۵-۰/۴۰ با میانگین ۰/۷۳ بود. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی جایگاه ها هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. کاهش

هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی در نمونه‌ها است. از علل اصلی آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس‌های زیست محیطی، تخریب زیستگاه‌های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزایگوسیتی در ذخایر می‌شود. علاوه بر این در این بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی، اکثر نمونه‌ها در جایگاه‌های PflaL6، PflaL7 و PflaL8 انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P < 0/05$) را نشان دادند. Lucentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را وجود جهش‌های محلی در پرایمرها که موجب نارسایی در تولیدات تکثیرشده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزایگوتها همانند هوموزایگوتها می‌شود اعلام کردند. علاوه بر این Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی اعلام نمودند. از دیگر شاخص‌هایی که در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، شاخص FST می‌باشد. نتایج بدست آمده از FST نشان داده که حداکثر آن (۰/۳۳) بین نمونه‌های گیلان با مازندران و حداقل FST (۰/۱۴) بین نمونه‌های گیلان با گلستان است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گیلان با مازندران و گلستان با مازندران معنی دار بود ($P < 0/05$).

Perca Plavescens) را با روش تعیین توالی DNA Sepulveda و همکاران تنوع ژنتیکی ماهی سوف حاجی طرخان (Perca Plavescens) را با روش تعیین توالی DNA میتوکندری در دریاچه می‌سی‌سی‌پی مورد مطالعه قرار دادند. آنها ۲۱ هاپلوטיפ را شناسایی نمودند که بر اساس آنالیزهای انجام شده، اختلاف معنی داری بین هاپلوטיפ‌ها مشاهده شد. در این بررسی اختلاف بین هاپلوטיפ‌ها ۰/۰۰۷ بود.

در مطالعه دیگری Brown و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی این ماهی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره در شمال آمریکا (کارولینای شمالی و میسیگان) مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی ۲۲۳ آلل شناسایی شد که میزان فراوانی ۳۷٪ از آلل‌ها حدود ۵٪ بود. در این بررسی هتروزایگوسیتی مورد انتظار ۰/۰۴ تا ۰/۸۸ بوده و اختلاف ژنتیکی در حد بالایی معنی دار بود. میزان FST در این مطالعه بین ۰/۰۵۲ تا ۰/۴۴۵ متغیر بود.

بطور کلی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها مداوما در حال تغییر و تحول می‌باشد که این تغییر بستگی به میزان تولید مثل بین جمعیت‌ها دارد. جمعیت مرکز تکثیر که از لحاظ اندازه کوچکتر از جمعیت رودخانه می‌باشند، بزرگترین عامل تغییر ساختار ژنتیکی نسبت به جمعیت رودخانه‌ها می‌باشد. کاهش اختلاف ژنتیکی از طریق آمیزش خویشاوندی و رانش ژنتیکی در بین جمعیت‌های مراکز بازسازی ذخایر امری متداول می‌باشد. به نظر می‌رسد فقدان تنوع ژنتیکی عامل کاهش پتانسیل ژنتیکی در اصلاح ذخایر و سازگاری جمعیت‌ها به تغییرات محیطی باشد. بنابراین پایش و مطالعه هرگونه تغییر در ساختار ژنتیکی جمعیت مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر و نیز جمعیت رودخانه‌های محل مهاجرت و تخم‌ریزی ضروری به نظر می‌رسد (Alam & Islam, 2005). زمانیکه یک گونه خاص از ماهیان قرار است به عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود توانایی ارزیابی ژنتیکی و دسترسی

به ساختار ژنتیکی جمعیت آنها می تواند بعنوان یک ابزار قدرتمند در حفظ تولیدات شیلاتی آنها بکار گرفته شود (Seeb et al., 1990). بنابراین اطلاع و آگاهی از ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی سوف در سواحل جنوبی دریای خزر قبل از هر گونه اقدام عملی در راستای ازدیاد ذخایر آن ضروری به نظر می رسد.

منابع

- بریمانی، ا.، ۱۳۵۶. ماهی‌شناسی و شیلات. انتشارات دانشگاه تهران، جلد اول.
- چکمه دوز، ف.، ۱۳۸۸. بررسی امکان تمایز ژنتیکی و مقایسه ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) نژاد بهاره و پاییزه با استفاده از روش تعیین توالی DNA (DNA Sequencing) و Microsatellite. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.
- خارا، ح.، ۱۳۸۳. بررسی وجود تنوع مورفومتریک، مریستیک و ژنتیک مولکولی درون گونه ای ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر، دریاچه سد ارس و جمهوری آذربایجان. پایان نامه دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- رضایی، م.؛ ع. شعبانی، ب. شعبانپور، و ح. کشیری. ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۳)، ص ۱۵۱-۱۵۵.
- رضوانی گیل کلائی، س.، ف. لالوئی، ر. عقیلی و ح. ابراهیم زاده موسوی. ۱۳۸۵. معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی وجداسازی پنج گونه از کپور ماهیان دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، ۱۵(۴)، ص ۴۹-۵۸.
- رفیعی، الف.، ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان.
- ریحانی، س.، ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه سواحل ایران و روسیه با استفاده از روش میکروساتلایت، پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.
- شجاعی، ل.، ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید بهاره و پاییزه رودخانه های گیلان و مازندران به روش میکروستلایت. پایان نامه دکترای بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.
- عباسی، ک.، ع. ر. ولی پور، د. طالبی حقیقی، ع. ن. سرپناه، و ش. ع. نظامی بلوچی. ۱۳۷۸. اطلس ماهیان ایران، آبهای داخلی گیلان. بندر انزلی: مرکز تحقیقات شیلات گیلان.
- عبدالحی، ح. ع.، س. رضوانی گیل کلائی، ف. لالوئی، م. ج. تقوی، م. حسن زاده صابر، و م. نیرانی. ۱۳۸۹. ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش مولکولی. تهران: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.
- عمادی، ح.، ۱۳۶۴. ماهی آزاد دریای خزر بزرگترین نوع فزل آلالی قهوه ای در جهان. ماهنامه آبریان، ۴، ص ۲-۶.

- قریب خانی، م.، ۱۳۸۸. بررسی ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*) در تالاب های انزلی و امیر کلايه لاهیجان و سوف سفید (*Sander lucioperca*) در سد ارس و حوضه جنوب غربی دریای خزر. رساله دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- کریم پور، م. و ن. حسین پور. ۱۳۶۷. ماهی آزاد دریای مازندران. تهران: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.
- لالوئی، ف.، س. رضوانی و م. پور کاظمی. ۱۳۸۲. بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران. ۱۲(۱)، ص ۱۳۰-۱۱۷.
- لالوئی، ف.، س. رضوانی گیلکلائی، م. نیرانی، و ج. تقوی. ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران. ۱۵(۲)، ص ۱۲۸-۱۱۹.
- لالوئی، ف.، س. رضوانی گیل کلائی، ر. فاطمی، و ج. تقوی. ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA (PCR-RFLP). مجله علمی شیلات ایران، ۱۷(۲)، ص ۱۰۱-۸۹.
- نجار لشکری، س.، ۱۳۹۲. مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی آزاد (*Salmo trutta caspius Kessler, 1877*) در پنج رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر ایران. پایان نامه دکترای شیلات، دانشکده آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
- نویدی مقدم فومنی، ر.، ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان.
- Adams, B.K. and A. Hutchings. 2003. Micro geographic population structure of brook char: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62:517-533.
- Alam, S. and S.H. Islam. 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 230: 65-80.
- Alarcon, J. A., A. Magoulas, and M. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European population of the gill head sea bream. *Aquaculture*, 230:65-80.
- Atabeyoglu, K., 2007. Determination of genetic differences between mtDNA D- Loop F1 and 12S1-H region of native Salmons (*Salmo trutta* sp.) 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.
- Banks, M. A., V.K. Rashbrook, M.J. Calavetta, C.A. Dean and D. Hedgecock 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Californian's central valet. Pp. 915-927.
- Beacham, T.D., B. McIntosh and C. Macconnachie. 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. *Journal of Fish Biology*, 61: 1021-1032.
- Brigitte, J., M. Hansel and V. Loeschker. 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.
- Brown, B., Wang, H.P., Li, L., Givens, C., Wallat, G., 2007. Yellow perch strain evaluation I: Genetic variance of six broodstock populations. *Aquaculture* 271:142-151.
- Brown, B., H.P. Wang, L. Li, C. Givens and G. Wallat. 2007. Yellow perch strain evaluation I: Genetic variance of six broodstock populations. *Aquaculture*, 271:142-151.
- Chang, D. K., D. Metzgar, C. Wills, and C.R. Boland. 2001. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Research*, 11: 1145-1146.

- Charrier, G., J. Durand, L. Quiniou and J. Laroche. 2006. An investigation of the population genetic structure of Pollack (*Pollachius pollachius*) based on microsatellite markers, *ICES Journal of Marine Science*, 63:1705-1709.
- Charlesworth, B. 1998. Measures of divergence between populations. *Molecular evolution and edition*, 15, 538-543.
- Chang, Y.S., F.L. Hung and T.B. Lo. 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 38 (2): 138-155.
- Chauhan, T., K.K., Lal, V. Mohinra, R. Singh, P. Punia, C.S. Prakash and W.S. Lakra. 2007. Evaluating genetic differentiation in wild populations of Indian major carp, *Cirrhinus mirgala* evidence from allozyme and microsatellite. *Aquaculture*, 269:135-149.
- Chistiakov, D.A., B. Hellems and F.A.M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1-29
- Crooijmans, R.P., M.A. Bierbooms, V.A.F. Komen, J. Van and M.A.M. Groenen. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinu scarpio* L.) . *Animal Genetics*, 28:129-134.
- Cui, J, z., X.Y. Shen, G.P. Yang, Q.L. Gong and Q.Q. Gu. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. *Aquaculture*, 250:129-137.
- Dahl, J., E. Pettersson, J. Dannewitz, T. Jarvi and A.C. Lof. 2006. No difference in survival, growth and morphology between offspring of wild-born, hatchery and hybrid brown trout (*Salmo trutta*). *Ecology of Freshwater Fish*, 15: 388-397.
- David, L., P., Rajasekaran, J. Fang, J. Hillel and U. Lavi. 2001. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Molecular Genetic Genomics*. 266: 353-362.
- Dewoody, J. A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. . *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.
- Dimsoski, P., G.P. Toth and M.J. Bagley. 2000. Microsatellite charecterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 9:2187-2189.
- Dorak, T., 2005. Basic population genetics. WWW. Dorak. Info/ genetics/popgen. Html.
- Dumont, H. J., 1995. The Caspian Lake: history, biota, structure, and function. *Limnology and Oceanography*, 43: 44-52.
- Excoffier, L., L. Guillaume and S. Schneider. 2005. Arlequin (version3.0): an integrated software package for populationgenetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatic*, 1: 47-50.
- Fevolden, S.E. and G.H. Pogson. 1997. Genetic divergence at the synaptophysin locus among Norwegian Coastal and North – east Arctic population of Atlantic Cod. *Journal of fish Biology*, 51: 895-908.
- Froufe , E., L. Magyary, I. Lehocky and S. Weiss 2002. mtDNA sequence data supports an Asian ancestry and single introduction of the common carp into the Danube Basin. *Journal og Fish Biology*, 61: 301-304.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucl. Acid.Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hedrick, P.W. 1999. Genetic of population. Arizona State University.
- Jamshidi. Sh. and M.R. Kalbasi. 2011. Conspecific relation between two seasonal migratory forms of endangered Caspian trout, *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877, revealed by RAPD markers. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 10 (3): 437-446.
- Kazanchev, E. N., 1981. Ryby Kaspiiskogo Morya [Fishes of the Caspian Sea]. Legkaya I Pischevaya Promyshlennost, Moskva.
- Keyvanshokooh, S., A. Ghasemi, M. Shahriari-Moghadam, R.M. Nazari, and M. Rahimpour. 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew, 1870) populations in Iran by microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 38: 953-956.
- Kitanishi, S., K. Edo, T. Yamamoto, N. Azuma, O. Hasegawa and S. Higashi. 2007. Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *journal of Fish biology*, 71(sc): 437-452.
- Kotlik, P., and P. Berrebi. 2002. Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 10-18.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2008. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5:150-163.
- Laloei, F., S. Rezvani and M.J. Taghavi. 2013. Genetic Diversity and Differentiation of Common Carp

- (Cyprinus carpio L.) in the southern part of Caspian Sea by using microsatellite markers. *Asian Fisheries Science*, 26: 115-127.
- Leclerc, D., T. Wirth, and L. Bernatchez. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the yellow perch (*Perca flavescens*), and cross- species amplification within the family Percidae. *Molecular Ecology*, 9 (7): 995-997.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 14–1451.
- Li, D., D. Kang, Q. Yin, Z. Sun and L. Liang. 2007. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Genetics and Genomics*, 34: 984-993.
- Lucentini, L., A. Palomba, H. Lancioni, L. Gigliarelli, M. Natali and F. Panara. 2006. Microsatellite Polymorphism in Italian population of northern pike (*Esox Lucius* L.), *Fisheries Research*, 80: 251-262.
- Markova, S. R. Šanda, A. Crivelli, S. Shumkam, I. Wilson, J. Vukic, P. Berrebi and P. Kotlik. 2010. Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 488–500
- Meffe, G. K., and C.R. Carroll. 1997. Genetics: conservation of diversity within species. In principles of conservation biology, eds. G. K. Meff C. R. Carrol, pp. 161-201. Sunderland, Ma: Sinauer Associates, Inc: Publisher.
- Menezes, M. R., D. Noguchi, M. Nakajima and N. Taniguchi. 2008. Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Fish Biology*, 73(2): 463-473.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computersoftware distributed by author.
- Murgia, R., G. Tola, S.N. Archer, Vallerga and J. Hirano. 2002. Genetic identification of grey mullet species (*Mugilidae*) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (bottarga). *Marine Biotechnol*, 4: 119–126.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- Nguyen, V.H. and S.V. Ngo. 2001 . Vietnamese freshwaters fish, cyprinid famil. Agriculture publish house, Hanoi, Vietnam.
- Olivares, A. R. and J.P. Cha´vez-Gonzalez. 2008. Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyological Research*, DOI 10.1007/s10228-008-0040-7
- Osvaldo J. S. Villet a, M. Alexander, B. Ford and A. Carol. 2007. Population genetic diversity and phylogeographic divergence patterns of the yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 35:107-119.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6 genetic analysis in excel population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Rezvani gilkolaei, S.,A. imanifar, R. Aghili and F. Laloee. (2007). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. *J. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* . , 86:1463-1467
- Rico, C., K.M. Ibrahim, I. Rico and G.M. Hewitt. 1997. Stock composition in North Atlantic population of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*, 51: 462-475.
- Ryman, N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39 (Supplement A) 211-224.
- Santi-Rampazzo, A. P., P.B. Nishiyama, P.E.B. Ferreira and I. Martins-Santos. 2008. Intrapopulation polymorphism of nucleous organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Parana River. *Journal of Fish Biology*, 72: 1236-1243.
- Seeb, L.W., J.E. Seeb and J.J. Polovina. 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirus marginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. *Fish Bulltain*, 88:713–718.
- Sepulveda-Villet, O.J., A.M. Ford, J.D. Williams and C.A. Stepien. 2009. Population genetic diversity and phylogeographic divergence patterns of the yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 35: 107–119.
- Slechtova, V., V. Slechta, M. Flajshans and D. Gela. 2002. Protein variability in common carp (*Cyprinus carpio*) breeds in the Czech Republic. *Aquaculture*, 204: 241-242.
- Sourinejad, I., M.R. Kalbassi, A. Pino-Querido, M. Vera, C. Bouza and P. Martinez. 2011. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta aspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. *African Journal of Biotechnology*, 10 (26): 5084-5090.

- Tamura, K., J.M.E. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007, MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Taylor, E. B., P. Tamkee, G. Sterling and W. Hughson. 2007. Microsatellite DNA analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from western Alberta, Canada: native status and evolutionary distinctiveness of "Athabasca" rainbow trout. *Conserv Genet*, Vol. 8: pp. 1-15.
- Thai, B. T., A.A. Pham and G.M. Austin. 2007. Genetic diversity of common carp in vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*, 258: 228-240.
- Thai, B. T., T.A. Pham and G.M. Austin. 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*, 258: 228-240.
- Thorpe, J. P. and A.M. Sol-Cave. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23: 8-18.
- Turner, F., T.E. R.E. Dowling, Broughton and J.R. Gold. 2004. Variable microsatellite marker amplify across divergent lineages of Cyprinidae fishes. *Conservation Genetic*, 5:279-281.
- Vera, M., I. Sourinejad, C. Bouza, R. Vilas, A. Pino-Querido, M.R. Kalbassi and O. Martinez. 2011. Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*, 664: 51-67.
- Yoon, M., S. Sato, N. Azoma, J.E. Seeb, V. Brykov, L.W. Seeb, N. Varnavskaya, R.L. Wilmot, D.H. Jin, S. Urava, A. Urano and S. Abe. 2007. Congruence of Population Genetic Profiles Obtained from Mitochondrial and Microsatellite DNA Analysis in the Pacific Rim Chum Salmon Populations. North Pacific Anadromous Fish Commission. *Technical Report*, 7: 121-123.
- Yousefian, M., 2011. Evaluation of Genetic Variation Among Endangered Sea Brown Trout Young Fish for restocking to Caspian Sea. *Advances in Environmental Biology*, 5 (9): 2769-2775, ISSN 1995-0756.
- Zardoya, R., D. Vollmer, C. M Craddock, J. Streelman, T.S. Karl, and A. Meyer. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society biological sciences*, 263: 1589-1598.
- Zhao, N., Z. Shao, W. Ai, B. Zhu, S. Brosse and J. Chang. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 7-13.
- Zhou, B., F. Zkou, H. Cao, Z. Shou, N. Zhao, B. May, and J. Chang. 2002. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Journal of Applied Ichthyology*. 301-306.

Abstract:

In this study genetic characterization of *Barbus brachycephalus caspius*, *Lucioperca lucioperca*, *Rutilus rutilus caspius*, *Rutilus frisi kutum* and *Salmo trutta caspius* were examined by 611 samples from regions in East (Guilan province), Middle (Mazandaran province) and west (Golestan province) of southern part of the Caspian Sea. DNA was extracted from fin tissue by phenol - chlorophorm method and then PCR was performed using special primers. Statistical analysis of data was performed by Gene Alex, MEGA and Arlequin softwares.

- *Rutilus frisi kutum*: The results showed that nine of ten primers were polymorphic loci. The mean of effective and observed alleles were 7.26 ± 0.49 and 4.37 ± 0.35 respectively. Also, the mean of expected and observed heterozygosity were 0.55 ± 0.03 and 0.69 ± 0.02 respectively. Of the analysed loci, all of the samples (except Tajan and samples in *LOC4* and Gilan samples in *MFW2*) possible tests were found to deviate significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). The genetic diversity was significantly different between samples of Golestan and Gilan, Golestan and sefidrood, Golestan and Tajan, Mazandaran and sefidrood and Gilan and Tajan ($p < 0.05$).

- *Rutilus rutilus caspius*: Sevan variable microsatellite loci were used to investigate genetic diversity and population structure of *R. rutilus caspius*. The mean of effective and observed alleles were 5.75 ± 0.30 and 4.76 ± 0.25 respectively. Also, the mean of expected and observed heterozygosity were 0.58 ± 0.18 and 0.73 ± 0.01 respectively. All of the samples (except Golestan samples in *LOC3*) possible tests were found to deviate significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). Of the analysed loci, the genetic divergence was significantly different between samples of Golestan and Gilan, Gilan and Mazandaran and Gilan with Gorgan bay ($p < 0.05$).

- *Salmo trutta caspius*: Genetic characterization of *S. trutta caspius* was comparatively analyzed with mitochondrial DNA sequencing that 45 haplotypes was observed. The average of expected and observed heterozygosity were 0.61 ± 0.35 and 0.33 ± 0.12 respectively. The maximum of haplotype diversity (0.089 ± 0.04) was in Sardabrood river and the minimum was in Astara river (0.81 ± 0.02). Also, the maximum of nucleotide diversity was 0.13 ± 0.07 in Sardabrood and Chalos rivers and the minimum was 0.11 ± 0.06 in Tonekabon river. In addition, the maximum and minimum of F_{ST} was 0.08 and 0.01 respectively. Of the analysed loci, the genetic divergence was significantly different between samples of Astara and Chalos, Astara and Tonekabon, Chalos and Karganrood and Tonekabon with Kaganrood ($p < 0.05$).

- *Barbus brachycephalus caspius*: The size of amplified fragment was 800 bp in all of the samples. There were 24 variable loci and 12 haplotype that the maximum of haplotype was in Gilan area (8 haplotype). The average of expected and observed heterozygosity were 0.003 ± 0.35 and 0.42 ± 0.12 respectively. The results showed that the haplotype diversity was significantly different between samples of Sefidrood whit other samples ($p < 0.05$). In addition The maximum of nucleotide diversity was 0.005 ± 0.003 in Sefidrood and minimum was 0.001 ± 0.001 in Tajan river. Of the analysed loci, the genetic divergence was significantly different between samples of Gilan and Tajan, Mazandaran and Sefidrood ($p < 0.05$).

- *Lucioperca lucioperca*: The genetic diversity of *L. lucioperca* was analyzed by using microsatellite markers. Seven primer sequences available for were tested to amplify microsatellite loci that all of loci were polymorphic. The mean of effective and observed alleles were 6.14 ± 0.45 and 3.88 ± 0.34 respectively. Also, the mean of expected and observed heterozygosity were 0.662 ± 0.03 and 0.70 ± 0.02 respectively. The most of samples in *PflaL6*, *PflaL7* and *PflaL8* loci possible tests were found to deviate significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). The maximum of F_{ST} was 0.30 between Gilan and Mazandaran samples that there were minimum gene flow (8.18). The genetic divergence was significantly different between samples of Gilan and Mazandaran and Golestan whit mazandaran ($p < 0.05$).

Keywords: Genetic variation, *Barbus brachycephalus caspius*, *Lucioperca lucioperca*, *Rutilus rutilus caspius*, *Rutilus frisi kutum* and *Salmo trutta caspius*, Caspian Sea

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

Project Title : Identification Genetic characterization and population of *Barbus brachycephalus caspius*, *Lucioperca lucioperca* , *Rutilus rutilus caspius* , *Rutilus frisii kutum* and *Salmo trutta caspius* in southern part of the Caspian Sea by molecular method (Microsatellites) and formation DNA bank

Approved Number: 14-76-12-8914-89164

Author: Faramarz Laloei

Project Researcher : Faramarz Laloei

Collaborator(s) : Yousefian, M., Pourgholam, R., Rezvani gilkolaei, S., Ghorghi, A., Fazli, H., Taghavi, M.J., Taleshian, H., Behreozzi, Sh., Molaei, H.

Advisor(s): Faramarz Laloei

Supervisor: Pourkazemi, M.

Location of execution : Mazandaran province

Date of Beginning : 2011

Period of execution : 3 Years & 3 Months

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 - Caspian Sea Ecology Research Center**

Project Title :
Identification Genetic characterization and population of *Barbus brachycephalus caspius*, *Lucioperca lucioperca* , *Rutilus rutilus caspius* , *Rutilus frisi kutum* and *Salmo trutta caspius* in southern part of the Caspian Sea by molecular method (Microsatellites) and formation DNA bank

Project Researcher :

Faramarz Laloei

Register NO.

49939