CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

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

عنوان:

ایجاد بانک ژن ماهیان خلیج فارس و دریای عمان

مجری:
احمد غرقی

شماره ثبت
۵۰۸۴۹

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

عنوان پروژه : ایجاد بانک ژن ماهیان خلیج فارس و دریای عمان
شماره مصوب پروژه : ۸۹۲۱۱-۸۹۱۹-۱۲-۱۲-۰۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : احمد غرقی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : احمد غرقی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد پورکاظمی – غلامرضا صالحی-فرامرز لالویی- محمدرضا حسینی- خسرو آیین جمشید- محمودرضا آذینی – فریبرز احتشامی – احمد مال الهی – الهام جرفی – رضا صفری – سعید حاج رضایی – الهام مقصودلو- محمد سنجری – تورج ولی نسب – یزدان مرادی - سهراب رضوانی- همایون حسین زاده صحافی - ملیکا ناظمی- حسین عبدالحی - سعید امین زاده- فاطمه پیشه ورزاد- ابراهیم صفوی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : عباسعلی مطلبی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱
مدت اجرا : ۵ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : ایجاد بانک ژن ماهیان خلیج فارس و دریای عمان

کد مصوب : ۸۹۲۱۱-۸۹۱۹-۱۲-۱۲-۰۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۸۴۹ تاریخ : ۹۵/۹/۲۴

با مسئولیت اجرایی جناب آقای احمد غرقی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته دامپزشکی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۵/۵/۱۵ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- وظایف بانک ژن ۵
۱-۲-گونه های مورد مطالعه در تهیه بانک ژن ۸
۱-۲-۱- سفره ماهی (پُو) گزنده با نام علمی *Dasyatis bennetti* ۸
۱-۲-۲- گربه ماهی پوزه گِرد با نام علمی *Netuma bilineata* ۹
۱-۲-۳- گربه ماهی بزرگ با نام علمی *Netuma thalassina* ۱۰
۱-۲-۴-کوسه ماهی شبه دندان نما با نام علمی *Carcharhinus leucas* ۱۱
۱-۲-۵- زمردماهی نوار اُریب با نام علمی *Choerodon robustus* ۱۲
۱-۲-۶- کفشک پر لکه نام علمی *Pseudorhombus pentophthalmus* ۱۳
۱-۲-۷- کفشک پهن چپ‌رُخ با نام علمی *Pseudorhombus arsius* ۱۴
۱-۲-۸- هوور معمولی با نام علمی *Thunnus tonggol* ۱۵
۱-۲-۹- زرده با نام علمی *Euthynnus affinis* ۱۶
۱-۲-۱۰- یال اسبی با نام علمی *Trichiurus lepturus* ۱۷
۱-۳- تکنیکهای مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیتها و تکثیر و پرورش آبزیان ۱۸
۱-۳-۱- تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) ۲۰
۱-۳-۲- توالی‌یابی ۲۲
۱-۳-۳- mtDNA ژنوم میتوکندریایی و کاربرد آن ۲۴
۱-۴- بانک ژن ۲۶
۲- مروری بر منابع ۲۸
۲-۱- مطالعات و تحقیق در ایران ۲۸
۲-۲- مطالعه و تحقیق در خارج از کشور ۳۱
۳- مواد و روشها ۳۳
۳-۱- موارد مورد استفاده ۳۳
۳-۲- دستگاههای مورد استفاده ۳۴

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳-۳- روشها ۳۴
۳-۳-۱- روش نمونه برداری ۳۴
۳-۳-۲- استخراج ژنوم کل (Total DNA) ۳۴
۳-۳-۳- الکتروفورز DNA استخراج شده ۳۶
۳-۳-۴- روش کار ۳۶
۴- نتایج ۴۰
۴-۱- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۰
۴-۱-۱- روش الکتروفورز ۴۰
۴-۱-۲- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ۴۰
۴-۲- تکثیر و مقایسه توالی‌های 16SrRNA ۴۱
۴-۲-۱- تکثیر ژن 16SrRNA ۴۱
۴-۲-۲- نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16SrRNA ۴۱
۴-۲-۳- هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W ۴۱
۴-۲-۴- ترسیم درخت تکاملی ۴۶
۵- بحث و نتیجه گیری ۵۰
پیشنهادها ۵۴
منابع ۵۵
چکیده انگلیسی ۵۸

چکیده

مطالعات ژنتیک و ایجاد بانک ژن می‌تواند رهنمودهایی برای بهبود تنوع و شناسایی ساختار جمعیت ، صید قاچاق، تشخیص میزان هم خونی و طبقه بندی ژنتیکی جانوران ارائه نماید . در این تحقیق نمونه برداری از مناطق مهم زیستگاه های گونه های مورد مطالعه مانند پُو گزنده با نام علمی *Dasyatis bennetti* ، گربه ماهی بزرگ با نام علمی *Netuma thalassina* ، گربه ماهی پوزه گِرد با نام علمی *Netuma bilineata* ، کوسه ماهی شبه دندان نما با نام علمی *Carcharhinus leucas* ، زمردماهی نوار اُریب با نام علمی *Choerodon robustus* ، گیش پوزه دراز با نام علمی *Carangoides chrysophrys* ، کفشک پهن چپ‌رُخ با نام علمی *Pseudorhombus arsius* ، هوور معمولی با نام علمی *Thunnus tonggol* ، زرده با نام علمی *Euthynnus affinis* و در نهایت یال اسبی با نام علمی *Trichiurus lepturus* انجام گرفت. استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم انجام گردید. استفاده از روش فنل کلروفرم از متداول ترین روشها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در تهیه بانک ژن میباشد .پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد و و رسم درخت فایلوژنی و میزان فاصله ژنتیکی گونه های مورد نظرانجام گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر در نمونه ها بین ۱/۸– ۲/۱ قرار داشت که نشانگر کیفیت خوب DNA نمونه ها بود. بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از گرادیانت دمایی۶۰- ۴۸ درجه سانتیگراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دما های۵۸-۵۴ درجه سانتیگراد برای نمونه های مختلف محاسبه گردید.

این طرح با اهدافی از جمله شناسائی ساختار ژنتیکی گونه ها، و رسم درخت فایلوژنی آنها با استفاده از ژن 16s ، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی ۱۰ گونه مهم و در معرض تهدید از ماهیان منطقه خلیج فارس از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه سعی در شناسایی ذخایر ژنتیکی و ایجاد بانک ژن آبزیان با اهداف ذکر شده دارد. همچنین شناسایی گونه ای از کفشک ماهیان به نام Pseudorhombus pentophthalmus میباشد که به صورت یک هاپلوتایپ جدید با اختلاف ژنتیکی ۷ درصدی از دیگر نمونه های ثبت شده در بانک جهانی ژن متمایز شده است از دستاوردهای مهم این تحقیق میباشد.

واژه های کلیدی:

بانک ژن ماهی ، mtDNA ، ذخایر ژنتیکی،16s rRNA ، خلیج فارس و دریای عمان

۱-مقدمه

روند ترکیب و تکامل گونه های جدید و نیز انقراض گونه هایی که توان سازگاری با تغییرات شرایط محیطی را نداشتند، بیش از چند میلیارد سال به طول انجامید تا سرانجام موسوم به کره زمین به وجود آمد که ارزشمندترین منبع آن تنوع زیستی است . تنوع زیستی شبکه ای از همه موجودات زنده، اعم از گیاهی و جانوری است و نژادهای انسانی، جانوران، گیاهان، قارچ ها و سایر جانداران تک سلولی را در بر می گیرد. تنوعی که ما امروزه می بینیم شبکه حیاتی است که میوه بیلیون ها سال تکامل می باشد و ما جزئی لاینفک از آن هستیم و کاملا به آن وابسته ایم . در حقیقت تنوع زیستی به تنوع حیات بر روی زمین و الگوهای طبیعی آن بر می گردد.

تنوع زیستی عبارت است از اشکال مختلف حیات بر روی سیاره زمین و مفهومی است که امروزه در سه سطح ژن، گونه و اکوسیستم بررسی می شود. اما این واژه در سطح گونه شناخته شده تر بوده و کاربرد بیشتری دارد. در شرایط کنونی، سیاره ما زیستگاه چندین میلیون گونه در قالب حدود یکصد شاخه است؛ تقریبا یک میلیون و هشتصد هزار گونه توسط دانشمندان شناسایی شده است ولی برآوردهای موجود نشان می دهد که پنج تا پانزده میلیون گونه زنده در حال حاضر در زیست کره زندگی می کنند، زیرا بسیاری از گروههای موجودات زنده هنوز به طور دقیق شناسایی و مطالعه نشده اند. همچنین، سالانه بیش از پانزده هزار گونه جدید توسط دانشمندان معرفی می شود و گونه های دیگری نیز در طول زندگی ما انسان ها تکامل می یابند.

بخش حساسی از سرمایه های طبیعی است که خوراک، پوشاک و مسکن و بسیاری از داشته های ما از این سرمایه تامین می شود و روند آن با سرازیر شدن میلیاردها دلار سود به بازارهای اقتصادی جهان، همچنان ادامه دارد. تنوع زیستی علاوه بر آن که توسعه کشاورزی را ممکن می سازد، امکان سازگاری با شرایط جدید را برای گونه هایی که فاقد چنین امکاناتی هستند، فراهم می آورد. کشور جمهوری اسلامی ایران عرصه ای بالغ بر حدود یکصد و شصت و پنج میلیون هکتار را از بیست و پنج درجه تا چهل درجه عرض جغرافیایی شمالی در بر می گیرد و در ناحیه ای که سه زون اقلیمی شامل زون مدیترانه ای، زون خشک آسیای غربی و زون معتدل نیمه مرطوب و مرطوب کاسپین با یکدیگر تلاقی می کنند واقع شده است. به طوری که کشورمان مکانی برای تلاقی بسیاری از فرهنگ ها و همچنین، اقلیم های متنوع، اراضی، آب ها و تنوع زیستی است. از مجموع کل اراضی ایران، حدود پنجاه و دو و نیم درصد از آن را مراتع، هشت و نیم درصد از آن را جنگل ها و نوزده و نیم درصد از آن را بیابان های مطلقا واجد خاک های شور تشکیل می دهد. به دلیل واقع بودن بیشتر مناطق کشور در زون محیط زیستی خشک، تقریبا هشتاد و پنج درصد از اراضی کشاورزی آن در نواحی خشک و نیمه خشک قرار گرفته است؛ حدود هشت درصد از عرصه کشور را شهرها، شهرک ها، روستاها، نواحی صنعتی و جاده ها تشکیل داده است. تنوع زیست بوم های دریایی و ساحلی در شمال و جنوب کشور، شامل ۲۵ واحد اکولوژیک

بوده که در قالب صخره های مرجانی، خلیج ها و جزایر کوچک است.اگر چه اغلب مناطق ایران دارای اقلیم بسیار خشک است، ولی تالاب های کشور دارای اهمیت جهانی هستند.

از تعداد ۴۲ نوع تالاب تعریف شده براساس کنوانسیون رامسر، همگی به جز یک مورد (تالاب های توندرا)، در ایران وجود دارد.

هم اکنون انقراض گونه های موجود ۵۰ تا ۵۰۰ برابر بیشتر از ۶۵ میلیون سال قبل است و برآورد می شود که حدود ۱ میلیون گونه تا سال ۲۰۵۰ در معرض خطر انقراض قرار دارند . البته دلیل بسیاری از این مسائل به درستی شناخته نشده اند. وضعیت پر تلاطم و بحرانی زیستگاه هاعمدتاً حاصل دخالتهای مخرب انسانی که هم اینک گریبانگیر محدوده آبهای خلیج فارس و دریای عمان شده است و تغییرات شدید آب و هوایی سالیان اخیر و همچنین آلودگی های نفتی پیامد جنگ در خلیج فارس و عبور و مرور کشتی های نفتکش که مقادیر بسیار زیادی نفت را به عنوان آب توازن به درون خلیج فارس میریزند و همچنین وجود نیروگا های برق و آب شیرین کن ها و پساب مزارع پرورش میگو و سایر ابزیان سرعت افول و انقراض ارگانیسمهای زنده را بسیاربالا برده به گونه ای که هر روز تعداد فراوانی از موجودات از میکرو ارگانیسمها گرفته تاجانوران و گیاهان پر سلولی در این منطقه مورد تهدید قرار گرفته و گونه ای مهم را در خطر انقراض قرار داده است.

بانک ژن DNA از موثرترین راه های حفظ ذخایر ژنتیکی است. ایجاد بانک های ژنتیکی شامل نمونه جنسی و سوماتیک ، بافت و ... که در دماهای بسیار پایین منجمد شده اند از اقدامات اولیه برای حفظ تنوع زیستی با استفاده از روش های زیست فن آوری است ، که شامل تلقیح مصنوعی ، لقاح خارج رحمی ، شبیه سازی و... است.با توجه به اینکه تنوع ژنتیکی انواع گونه های دنیا با سرعتی زیاد رو به کاهش است، برای جلوگیری از این روند کاهشی نیاز به ارائه یک راهکار فوری است . این نگرانی درجهان منجر به پیشنهاد تشکیل بانک های ژنی سلول های سوماتیک شده است که به علت امکان شبیه سازی با استفاده از این سلولها و امکان تهیه آسان آنها ، مورد توجه قرار گرفته و به سرعت در حال وسعت یافتن است. جمع آوری و ذخیره سلول های سوماتیک در اکثر گونه ها برعکس روش های دیگر ذخیره سازی مانند ذخیره سازیاسپرم ، جنین و تخمک، هم هزینه کمتری دارد و هم سریعتر و راحت تر قابل انجام است .اولویت حفاظت تنوع ژنتیکی گونه ها در جهان بر مبنای ایجاد بانک های ژنی بومی در داخل هر کشور و سپس تاسیس شبکه ذخیره سازی جهانی است.لذا ایجاد بانکهای بزرگ بافت و DNA ژنومی از موجودات زنده دربسیاری از کشورهای جهان از جمله منطقه خلیج فارس و دریای عمان درراستای نگه داری نسخه هایی از ژنوم ذخایر ارزشمند ژنتیکی مهم میباشد . متاسفانه در وضعیت موجود ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه وجود ندارد و شناسنامه ای از ذخایر ژنتیکی و گونه های در معرض خطر گیاهی و جانوری در این منطقه ایجاد نشده است . این امر مهم و اساسی است که ذخایر به عنوان واحد های

مدیریتی اساسی می باشد که در پارامترهای رشد و مرگ ومیر اشتراک دارند و خفاظت و صیانت قانونی از حقوق ملی بر منابع ژنتیکی آبزیان خلیج فارس و دریای عمان امری اجتناب ناپذیر است.

تحقیقات در زمینه ژنتیک و زیست فناوری در آبزیان رشد پیوسته خود را از اواسط دهه ۱۹۸۰ آغاز کرده است و در حال حاضر تحقیقات در این زمینه بسیار فعال است. از جمله مهمترین زمینه‌های فعالیت تحقیقات ژنتیک آبزیان می‌توان به استفاده از اصول ژنتیک و زیست فناوری به وسیله مدیران شیلاتی و محققان جهت افزایش میزان صید طبیعی، مدیریت صحیح ذخایر آبزیان، مدیریت تکثیر و پرورش در قفس و یا محیط مصنوعی، بازسازی جمعیت های بومی و حفاظت از ذخیره ژنی و تنوع ژنتیکی در منابع طبیعی و گونه های در معرض انقراض اشاره نمود (Dunham2004).

نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری از مهمترین اهداف ایجاد بانک ژن است.جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی از جمله وظایف بانک ژن می باشد.می توان گفت جمع آوری نمونه ، پایه و اساس اطلاعات مولکولی برای هر نوع مطالعه سیستماتیک و ژنتیک جمعیت است.یکی از بهترین تکنیک ها پس از مطالعه، حفاظت از زیستگاه است به طوری که اگر زیستگاه حفظ شود از انقراض گونه‌های در معـرض خطر و بسیاری از گونه‌های دیگر نیز جلوگیری می‌گردد.مطالعات ژنتیک جمعیت برای حفظ و مدیریت جمعیت های جانوری و گیاهی و ساماندهی پژوهش ها و تحقیقات به منظور کاربردی شدن مطالعات در حفظ طبیعت و اکوسیستم ها نیز به وسیله بانک ژن انجام می شود. دستیابی به روشهای تکثیر در اسارت گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و ارزیابـی آلودگی های زیست محیطی و اثرات ناشی از آن در اکوسیستم ها و روند انقراض گونه ها، از مهمترین مزایای استفاده از بانک ژن درحفاظت از محیط زیست و اکوسیستم ها است.در بانک ژن امکان بررسی و تدوین قوانین و ضوابط مربوط به ورود و خروج غیرقانونی نمونه های بیولوژیک نیز وجود دارد .امکان سامانـدهی درخواست های ارائه شده برای تکثیـر در اسارت گونه های وحشی که گاهی باعث فرسایش ژنتیکی و کم شدن تنوع زیستی می شوند، فراهم شده است.

هر نوع تداخل در این سیستم منجر به برهم خوردن این رابطه ظریف زیستی خواهد شد. نمونه بسیار بارزی که می توان در این زمینه برشمرد تداخل انسان در اکوسیستم های طبیعی است. انسان با تبدیل اکوسیستم های مرتعی و جنگلی به مزارع باعث برهم خوردن روابط زیستی موجود شده و اختلالات بسیاری را به وجود آورده است. در این مورد انسان با این عمل تنوع داخل اکوسیستم ها را کاهش داده توانایی های ذاتی آن را از بین می برد. کاهش تنوع باعث کاهش نقش اکوسیستم ها در جذب آلاینده های محیطی (مثل گازهای سمی)، کاهش

حاصل خیزی خاک ،به هم خوردن روابط شکار و شکارچی بین موجودات حیوانی می شود. اثر متقابل بین کشاورزی و تنوع زیستی نیز مهم است . حدود هفتاد درصد اکوسیستم های زمین جهت کسب ۹۸٪ غذا ، پوشاک و چوب برای انسان دستکاری شده است . علاوه بر آن حدود ۲۵٪ سطح زمین به شهرسازی و سکونت انسان اختصاص دارد و بدین ترتیب انسان حدود ۹۵٪ اکوسیستم های خشکی را به تصرف خود درآورده است.
در ادوار گذشته انسان با نزدیکی با طبیعت سعی می کرد حداقل مداخله را در اکوسیستم ها به وجود آورد. و در حقیقت به عنوان جز زنده ای عمل می کرد. با شروع کشاورزی عملا مداخله انسان در طبیعت شروع شد. اهلی کردن گیاهان و حیوانات مرحله شروع کاهش تنوع بود.
در مواقعی که کاهش جمعیت گونه ها اتفاق می افتد و جمعیت با خطر انقراض مواجه می شود استفاده از روش های نوین از قبیل زیست فناوری را با کشت سلول و بافت گونه ها و سپس انتقال آن به زیستگاه اصلی فراهم می آورد .بانک Ex situ امکان حفاظت خارج زیستگاهی ژن به عنوان یکی از زیر مجموعه های گروه زیست فناوری، وظیفه جمع آوری ، آماده سازی و نگهداری بلند مدت نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف را بر عهده دارد که مواد اولیه برای مطالعات مولکولی از قبیل شناسایی و ثبت ژنتیکی، تهدیدات ژنتیکی، تشخیص نمونه های مشکوک قضایی، احیاء گونه های در معرض تهدید و ...را با صرفه جویی در زمان و هزینه ماموریت ها و کاهش آسیب به محیط زیست تامین می کند. تعاریف مختلفی از بانک ژن آورده شده است که میتوان در این ارتباط به چند مورد اشاره کرد . در واقع بانک ژن مکانی است که دانشمندان در آن اطلاعات مربوط به DNA گیاهان ،جانوران و حتی انسان را ذخیره سازی کرده، به طوری که می توانند ژن مورد نظر را در زمانی خاص مجددا وارد خزانه ژنی (gene pool) کنند و یا هر مکانی را که به عنوان یک ذخیره گاه طبیعی از جمله مراکز نگهداری آبزیان هدف که در آن برای نظارت، مدیریت و حفاظت از گوناگونی ژنتیکی تلاش شده است می توان به عنوان یک بانک ژن در نظر گرفت.

۱-۱- اهم وظایف بانک ژن آبزیان

از اهم وظایف بانک ژن میتوان به نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ،جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی ، جمع آوری نمونه، پایه و اساس اطلاعات مولکولی برای هر نوع مطالعه سیستماتیک و ژنتیک جمعیت و نیز حفظ و مدیریت صحرایی جمعیت های جانوری و گیاهی و ساماندهی پژوهش ها و تحقیقات به منظور کاربردی شدن مطالعات در حفظ طبیعت و اکوسیستم ها و در نهایت دستیابی به روش های تکثیر در اسارت گونه های در معرض تهدید

و در حال انقراض و ارزیابـی آلودگی های زیست محیطی و اثرات ناشی از آن در اکوسیستم ها و روند انقراض گونه ها اشاره کرد.

بانک ژن این امکان را به ما میدهد که با تهیه سلولهای نر و ماده به عنوان پتانسیل بالقوه ایجاد مجدد گونه های منقرض شده را داشته باشیم و با حفظ سلولهای مختلف بدن گونه ها در جهت بررسی و تعیین نقشه ژنتیکهای تکرار شونده این گونه ها که مبین یک گونه از سایر گونه ها میباشد اقدام کنیم و سپس با ثبت کامل مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی و بیوگرافی آنها در صورت انقراض در جهت معرفی به نسلهای آینده گام برداریم.

به رغم ثبت تعدادی تازه از گونه های گیاهی و جانوری در فهرست گونه های در خطر یا نابود شده,فعالیتهای جاری بیوتکنولوژی در بسیاری از نقاط جهان سبب توقف یا کاهش روند انقراض گونه های زیستی شده است.

اگر چه روش مطلوب حفاظت گیاهان نگهداری در رویشگاه طبیعی آنها میباشد,ولی بنابر دلایل متعدد از جمله تغیرات عوامل اقلیمی,استفاده بی رویه,چرای دام و همچنین وقوع حوادث طبیعی و مصنوعی,حفظ گیاه در رویشگاه اصلی را با مشکل مواجه میکند.

ایجاد بانک ژن راهی است که ضمن حفظ گونه های ارزشمند و یا گونه های در معرض خطر با نگهداری دهها جفت از هر گونه بصورت زنده و نیز بصورت بافت منجمد و یا نگهداری DNA در فریزر منهای ۸۰ در جه سانتیگراد و بویژه با ایجاد کتابخانه ژنی مطالعه ژنهای متعدد مثل ژنهای اقتصادی چون ژنهای رشد ، مقاومت به بیماری ، مقاومت به نوسانات دمایی ، نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی آبزیان و حفظ تنوع زیستی آنان به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از روش‌های زیست فناوری ازمهمترین اهداف ایجاد بانک ژن است .این امر میتواند در حفظ و باز سازی ذخایر این گونه ها در آینده و همچنین استفاده محققان از گونه های ذخیره شده موثر باشد.همچنین در این پژوهش و در راستای ایجاد بانک ژن آبزیان واجرای این طرح سعی در تهیه شناسنامه و تعیین اختلاف ژنتیکی میگوهای مهم و اقتصادی آبهای خلیج فارس دارد . جمع آوری نمونه‌های بیولوژیک گونه‌های مختلف آبزیان ،آماده‌سازی و نگهداری بلندمدت آن، ثبت ژنتیکی گونه‌های در معرض تهدید ودر حال انقراض واستفاده از تکنیک‌های زیست فناوری برای حفظ، بقا ومدیریت گونه‌های آبزی از جمله دیگر وظایف بانک ژن است .

با توجه به اهمیت موضوع حفاظت ذخایر خدادادی ملی و وظیفه ای که در این خصوص بر عهده داشت، مسئولان بیش از پیش به نقش بانک ژن واقف و همّ خود را در توسعه و تقویت آن به کار گرفتند. مطالعات انجام شده قبلی منجر به اولویت بندی گونه‌های در معرض خطر از طریق بررسی نمونه‌های بیولوژیکی اعم از بافت، خون، پوست، عضله و سلول‌های زایشی شده است و تشکیل و راه اندازی بانک ژن آبزیان از ضروریات حفظ ذخایر ژنتیکی، به عنوان سرمایه‌های ملی بشمار می رود. میتوان انتظار داشت که با نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ،

جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی به حفظ گونه های مهم و در معرض تهدید کمک نماید.

هم‌اکنون حدود ۱۰ گونه ماهی ۹۰ گونه آبزی در معرض تهدید و خطر انقراض وجود دارد. میتوان انتظار داشت که با نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ، جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی به حفظ گونه های مهم و در معرض تهدید کمک نماید. .

تاسیس بانک ژن آبزیان از جمله بانک ژن ماهیان در معرض خطر به منظور دسترسی جامعه علمی کشور به رده های سلولی و هیبریدوماهایی که کاربرد آنها در واکسیناسیون و تحقیقات بنیادی و یا کاربردی از اهداف این پژوهش است. مراکز تحقیقاتی داخل و خارج از کشور نیز می توانند بافت یا سلول های شاخص و بارزش ژنتیکی خودا را به بانک ژن آبزیان جمهوری اسلامی ایران اهدا نمایند. پیش بینی میشود که در فاز بعدی این پروژه با تهیه رده های سلولی از گونه های مختلف آبزیان علاوه بر حفظ ذخایر ژنتیکی ، بتوان با فروش رده های سلولی به مراکز پژوهشی و دانشگاهی کشور نسبت به ارتقای ان بخش قدم های شایان برداشته شود. این پروژه که در قالب طرح بانک ژن آبزیان جمهوری اسلامی ایران با اهدافی از جمله شناسائی ساختار ژنتیکی گونه ها، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان سعی در شناسایی ذخایر ژنتیکی و ایجاد بانک ژن آبزیان با اهداف ذکر شده دارد.

میتوان انتظار داشت که با نگهداری مطلوب از ذخایر ژنتیکی جانوری و گیاهی و حفظ تنوع زیستی به عنوان سرمایه‌های ملی با استفاده از تکنیک‌های زیست فناوری ، جمع آوری نمونه های بیولوژیک گونه های مختلف، آماده سازی و نگهداری بلند مدت آن، ثبت ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض و استفاده از تکنیک های زیست فناوری برای حفظ، بقا و مدیریت گونه های جانوری و گیاهی به حفظ گونه های مهم و در معرض تهدید کمک نماید..

از طرف دیگر ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان و حفاظت و صیانت قانونی از حقوق ملی بر منابع ژنتیکی آبزیان این منطقه و همچنین معرفی

جمهوری اسلامی ایران به عنوان فوکال پوینت منطقه خلیج فارس به نقش کشورمان در پیش قدم بودن در این عرصه در بین دیگر کشور های منطقه اشاره دارد و میتواند دستاورد مهمی در منطقه برای کشور باشد.

۲-۱ -گونه های مورد مطالعه در تهیه بانک ژن

۱-۲-۱ – سفره ماهی (پُو) گزنده با نام علمی *Dasyatis bennetti* (Müller & Henle, 1841)

شکل ۱ : سفره ماهی (پُو) گزنده و نقشه پراکنش جهانی این گونه

- پهنای صفحه بدن تقریباً برابر طول آن.
- طول دم ۳ برابر طول صفحه بدن.
- دم دارای یک چین پوستی کوچک در طول سطح زیرین خود می‌باشد.
- پوزه کمی نوک‌دار.
- چشم‌ها به همدیگر نزدیک‌ترند تا به انتهای پوزه.
- دارای یک رنگ قرمز گوشتی کمرنگ است که در بعضی قسمتها تقریباً سفید رنگ می‌گردد؛ دم، در نزدیکی انتهای آن، تیره می‌شود.
- بیشینه عرض صفحه بدن: ۸۵ سانتی‌متر.

پراکنش: در سراسر محدوده ایرانی آبهای خلیج فارس و دریای عمان

۲-۲-۱ - گربه ماهی بزرگ با نام علمی *Netuma thalassina* (Rüppell, 1837)

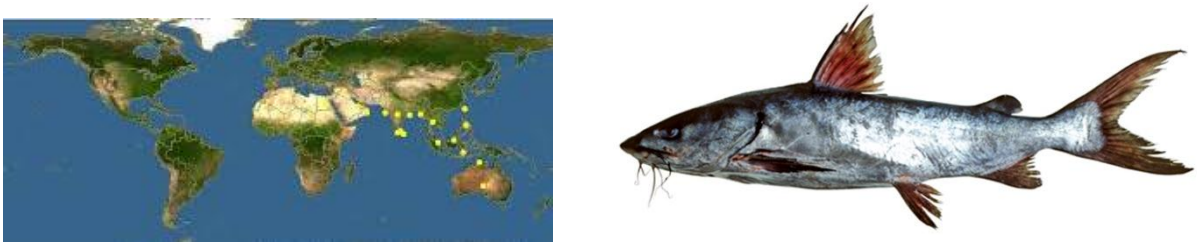
شکل ۲ : گربه ماهی بزرگ و نقشه پراکنش جهانی این گونه

- بدن کشیده. پوزه نوک تیز، آرواره‌های بالا و پایین تقریباً مساوی.
- دندان‌های کامی پرز مانند بوده و بر روی سه قطعه که مجموعاً یک سه گوش را در هر طرف تشکیل می‌دهند مجتمع هستند، قطعه عقبی طویلتر است. دارای یک خار قوی در ابتدای باله‌های سینه‌ای و اولین باله پشتی میباشد.
- تعداد کل شعاع‌های باله مخرجی ۱۵ تا ۱۸ عدد.
- رنگ بدن در نرها در قسمت پشت قهوه‌ای (قرمز) تیره تا خاکستری مایل به آبی که در قسمت شکمی شامل رنگدانه‌های متراکم است؛ ماده‌ها بطور یکدست خاکستری یا تیره هستند.
- بیشینه درازای بدن: ۱۸۵ سانتی‌متر.

پراکنش: در سرتاسر دریای عمان و در قسمت شرقی خلیج فارس تا بندر بوشهر. سپر سر ریز دانه می باشد. ختم شیار سر dorsomedial مارجین توسط "V" تشکیل شده توسط frontals ؛ روند supraoccipital یک مثلث گسترده با طرف راست و یا محدب است. اندازه: حداکثر طول استاندارد ۱.۳ متر.زیستگاه: آبهای ساحلی از نزدیک ساحل به حاشیه فلات قاره. رژیم غذایی به طور عمده فرصت طلب و گوشتخوار، از سخت پوستان، ماهی مرکب، و ماهی به ریزه، خارپوستان، amphipods، شن و ماسه و گل و لای.

گونه های دریایی اغلب در مصب رودخانه ها پیدا شده است، اما به ندرت وارد آب شیرین میشوند.. بیشتر به صورت خشک شده به بازار عرضه میشوند.

۳-۲-۱ - گربه ماهی پوزه گِرد با نام علمی *Netuma bilineata* (Valenciennes, 1840)



شکل ۳ : گربه ماهی پوزه گِرد و نقشه پراکنش جهانی این گونه

- بدن کشیده. پوزه گِرد، آرواره‌های بالا و پایین تقریباً مساوی.
- دندان‌های کامی پرز مانند بوده و بر روی سه قطعه که مجموعاً یک سه گوش را در هر طرف تشکیل می‌دهند مجتمع هستند، قطعه عقبی طویلتر میباشد. یک خار قوی در ابتدای باله‌های سینه‌ای و اولین باله پشتی وجود دارد.تعداد کل شعاع‌های باله مخرجی ۱۵ تا ۱۸ عدد.
- رنگ بدن در نرها در قسمت پشت قهوه‌ای (قرمز) تیره تا خاکستری مایل به آبی که در قسمت شکمی شامل رنگدانه‌های متراکم است؛ ماده‌ها بطور یکدست خاکستری یا تیره هستند.
- بیشینه درازای بدن: ۱۸۵ سانتی‌متر.

پراکنش: در سرتاسر دریای عمان و در قسمت شرقی خلیج فارس تا بندر بوشهر.

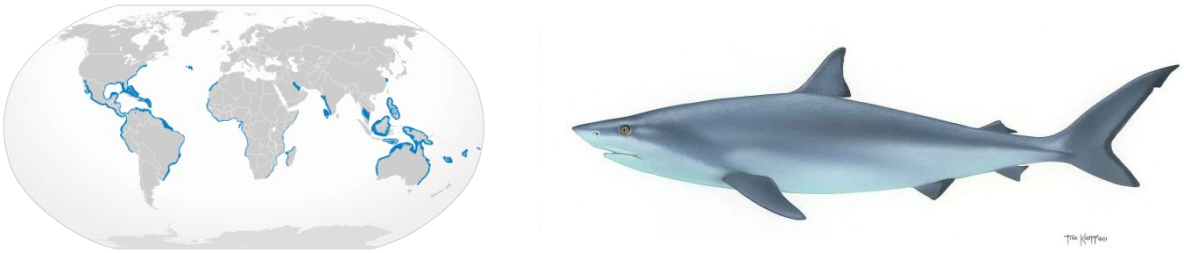
ساکن آبهای ساحلی، از مصب بر روی فلات قاره. عمدتا فرصت طلب و گوشتخوار؛ تغذیه در جوجه تیغی های دریایی، سخت پوستان، ماهی، میگو، سر چین و چروک سپر یا دانه،

رنگ قرمز مایل به قهوه ای بدن یا مایل به آبی، با رنگین کمان برنز بیش پشت و دو طرف باله قهوه ای تیره.

اندازه: حداکثر طول استاندارد ۶۲ سانتی متر است. زیستگاه آبهای ساحلی از مصب بر روی فلات قاره بیرونی.

رژیم غذایی به طور عمده فرصت طلب و گوشتخوار، از جمله جوجه تیغی های دریایی، سخت پوستان، ماهی، میگو.

۴-۲-۱ - کوسه ماهی شبه دندان نما با نام علمی *Carcharhinus leucas* (Müller & Henle, 1839)



شکل ۴ : کوسه ماهی شبه دندان نما و نقشه پراکنش جهانی این گونه

تشخیص: پوزه کوتاه، گسترده و بی پرده، چشم کوچک و مثلثی دندان های بالایی لبه دار، و عدم خط الراس interdorsal، شخصیت های که به تشخیص این گونه (کد عکس ۲۶،۹۳۸) کافی است. توضیحات: carcharhinid بزرگ است که با بدن عظیم خود، پوزه بسیار کوتاه و گرد و کوچک .دندان ها در فک فوقانی راست قامت، به شدت دندانه دار، مثلثی میباشند.

شکاف آبشش جانبی و خلفی با هم تداخل دارند و باله پشتی دوم بسیار کوچکتر از اول میباشد،

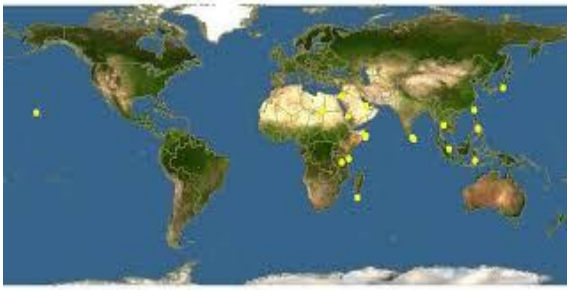
رنگ: رنگ بدن عمدتا خاکستری رنگ پریده و بخش زیرین سفید است.

پراکنش: در آب های گرمسیری و نیمه گرمسیری و اقیانوس اطلس غربی ماساچوست، ایالات متحده به آرژانتین. کوسه ساحلی و آب شیرین ساکن آبهای کم عمق به ویژه در خلیج، مصب رودخانه ها و تالاب های ساحلی قادر به حرکت به فاصله های بسیار دور (تا ۱۸۰ کیلومتر در ۲۴ ساعت)، بالغین اغلب در نزدیکی مصبها و جریان های آب شیرین به دریا پیدا شده است.

تغذیه: از ماهیان استخوانی، دیگر کوسه ها، میگو آخوندک، خرچنگ، ماهی مرکب، حلزون دریایی، جوجه تیغی های دریایی، مردار پستانداران، لاک پشت های دریایی، بچه زا می‌باشد.

استفاده تازه، باله تازه منجمد و یا دودی برای مصرف انسان، برای تهیه سوپ، چرم، بسیار مقاوم و در اسارت زندگی می کند این کوسه بزرگ به طور بالقوه برای انسان خطرناک است، احتمالا گونه خطرناک ترین کوسه های گرمسیری بارها و بارها در حمله به انسان دخیل بوده اند.

۵-۲-۱ - زمردماهی نوار اُریب با نام علمی *Choerodon robustus* (Günther, 1862)



شکل ۵ : زمردماهی نوار اُریب و نقشه پراکنش جهانی این گونه

- بدن دوکی شکل و مرتفع، کمی از طرفین فشرده؛ طول استاندارد بدن ۲/۴ تا ۲/۶ برابر ارتفاع آن.
- مجموع خارهای باله پشتی ۱۳ و شعاع‌های نرم آن ۸ عدد.
- باله مخرجی واجد ۳ خار، و ۱۰ عدد شعاع نرم.
- سر و ناحیه پشتی بدن، قهوه‌ای تیره، ناحیه شکمی و عقبی قهوه‌ای روشن تا خرمایی، نواری اریب که از قاعده باله سینه‌ای شروع شده و تا ساقه دمی امتداد می‌یابد، نواحی پشتی و شکمی را از هم مجزا می‌کند؛ این نوار در نرها زرد رنگ و در ماده‌ها سفید رنگ است.
- بیشینه درازای بدن ۲۸ سانتی‌متر.
- بصورت انفرادی در اعماق ۴۰ تا ۷۰ متری زیست کرده و در مناطق صخره‌ای و مرجانی خلیج فارس و دریای عمان یافت می‌شود. بیشتر از طعمه‌های دارای پوشش سخت شامل سخت‌پوستان، نرمتنان و توتیای دریایی تغذیه می‌کند. معمولا با قلاب صید شده و بصورت تازه عرضه می‌گردد. کیفیت گوشت آن عالی است.
- معمولا بصورت انفرادی زندگی کرده و در مناطق صخره‌ای و مرجانی عمیق‌تر (۴۰ تا ۷۰ متر) یافت می‌شود. به طور عمده از طعمه‌های دارای پوسته سخت مانند سخت پوستان، نرم تنان و توتیاهای دریایی تغذیه می‌کند.
- انتشار آن در آبهای اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام شامل دریای سرخ، خلیج فارس به سمت جنوب تا موزامبیک و جزیره موریس و همچنین اندونزی و جنوب ژاپن می‌شود.

۶-۲-۱ - کفشک پر لکه نام علمی *Pseudorhombus pentophthalmus*

شکل ۶ : کفشک پر لکه و نقشه پراکنش جهانی این گونه

فرم و رنگ بدن : بدن بیضی شکل و نسبتا کوتاه و چشم در طرف راست بدن قرار دارد.رنگ بدن خاکستری یا قهوه ای با لکه های درشت و نامشخص در طرف چشم دار ،طرف بدون چشم زرد و خیلی کمرنگ است و رنگ باله سینه ای که در طرف چشم دار قرار دارد سیاه رنگ می باشد.

باله ها: باله های پشتی ،دمی و مخرجی به هم ملحق شده اند .باله های سینه ای به خوبی رشد کرده اند ،باله پشتی دارای ۶۵ شعاع نرم و باله مخرجی دارای ۵۳ شعاع نرم است.

فلس : خط جانبی مستقیم و دارای ۷۵ عدد فلس و فلسهای هر دو طرف بدن از نوع شانه ای است.

دندان : فک بالایی کمی جلو آمده ،دهان کوچک ،انتهایی و اندکی تحتانی که غالبا به وسیله زوائد گوشتی پوزه احاطه می شود. فکها و تشکیلات دندانی به شدت بر روی پهلوی بدون چشم توسعه یافته اند،دندانها در هر دو فک کوچک و رشته ای شکل هستند.

طول :حداکثر اندازه به ۲۴cmمی رسد

سایر مشخصات : دهانه های آبششی محدود و پرده های آبششی در زیر شکم به هم متصل است و به کمربند کتفی در سطح پشتی متصل می شوند لبه پیش سرپوش آبششی به وسیله پوست و فلسها پوشیده شده است.

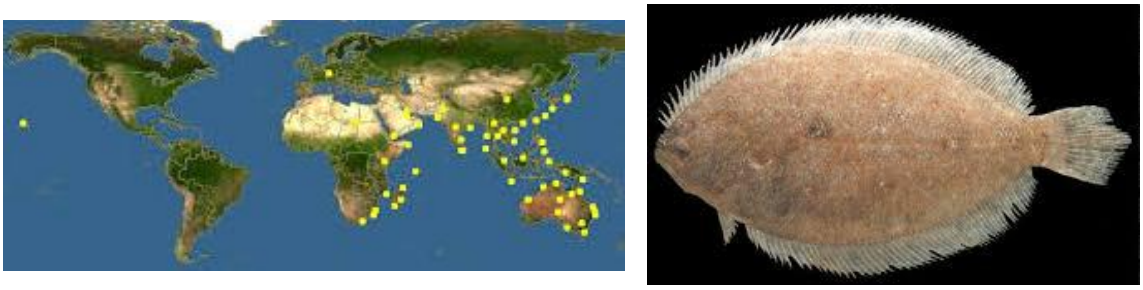
مشخصات بیولوژی

مکان زندگی :کفزی بوده و در سواحل با بستر شنی یا گلی زیست می کند و این ماهیها می توانند الگوی رنگ خود را تغییر بدهند و با رنگ محیط اطراف خود را تطبیق نمایند و همچنین مجددا به حالت اولیه خود بر گردند.

تغذیه : تغذیه از بی مهره گان کفزی است و این ماهیها قادرند از سخت پوستان ریز و میگوها تغذیه نمایند.

تولید مثل: جزءگروه ماهیان تخمگذار می باشند.

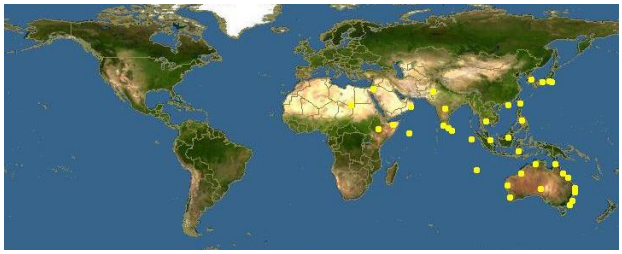
۷-۲-۱ - کفشک پهن چپ‌رُخ با نام علمی *Pseudorhombus arsius* (Hamilton, 1822)



شکل ۷ : کفشک پهن چپ‌رُخ و نقشه پراکنش جهانی این گونه

- شکل بدن بیضی و مسطح است. هر دو چشم در سمت چپ.. باله مخرجی با بیش از ۵۳ اشعه بوده و خط جانبی منحنی بالا در باله سینه ای.
- **رنگ:** لکه سمت چشم با یک الگوی متفاوت از لکه های قهوه ای اما همیشه یک خال بزرگتر در انتهای قدامی سر میباشد.
- برخی جفت دندان نیش نسبتا بزرگ در قسمت قدامی هر دو فک، ۶ تا ۱۳ دندان لترال در فک پایین تروقوی تر و بسیار گسترده از فک بالا.
- در آبهای کم عمق و مصب رودخانه ها ، در گل و لای و شن و ماسه، و تا عمق ۲۰۰ متر نیز زندگی میکنند .

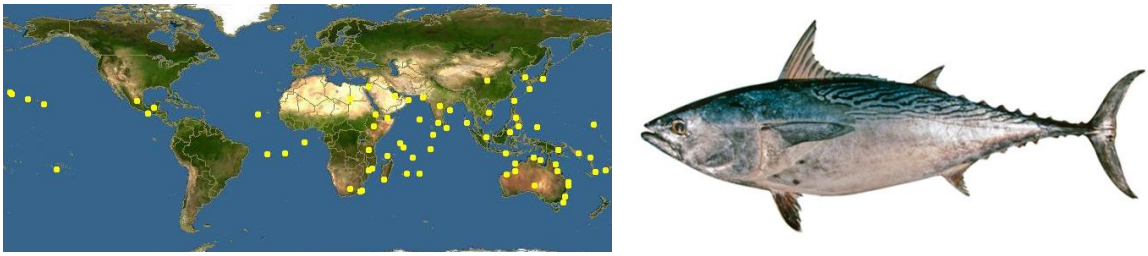
۸-۲-۱ – هوور معمولی با نام علمی *Thunnus tonggol*（Bleeker, 1851）



شکل ۸ : هوور معمولی و نقشه پراکنش جهانی این گونه

تعداد خارهای آبششی روی اولین کمان آبششی ۱۹ تا ۲۷ عدد است و دو باله پشتی از یکدیگر جدا بوده و فاصله کمی از یکدیگر دارند. اولین باله پشتی این آبزی دارای ۱۲ تا ۱۳ شعاع سخت و دومین باله پشتی دارای ۱۴ شعاع نرم، باله سینه‌ای دارای ۳۰ تا ۳۵ شعاع نرم می‌باشد که شعاع‌های اول کوتاه بوده و بتدریج در انتها دراز می‌شوند، به دنبال باله پشتی دوم ۱۰ عدد دنبالچه و در عقب باله مخرجی ۸ عدد بالچه وجود دارد. ساقه دمی باریک و مجهز به یک سکان عرضی قوی و نیز در بین آنها دو سکان عرضی کوچکتر می‌باشد. فاقد کیسه شنا است. رنگ بدن در پشت آبی تیره تا سیاه، پهلوها و شکم نقره‌ای با خال‌های بیضوی کشیده و بی رنگ در ردیف‌های افقی می‌باشد.

۹-۲-۱ - زرده با نام علمی *Euthynnus affinis* (Cantor1849)



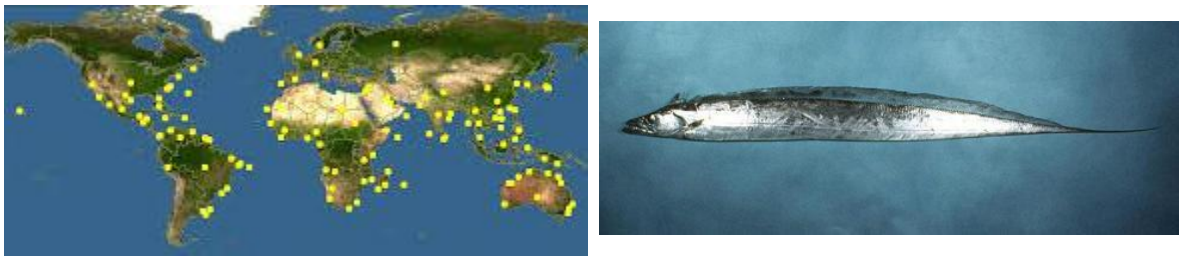
شکل ۹ : زرده و نقشه پراکنش جهانی این گونه

اندازه : حداکثر اندازه بدن ۱۰۰ و به طور متوسط تا ۶۰ سانتی متر می‌رسد.

مشخصات : بدن قوی و کشیده و دوکی شکل، فک‌ها دارای یک ردیف دندان تیز مخصوص تغذیه گوشتخواری و سقف دهان و تیغه ومر نیز دارای دندان‌هایی می‌باشند. فاصله بین دو باله پشتی بیشتر از قطر چشم نیست، باله پشتی اول دارای ۱۱ تا ۱۴ شعاع سخت و دومین باله پشتی دارای ۱۰ تا ۱۳ شعاع نرم، کمان آبششی اول دارای ۲۹ تا ۳۴ غدد خار آبششی، ۸ تا ۱۰ دنبالچه به دنبال باله پشتی دوم و ۶ بالچه به دنبال باله مخرجی، ساقه دمی باریک ودر هر طرف دارای یک سکان عرضی بین دو سکان عرضی کوچکتر می‌باشد. بدن به جزدر قسمت زره سینه‌ای و خط جانبی بدون فلس است. رنگ بدن در پشت آبی تیره با نقش و خطوط پیچیده‌است و این نقش در فاصله‌ای تمام می‌شود که از آغاز قاعده باله اول پشتی تجاوز نمی‌نماید، پهلوها و شکم سفید نقره‌ای است چند لکه تیره مشخص بین قاعده باله سینه‌ای و قاعده باله شکمی دیده می‌شود که همیشه واضح نیست.

زیست شناسی : گونه‌ای اپی پلاژیک نریتیک است و در آب‌هایی با درجه حرارت ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد زیست می‌کند. انواع این گونه معمولاً در گله‌های ماهیانی چون *Thunnus albacares, Katsuwonus pelamis, Auxis thazard, Megalaspis cordyla* دیده می‌شوند، این گونه یک ماهی غارت گر است و از ماهی، میگو و سر پایان تغذیه می‌نماید، در حالی که خود طعمه کوسه و نیزه ماهی است. اغلب به صورت دستجات بزرگ حرکت می‌کنند.

۱۰-۲-۱ - یال اسبی با نام علمی *Trichiurus lepturus*



شکل ۱۰ : یال اسبی و نقشه پراکنش جهانی این گونه

ماهی یال اسبی (Trichiurus lepturus) یکی از مهمترین ذخایر آبزیان خلیج فارس و دریای عمان می باشد که نیاز به شناخت بیشتر در زمینه های زیستی و محیطی دارد.

فصل صید فصل صید ماهی یال اسبی که زیستگاه و صید گاه آن در استان بوشهر و منطقه مطاف شهرستان دیراست از اردیبهشت ماه شروع می شود و تا شهریور ماه ادامه دارد .تمرکز پراکنش در اقیانوس اطلس و آرام میباشد . بدن این گونه بشدت کشیده و فشرده و فاقد فلس میباشد.چشما تقریبا درشت میباشد. استخوان فکی توسط استخوان پیشین چشمی پوشیده شده و ارواره ها اغلب دارای دندانهای نیش میباشند. طول بدن به ۱۲۰ سانتیمتر میرسد ، باله پشتی بسیار کشیده در طول بدن که بخش دارای شعاع نرم آن اغلب باند تر از بخش سخت آن میباشدودارای ۵۸ تا ۱۰۹ مهره هستند و در آبهای ساحلی تا عمق ۱۰۰ متر یافت میشوند. تغذیه آنها اغلب از سخت پوستانو ماهیان کوچک میباشد. صید آنها از طریق تور های کیسه ای در مصب هاو بصورت تور گردان و تور ترال میان آبی در آبهای دور از کرانه میباشد.ماهی یال اسبی به علت نداشتن فلس مصرف داخلی ندارد و به منظور استفاده صنعتی و خوراکی به کشورهای چین، کره، ژاپن و دیگر کشورهای جنوب شرقی آسیا صادر می شود.

وجود ذخایر قابل توجه یال اسبی در آبهای هرمزگان ارزش صادراتی و ارزآوری قابل توجه آن هدفمند کردن صید ترال در جهت کاهش صید ضمنی اختصاصی کردن صید یال اسبی و همچنین ایجاد اشتغال در منطقه را از مهمترین دلایل صید این گونه است. ذخایر ماهی یال اسبی بعنوان یکی از مهمترین منابع پروتینی دریایی در تمام آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنش دارد. ماهی یال اسبی جزو گونه‌های کمتر برداشت شده است که بمنظور کاهش فشار بر ذخایر دیگر گونه های آبزی صید می شود که می تواند علاوه بر اشتغالزایی ارزآوری نیز داشته باشد. هرمزگان با صید سالانه ۱۴۰ هزارتن آبزی رتبه اول صید کشور را دارد.

۳-۱ - تکنیکهای مولکولی و کاربرد آنها جهت بررسی جمعیتها و تکثیر و پرورش آبزیان

کاربرد وسیع تکنیکهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی یا تنوع جمعیتی در مقایسه با سایر روشهای معمول و کلاسیک نشان دهنده مزایای این تکنیکها می‌باشد. به علت نشان دادن تنوع و تفاوتهای بیشتر و نیز عدم تأثیر عوامل محیطی بر نتایج این تکنیک این روش و تکنیک را متمایز ساخته است. روشهای مولکولی بخاطر اینکه دارای قدرت تمایز بالاتر بوده و عوامل محیطی تاثیری در نتایج بکارگیری این شیوه‌ها ندارد مورد توجه محققین زیادی در دنیا قرار گرفته‌اند .

عملکرد و فعل و انفعالات طبیعی سلولی در محیط زیست ممکن است در نتیجه موتاسیونها یی باشد که در ارگانیسم رخ میدهد که این امر منجر به ایجاد اختلافات ژنتیکی یا همان پلی مورفیسم میگردد.

تنوع درترکیب ژنتیکی موجود ممکن است در اثر انتخاب یا رانش ژنتیکی باشد. این گونه تنوع های ژنتیکی میتواند در اندازه های گوناگونی از جمله در بین نمونه ها ، گونه ها و رده های بالاتردرطبقه بندی موجود رخ دهد.

برای آنکه روند ایجاد تنوع حالتی سودمند بخود بگیرد ، میبایست این تنوع قابل توارث بوده و به راحتی توسط محقق از طریق شناخت تنوع فنوتیپی و یا از طریق استفاده ار تکنیکهای ملکولی قابل ردیابی باشد.
(Liu and Cordes, 2004)

در ماهی و دیگر گونه های مهم در تکثیر و پرورش ، مارکر های آلوزایمی در جهت شناخت مولدین بصورت گسترده ای مورد استفاده قرار میگرفت .(Kucuktas & Liu, 2007).(الوزایم ها فرم هایی از آلل های اختصاصی از آنزیم های مشابه هستند که درجایگاه های ژنی یکسان واقع شده اند.(Parker et al 1998; May 2003) . با این وجود، با پیشرفت تکنیک های جدید ، مخصوصا تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، مارکر های دیگری بصورت کامل جایگزین تکنیک استفاده از مارکر های آلوزایمی گردید. این مارکرها اطلاعات غیر قابل تصورو ارزشمندی را برای استفاده در جنبه های مختلف تکثیر و پرورش آبزیان در اختیار محققین قرار داد. این اطلاعات شامل شناسایی و تفکیک ژنتیکی ذخایر ، برنامه های به گزینی مولدین و اندازه گیری میزان تغییرات کروموزومی و ژنتیکی در زمینه های القاء پلی پلوییدی در مولدین بوده است (Ferguson, 1994) .

انواع مختلفی از مارکرهای ملکولی هم اینک بصورت گسترده درتعین ژنتیک آبزیان مورد استفاده قرار میگیرند.

این مارکر ها شامل Mitochondrial DNA (mtDNA) ، Randomly Amplified Polymorphic DNA یا RAPD ، Amplified Ffragment Length Polymorphism یا AFLP ، Restriction Fragment Length Polymorphism یا RFLP و در آخر مارکرهای میکروساتلایت قرار میگیرند که این مارکرها تنوع را بصورت گسترده تری نشان میدهند. (Liu and Cordes, 2004).

مارکر های ملکولی بصورت عمده در دوگروه قرار میگیرند. گروه اول شامل مارکرهایی هستند که نقاط خاصی از ژنوم موجود را با فعالیت مشخص پوشش داده و ردیابی میکنند (مارکر های نوع ۱) ، ودیگر مارکر ها آنهایی هستند که نقاطی از ژنوم را با فعالیت نامشخص پوشش میدهند و در اصطلاح به آنها مارکرهای راندم میگویند.(مارکر های نوع ۲) .(Liu and Cordes, 2004) .

بر پایه این طبقه بندی ،مارکر های RFLP در گروه اول قرار میگیرند زیرا نقاط خاصی از ژنوم موجود را با استفاده از آنزیمهای محدود الاثر را میتوان ردیابی کرد. مشخصا مارکر های آلوزایمی هم در این گروه قرار میگیرند. زیرا پروتیین هایی را با عملکرد مشخص ردیابی میکنند (Liu and Cordes, 2004) .

مارکر های RAPD در گروه دوم از این طبقه بندی قرار میگیرند زیرا باندهای RAPD با استفاده از عمل PCR از نقاط غیر مشخص از ژنوم موجود بدست آمده و بصورت اتفاقی ردیابی شده اند. مارکر های میکروساتلایت هم در گروه دوم از این طبقه بندی قرار میگیرند مگر اینکه ژنی را با عملکرد مشخص ردیابی نمایند. مارکر های AFLP نیز از انجا که نقاط غیر مشخصی از ژنوم موجود را شناسایی و ردیابی میکنند در گروه دوم قرار میگیرند . (Liu and Cordes, 2004)

در مقایسه با مارکرهای RAPD ، مارکرهای AFLP قدرت بالاتری را در تفکیک ژنومی موجود از خود نشان میدهند زیرادر تکنیک استفاده از روش AFLP به هیچ تاریخچه و اطلاعات قبلی از ژنتیک موجود احتیاج نداشته وکمبود نتاج در بررسی ژنومی موجود تاثیر آنچنانی ندارد.

Kai et al. (2002) از ۱۴ مارکر AFLP جهت تفکیک ۳ مورفوتایپ از ماهی صخره ای سیاه که از لحاظ رنگ با هم اختلاف داشتند سود برد.

جدول ۱ : -خلاصه ای از ابزارهای ژنتیکی موجود و قدرت کارایی آنها (نوروزی ، م، ۱۳۸۶)

تکنیک	Allozyme	Microsatellite	mt DNA
شناسایی فردی	++	+++	+
خویشاوندی	++	+++	+
ژنتیک جمعیت	+++	+++	++
ذخایر	++	+++	+++
بین گونه های خویشاوند نزدیک	++	+	+++
شناسایی گونه ها	++	+	+++
نسبتهای فیلوژنتیک	+	-	+++

۱-۳-۱ - تکنیک PCR (Polymerase chain reaction)

PCR روشی است که در آن یک قطعه خاصی از DNA در داخل لوله آزمایش و در شرایط کاملاً آزمایشگاهی تکثیر می شود. این روش که از کارایی بسیار بالایی برخوردار می باشد در سال ۱۹۹۸ توسط کری مولیس (Kary mullis) معرفی شد. در این روش بکارگیری آنزیمهایDNA polymerase جهت شروع و ادامه گپی برداری از قطعات معین شده ژنوم و یا قطعات نا معین از ژنوم که بستگی به اختصاصی بودن آغاز گرما داردضروری می باشد. با این روش مقدار DNA ساخته شده بصورت تصاعدی افزایش می یابد بطوری که پس از تکرار دوره‌های حرارتی مقدار DNA بسته به تعداد دوره‌های تکرار شده افزایش میابد.

n– تعداد دوره‌های حرارتی تکرار شده

جهت سنتز DNA و آغازگر بکارمی رود که از دو قسمت به دو رشته مقابل هم در DNA دو رشته ای متصل می شوند. واکنش PCR با حرارت دادن نمونه DNA دو رشته ای تا حدود ۹۵ درجه سانتی گراد شروع می شود با این عمل دو رشته DNA از همدیگر جدا می شوند. سپس درجه حرارت به منظور اتصال آغازگرها به توالی‌های معین از قطعه مورد تکثیر کاهش پیدا می کند . پس از این عمل آنزیم DNA polymerase جهت ساخته شدن رشته‌های جدید مورد استفاده آغازگرها قرار می‌گیرد. حاصل یک دوره از فرایند تکثیر شامل دو مولکول DNA از مولکول DNA الگو می‌باشد. این فرایند می تواند چندین بار تکرار شود و در هر بار تکرار دوره‌های حرارتی قطعات حاصل دو برابر مولکولهای مورد تکثیر اولیه خواهد بود (Copper, 1997).

۱-۱-۳-۱- مراحل انجام واکنش PCR

- مرحله واسرشته سازی (Denaturation):

چون سنتز DNA به وجود رشته‌های منفرد الگو نیاز دارد، لذا DNA باید در هر چرخه در درجه حرارت بالا واسرشته شود (حدود ۹۵ درجه سانتی گراد). این دما برای فایق آمدن بر پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها در دو رشته DNA لازم است .

- مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو (Annealing):

رشته‌های منفرد DNA چنانچه به آرامی سرد شوند مجدداً به همدیگر اتصال پیدا می کنند. در فرایند PCR هرآغاز پس از واسرشته شدن DNA الگو به توالی مکمل خود در رشته مخالف می چسبد.

آغازگرها طوری جهت گیری می کنند که تمام ناحیه بین آنها توسط آنزیم DNA polymerase تکثیر شود. در این صورت وقتی اتصال بازی بین توالی آغازگر و توالی مکمل آن در DNA الگو برقرار شود، oH – ′۳ در مقابل

همدیگر قرار خواهند گرفت . این موضوع ما را مطمئن می سازد که سنتز DNA از سمت هر آغازگری بسمت آغازگر مقابلش صورت خواهد گرفت.

دما، pH و غلظت نمک در مخلوط واکنش پیوستن آغاز گرها به DNA تک رشته ای را تسهیل می‌کنند.

- مرحله بسط یا تکثیر (Extention):

ایجاد رشته های جدید وابسته به میزان فعالیت آنزیم پلی مراز است. این آنزیم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بیشترین فعالیت را نشان می دهد. عواملی مثل کاتیونهای دو ظرفیتی (Mg2+) در فعالیت این آنزیم بسیار موثرند. مقادیر کم این کاتیونها مانع فعالیت مطلوب آنزیم می شود و افزایش بیش از حد آنها سبب اتصالات نابجا و گاهی اوقات عدم فعالیت آنزیم خواهد شد. آنزیم پلی مراز زمانی سنتز DNA را آغاز می کند که DNA به شکل دو رشته ای باشد (در امتداد آغازگرها). بدین ترتیب عمل سنتز از جایگاه های دو رشته ای به پیش می‌رود و رشته‌های جدید از جهت ´5 به سمت ´3 در امتداد DNA همانند سازی می شوند.

صحت نتایج PCR بستگی به انتخاب پرایمر مناسب دارد. پرایمرها قطعات کوچک پلی نوکلئوتیدی هستند و در آزمایشگاه به گونه‌ای طراحی و سنتز شده‌اند که دارای توالی نوکلئوتیدی مکمل با ناحیه ´۳ در مولکول DNA مورد نظر هستند. بنابراین بطور اختصاصی فقط به این مولکول ها متصل می شوند. چون آنزیم DNA پلیمراز به قطعات پرایمر متصل می‌شود، در نتیجه فقط مولکول DNA هدف همانند سازی و تکثیر می‌گردد. با اعمال تغییرات دمایی به طور متوالی و برنامه ریزی شده، روند PCR تکرار گردیده و در هر مرحله DNA دو برابر می-شود. بنابراین تعداد مولکول های DNA بصورت تصاعدی و به نسبت 2^n افزایش می‌یابد که n تعداد سیکل‌های دمایی است. تولید و افزایش زنجیره‌های جدید در روند واکنش تا سیکل سوم بصورت تصاعد حسابی و از آن به بعد تا سیکل آخر به شکل تصاعد هندسی است. مثلا یک مولکول DNA، پس از ۲۰ سیکل به ۱،۰۴۷،۵۸۶ مولکول تکثیر می‌شود.

در مرحله همانندسازی، برای جدا نگه داشتن دو رشته DNA، باید دمای محلول بالا باشد. بنابراین از یک نوع آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت استفاده می‌شود. اولین آنزیمی که بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت Taq polymerase بود که از باکتری *Thermus aquaticus* به دست می‌آید. مزیت Taq پلیمراز این است که باعث می شود PCR به صورت اتوماتیک انجام شود و با افزودن یکبار این آنزیم دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نباشد. مزیت بسیار مهم دیگر پلیمراز افزایش حساسیت و دقت PCR می‌باشد (گاون[1] و همکاران، ۲۰۰۴). سرعت و حساسیت زیاد و توانایی تولید مقادیر قابل توجه ماده ژنتیکی حتی از مقادیر کم و یا نامناسب ژنوم سلولی، از مزایای مهم روش PCR به عنوان یک روش تکثیر غیر سلولی ماده ژنومی است.

[1] Guven

محلول PCR حاوی مواد زیر است:

۱- DNA الگو: شامل DNA هدف است که تکثیر می‌گردد.

۲- پرایمرهای Forward و Reverse: به گونه‌ای طراحی شده‌اند که هر یک مکمل ناحیه ´۳ در یکی از رشته‌های DNA باشند. این پرایمرها دو کار انجام می‌دهند: الف: محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌کنند، ب: اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می‌کنند.

۳- Taq polymerase آنزیم مقاوم به دما است که عمل همانند سازیDNA را انجام می‌دهد.

۴- دزوکسی نوکلئوزید تری فسفاتها (dNTPs): به مانند مصالح ساختمانی که توسط DNA پلیمراز برای ساختن رشته های DNA جدید به کار می‌روند.

۵- محلول بافر: شرایط محیطی مناسبی را از نظر pH و یونهای مختلف ایجاد می‌کند تا پایداری DNA پلیمراز و فعالیت بهینه آن تأمین شود.

۶- کاتیونهای دو ظرفیتی: یونهای منیزیم

۲-۱-۳-۱ - آلودگی PCR و راه حل آن

یکی از مشکلاتی که ممکن است در PCR به وجود بیاید، آلودگی نمونه‌های مورد بررسی توسط قطعات DNA خارجی است. اگر قبلاً در داخل دستگاهی PCR یک نمونه انجام گرفته باشد و ذره کوچکی از آن در داخل دستگاه باقی بماند در PCR نمونه بعدی مشکل ایجاد خواهد کرد. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR، هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد. برای رفع مشکل امروزه از ظروف یکبار مصرف استفاده می‌شود. کلیه ظروف قبل از استفاده اتوکلاو می‌شوند تا سلول‌ها و مولکول های موجود در آنها، حتی‌الامکان غیر فعال شوند.

یکی از روش‌های پیشنهادی انجام PCR داخلی یا Nested PCR است. در این روش با استفاده از دو پرایمر قطعه‌ای از DNA را تکثیر می‌دهند و سپس قطعه‌ای دیگر در داخل DNA های تکثیر شده PCR می‌شود. بدین صورت احتمال آلودگی کاهش می‌یابد ولی با تمامی نکات گفته شده فوق برای جلوگیری از اشتباهات احتمالی در PCR همواره باید شاهدهای مثبت و منفی در هر سری از آزمایش ها وجود داشته باشند.

۲-۳-۱- توالی‌یابی

یکی از مهم ترین فناوری های در دسترس زیست شناسان مولکولی توالی‌یابی DNA است که در تحقیقات مولکولی، برای تعیین ترتیب دقیق بازها در مورد DNA یا اسیدهای آمینه پروتئین استفاده می شود. اطلاعات به دست آمده می‌تواند در تعیین و شناسایی عملکرد نمونه DNA یا پروتئین جداسازی شده کمک نماید. توالی‌یابی

اخیراً به عنوان تکنیکی از دانش بیولوژی مولکولی در آمده که سریعاً در حال پیشرفت است به طوری که اخیراً در بیشتر آزمایشگاه ها بر اساس اطلاعات حاصل از آن نشانه گذاری رادیواکتیو، الکتروفورز نمونه ها بر ژل‌های پلی اکریل آمید و سپس تجزیه و تحلیل اتو رادیوگراف ها انجام می‌شود (قرایی و غفاری، ۱۳۹۰). بر اساس اصول توالی‌یابی DNA دو روش عمده توالی‌یابی تقریباً به طور هم زمان ابداع شده اند که از اصلی ترین روش های توالی یابی می باشند. روش خاتمه زنجیره توسط فرد سانگر[1] و همکاران (Sanger et al.1975) در بریتانیا و روش تجزیه شیمیایی توسط ماکسام و گیلبرت[2] (Maxam and Gilbert 1997) در ایالات متحده آمریکا ابداع گردید .

آنزیم‌های پلی مراز جهت ساخت یک پلی نوکلئوتید به بخشهای دو رشته‌ای دارند که بتوانند با الگو گیری از رشته طویلتر از قسمت ´3-´5 قطعه کوچکتر را کامل نمایند. این قطعه کوچکتر که دارای دو انتهای ´5 و ´3 که از طرف ´5 بسته شده است و توان اتصالی به نوکلئوتید مجاور را از دست داده است آغازگر نامیده می شود. طراحی صحیح و استفاده مناسب با غلظتهای حساب شده از این آغازگر می‌تواند زمینه موفقیت در دست یابی به محصول PCR را افزایش دهد. بصورتیکه اگر آغازگرها بطور صحیحی طراحی شوند، آزمایش منجر به تکثیر یک قطعه منفرد DNA، معادل با ناحیه هدف در مولکول الگو خواهد شد. در صورتیکه اگر آغازگرها بطور نامناسب طراحی شوند آزمایش منتج به نتیجه مطلوب نخواهد شد.

جهت طراحی پرایمر ها نیازی به آگاهی از توالی قسمت مورد نظر در رشته الگو بوده و آغازگرها طوری طراحی می شوند که با رشته الگوی خودشان مکمل باشند تا دو رگ سازی بطور صحیح انجام شود.

همچنین بایستی توجه داشت قسمتهای ابتدایی هر پرایمر (´5) بایستی فاقد خاصیت و قدرت اتصال در طراحی بوده و قسمتهای ´3 در آغازگر به سمت همدیگر انتخاب شوند. مطلوبترین نتایج زمانی بدست می آید که قطعه مورد نظر کمتر از یک کیلو باز باشد زیرا هر چه قطعات بزرگتر باشند کارایی کمتری در تکثیر دارند و اشکالات بیشتری در بدست آوردن نتایج مناسب وجود خواهد داشت.

آغازگرهایی که در حدود (۲۰–۱۸) نوکلئوتید می باشند جهت انجام واکنش مناسبتر از انواعی با تعداد نوکلئوتید پایین‌تر می باشند زیرا در آغازگرها با طول کوتاه امکان اتصال با ناحیه غیر هدف زیادتر بوده و امکان تولید فراورده‌های نامطلوب بیشتر خواهد بود.

همچنین در آغازگرهای با طول بیشتر امکان برقراری اتصالات کمتر و با نسبت کندتری اتصالات برقرار می‌شود.تا حد ممکن در طراحی آغازگرها بایستی دقت شود تا آغازگرها تعداد مساوی از هر چهار باز را داشته باشند و همچنین جهت برقراری اتصالات قوی تر حداقل به میزان ۵۰٪ شامل نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین

[1] Sanger
[2] Maxam and Gilbert

باشند. همچنین تا حد امکان بایستی سعی شود تا از انتخاب آغازگرهایی که انتهای ´3 آنها دارای نوکلئوتیدهای مکمل باشد خودداری شود و نیز به منظور عدم وجود اتصالات بین پرایمر ها و دورگ شدن آنها بایستی سعی شود درصد دایمر شدن پرایمرها نیز به حداقل رسانده شود.

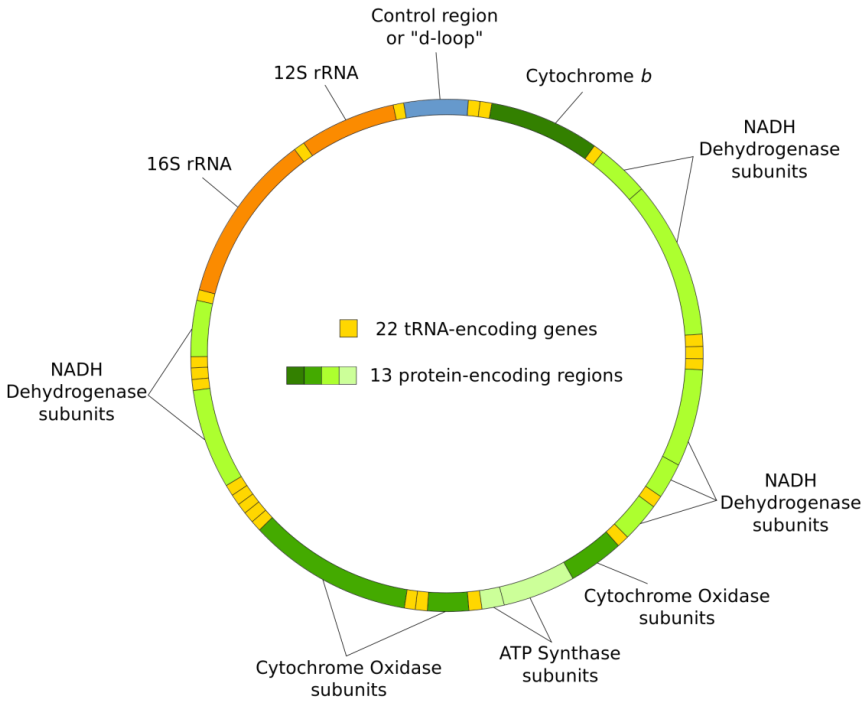
۳-۳-۱- mtDNA ژنوم میتوکندریایی و کاربرد آن

بررسی‌های mtDNA کاربردهایی را در زیست شناسی و مدیریت صید و ارتباط فایلوژنی و تهیه بانک ژن دارد که از جمله می توان به بررسی تغییرات درون و بین جمعیتی افراد در سطح گونه و جنس و همچنین مطالعات تاکسونومی و رده بندی اشاره نمود. مطالعات mtDNA می‌تواند در شناسایی ذخایر ماهیان نیز به کار رود و همچنین اطلاعاتی را برای بررسی دو رگه‌گیری و هم‌آمیزی ژنتیکی ماهیان فراهم آورده و به عنوان نشانگر ژنتیکی در حفاظت و احیای گونه‌های ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. در برنامه های بازسازی ذخایر نیز که بر برنامه‌های رهاسازی استوارند، تنوع mtDNA برای ارزیابی بقا و رشد ماهیان رها سازی شده استفاده می شود و به کمک آن می توان ماهیان ساکن و ماهیان رهاسازی شده را تفکیک و شناسایی نمود (Billington and Hebert 1991). متداول‌ترین نشانگرهای مولکولی که در سطح mtDNA استفاده می شوند شامل 16SrRNA، 12SrRNA، COI، ژن سیتوکروم b و ناحیه کنترلی (D-Loop) هستند. مطالعات نشان می‌دهد که ناحیه 16SrRNA دارای یک سرعت پایین تکاملی است بدین معنی که برای تفاوت‌های بین گونه‌ای بیشتر از درون گونه‌ای مفید است 16SrRNA برای بررسی روابط فیلوژنتیک ماهیان در ژن سطوح مختلف طبقه بندی استفاده شده است که عمدتاً به این دلیل است که این ژن بسیار حفاظت شده بوده و یک تکامل تدریجی و آهسته دارد. از دیگر علل انتخاب این ژن بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول است (Page and Holmes1998). امروزه کاربرد توالی یابی mtDNA در بررسی روابط شجره شناسی ماهیان از زمینه‌های تحقیقاتی مهم محسوب می‌شود. نوع توالی مورد استفاده به سطح شجره شناسی فرضیه مورد آزمون بستگی دارد، توالی های با سرعت تکامل متوسط (مانند سیتوکروم b) برای بررسی روابط بین جنس ها استفاده می شوند و برای مقایسه در سطح خانواده‌ها، ژن‌های دارای سرعت تکامل کند مانند ژن‌های 12S و RNA 16S ریبوزومی و COI را می‌توان استفاده نمود (Stepien and Kocher 1997).

عموما mtDNA ماهیان هوموپلاسمیک است به این مفهوم که تمامی مولکول‌های یک موجود با هم مشابه می-باشند و از این رو می‌توان هر بافتی را به عنوان منبع DNA در تهیه بانک ژن به کار برد. mtDNA هر سلول در چند نسخه وجود دارد و بنابراین جداسازی و تخلیص آن نسبتاً آسان است (برون، ۱۹۸۳). سه ویژگی mtDNA جانوری آن را به نشانگر ژنتیکی کارامدی برای بررسی های سیستماتیک مولکولی، ژنتیک جمعیت و بررسی روابط شجره‌ای گونه‌های خویشاوندِ نزدیک، مبدل کرده است. این ویژگی ها عبارتند از تعداد زیاد نسخه به ازای هر

سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن و عدم وجود نوترکیبی در آن. همچنین از امتیاز دیگر DNA میتوکندریایی این است که سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است. بنابراین mtDNA شامل تنوع بیشتری در توالی بازهای آلی است که در نتیجه تشخیص گونه‌های کاملاً وابسته را امکان پذیر می‌کند (Naderi et al.2007).

ژنوم میتوکندریایی یا mtDNA به طور گسترده ای در بررسی جمعیت های گونه های مختلف آبزیان مورد استفاده قرار می گیرد و کارایی خوبی در بررسی تنوع ژنتیکی و جداسازی جمعیت ها دارد. ژنوم میتوکندری از طریق مادری به ارث میرسد و بنابراین پدیده کراسینگ اور و نوترکیبی در آن صورت نمی گیرد. این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است و از این رو برای تشخیص گروه هایی از موجودات که برای سالها از هم جدا بوده اند نشانگر خوبی می باشد (Berrebi). ژن 16sRNA یکی از نواحی بسیار متغیر در ژنوم میتوکندریایی می باشند که می توان با استفاده از تکنیک توالی یابی این ناحیه تنوع ژنتیکی را بررسی نمود.



شکل ۱۱ : نحوه قرار گرفتن ژنها در DNA میتوکندری (Alexeyev et al., 2004).

توالی یابی ژنوم میتو کندریایی (mtDNA sequencing) یکی از پرکاربردترین روشها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی (شجره شناسی ژنتیکی) و فیلوژئوگرافی (شجره شناسی جغرافیایی) بین جمعیت ها و گونه های نزدیک به هم محسوب می شود (Bruford et al.2003). توالی یابی میتوکندریایی با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی های مختلف تعیین می گردد. ژنوم میتو کندری هر گونه از بی مهرگان که تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته است با گونه دیگر متفاوت بوده است. همه این تنوع ها منعکس کننده تکامل میتوکندری در موجودات بوده و می توان نحوه تکامل موجودات را با استفاده از توالی یابی ژنوم میتوکندری آنها بررسی نمود (Tjensvoll 2008). روشن است که در بسیاری از گونه های ماهیان mtDNA دارای تغییرات قابل ملاحظه ای بوده و این تغییرات را می توان مبنای تفکیک ذخایر قرار داد (Brown 2008).

۴-۱- بانک ژن

مشهورترین پایگاه داده های توالی نوکلئوتیدی و مستندات مربوط است که به عنوان بخشی از کتابخانه ملی پزشکی (Library of Medicine National) در سال۱۹۸۲ پایه گذاری شد.

به دلیل تسلیم انواع داده‌های ژنومی، رشد اطلاعات در این بانک بسیار سریع است به طور میانگین، ماهانه ۳ میلیون توالی و ۱۴۰۰ گونه جدید به این بانک اطلاعاتی افزوده می‌گردد به طوری که تقریبا هر ۱۰ ماه حجم اطلاعات آن دوبرابر می‌شود.

اکنون تعداد ۱۰۶۵۳۳۱۵۶۷۵۶زوج نوکلئوتید در قالب ۱۰۸۴۳۱۶۹۲ پیشینه توالی در بخش سنتی بانک ژن و تعداد ۱۴۸۱۵۶۱۱۷۷۶۳ زوج در قالب ۴۸۴۳۳۰۶۷ پیشینه توالی در بخش WGS این بانک اطلاعاتی وجود دارد.بانک ژن بخشی از پروژه همکاری بین المللی در زمینه توالی های نوکلئوتیدی(INSDC) است.این پروژه بین المللی شامل بانک ژن(GB) و بانک اطلاعاتی دی ان ای ژاپن(DDBJ) و آزمایشگاه بیولوژی ملکولی اروپا(EMBL) است .این بانک های سه گانه بطور روزانه داده ای خود را مبادله می کنند.

داده های موجود در GenBank و بانک های مشابه از دو طریق تامین می شود:

از تحقیقات پژوهشگران در دنیا و از مراکز توالی یابی ژنوم‌ها در دنیا به شکل های مختلف .

هدف از این تحقیق عبارت است از:

۱- استخراج DNA با غلظت بسیار بالا (۱۰۰ نانوگرم در ماکرولیتر) از ۱۰ گونه ماهیان مهم و در معرض خطر و اقتصادی خلیج فارس و دریای عمان از گونه های کفزی مانند پُو گزنده با نام علمی *Dasyatis bennetti* و کفشک پهن چپ‌رُخ با نام علمی *Pseudorhombus arsius* ، پلاژیک مانند گربه ماهی بزرگ با نام علمی *Netuma thalassina* ، گربه ماهی پوزه گِرد با نام علمی *Netuma bilineata* ، کوسه ماهی شبه دندان نما با نام علمی *Carcharhinus leucas* و گیش پوزه دراز با نام علمی *Carangoides chrysophrys* ، مرجانی مانند

زمردماهی نوار اُریب با نام علمی *Choerodon robustus* ، یال اسبی با نام علمی *Trichiurus lepturus* و در آخر از دو گونه مهاجر و اقتصادی منطقه خلیج فارس و دریای عمان مانند هوور معمولی با نام علمی *Thunnus tonggol* و زرده با نام علمی *Euthynnus affinis* به روش فنل کلروفرم و نگهداری در فریزر منهای ۸۶ با استفاده از نگهدارنده TE و همچنین ازت مایع برای مدت زمان طولانی.

۲ – تعیین توالی و بررسی فایلوژنی گونه های مورد مطالعه با استفاده از ژن 16s rRNA

ناحیه ژنی که برای شناسایی مورد استفاده قرار می گیرد ناحیه ژن 16S میتوکندری می باشد که در سالهای گذشته در شناسایی ماهیان ، پرندگان، پروانه ها، ، حشرات ، انگلها و پارازیتها بسیار موثر بوده است.

۳- آنالیز داده ها و مقایسه توالی ها با توالی های موجود در بانك ژن از طریق هم ردیف کردن و رسم درخت فایلوژنی آنها .

این مطالعه با نمونه برداری آغاز وبعد از استخراج DNA و تهیه بانك ژن ، با استفاده از یک جفت پرایمر طراحی شده محصول PCR بدست امده و محصول PCR بعد از خالص سازی جهت Sequencing یا تعیین توالی انجام میگردد. نمونه های بافت از عضله و باله شکمی و دمی ۹ گونه از ماهیان اقتصادی خلیج فارس و دریای عمان تهیه و در ازت مایع و فریزر منهای ۸۶ نگهداری میگردد .

۲- مروری بر منابع

۲-۱ - مطالعات و تحقیق در ایران

تاسیس "بانک ژن ماهیان خاویاری کشور" با اعتبار ۸۵۰۰ میلیون ریالی از سوی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در محل موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری کشور(استان گیلان- رشت، جوار سد سنگر) انجام شد که در خرداد ماه ۱۳۹۱ رسما افتتاح و آغاز بکار نمود. پروژه پایلوت و کاربردی دیگری توسط پورکاظمی ۱۳۹۱ با عنوان " تشکیل خزانه ژنی ماهیان خاویاری نژاد سفید رود" و با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و برنامه محیط زیست دریای خزر- Caspeco-CEP اجرا گردید که با موفقیت توانست ضمن جمع آوری تعداد معدودی مولد تاسماهی ایرانی و ازون برون و تکثیر به روش زنده میکروسزارین تعداد ۲۳۰۰۰ عدد بچه ماهی پلاک گذاری شده را با وزن بالای ۲۰ گرم به دریای خزر رها سازی نماید. علاوه بر آن موفق به انجماد اسپرم و ذخیره سازی آن در مخازن ازت مایع نماید. بانک بافت و DNA دو گونه ماهیان خاویاری را تشکیل دهد. ولی متاسفانه تا کنون موفق به جمع آوری مولد از ۳ گونه دیگر خاویاری (فیل ماهی، تاسماهی روسی و تاسماهی شیپ) نشد. همچنین مولد سازی با استفاده ار بچه ماهیان تولید شده از طریق تکثیر مصنوعی بود که حدود ۱۰۰۰ عدد از آن در حال پرورش می باشد تا در صورت نابودی احتمالی ماهیان در محیط زیست طبیعی خود (دریای خزر) بتوان از این ماهیان جهت احیاء ذخایر استفاده نمود و یا در صورت توسعه آبزی پروری از نژاد فوق جهت پرورش و تولید گوشت و خاویار استفاده گردد تا ذخایر ژنتیکی آن بطور کامل منقرض نشود.

بانک ژن برای نخستین بار در ایران از حدود ۴۰ سال قبل فعالیت خود را جهت حفظ ذخایر توارثی کشور (عمدتاً مرتعی) آغاز نمود و تا سال ۱۳۷۷ به عنوان زیر مجموعه بخشهای تحقیقاتی مرتع و ژنتیک و فیزیولوژی فعالیت داشت. با توجه به اهمیت موضوع حفاظت ذخایر خدادادی ملی و وظیفه ای که در این خصوص بر عهده داشت، مسئولان بیش از پیش به نقش بانک ژن واقف و همّ خود را در توسعه و تقویت آن به کار گرفتند.

مهم ترین فعالیت ها و مزایای مرتبط با بانک ژنوم شناسایی تمامی گونه های جانوری موجود در هر کشور و گونه های جانوری هر منطقه ، استان و شهرستان و میزان تراکم نسبی آن ها ، معرفی ویژگی های فیزیولوژیکی ، ژنتیکی و محیطی رفتاری هر گونه ، انجام مطالعات کاربردی برای تعیین شباهت های ژنتیکی ، تولید مثلی و انجام مطالعات اولیه برای ایجاد بانک ژنوم گامت (تخمک و اسپرم) در جهت بهبود پتانسیل تکثیر طبیعی یا آزمایشگاهی این جانوران است . در واقع ساخت بانک ژنوم سنگ بنای خیری است که می تواند نه تنها گونه های ارزشمند ایرانی را در کف حمایت خود قرار دهد، بلکه دایره المعارف جامع و ارزشمندی است که به آیندگان تقدیم می شود .

در همین ارتباط تعداد بانک‌های ژن موازی با فعالیت بانک ژن اصلی که در ستاد مرکزی سازمان حفاظت محیط زیست در تهران راه اندازی شده است و تا پایان برنامه پنج ساله پنجم به هشت بانک خواهد رسید.

با توجه به مخاطرات موجود در زمینه انقراض گونه های جانوری و گیاهی اقدام به راه اندازی این بانک در کشور شده است. این بانک در حوزه های پستانداران، خزندگان، پرنده، گیاهان در معرض خطر و آبزیان در معرض تهدید فعال است.در حال حاضر بالغ بر ۵۰۰ نمونه از پستانداران در این بانک موجود است و به تدریج آمار این نمونه ها در حال افزایش است. بالغ بر ۱۵۰ نمونه از پرندگان به ویژه پرندگانی که نیاز به مدیریت جمعیتی دارند مانند "هوبره" و برخی از پرندگان شکاری در بانک جمع آوری شده اند. ضمن آنکه ژنوم بالغ بر ۷۰۰ نمونه خزندگان، حدود ۱۵ نمونه از ماهیان و ۱۷ نمونه از دوزیستان را در اختیار داریم. بانک ژنوم حشرات نیز راه اندازی شده است ضمن آنکه نزدیک به ۱۰۰ نمونه توده بذری بانکینگ شده است.

این بانک شامل گیاهان در معرض خطر انقراض است.در کنار این اقدامات، آنالیز ژنی بر روی نمونه های موجود در حوزه بی مهرگان در حال انجام است.

بدون شک گام نخست در ایجاد بانک ژن یک گونه، شناخت جمعیت ها و نژادهای آن گونه در اکوسیستم آبی و حوزه پراکنش آن می باشد. در این راستا مطالعات متعددی در خصوص جمعیت های انواع آبزیان انجام شده است.

اولین مطالعه درخصوص بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی ازون برون، تاسماهی روسی در حوزه آبهای ایرانی دریای خزر بود که توسط Pourkazemi 1996 انجام شد و همچنین برای گونه های فیلماهی ، تاسماهی ایرانی و روسی توسط Rezvani 1997 صورت پذیرفت. دیگر مطالعات مرتبط می توان به شعبانی (۱۳۸۴)بر روی گونه ازون برون خزر شمالی و جنوبی خزر به روش PCR-RFLP و همچنین نوروزی (۱۳۸۶) بر روی ساختار ژنتیکی ماهی ازون برون به روش میکروستلایت ، خوش خلق (۱۳۸۵) بر روی تاسماهی ایرانی و روسی به روش میکروستلایت، قاسمی (۱۳۸۲) و صفری (۱۳۸۵) بر روی ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی شیب به ترتیب با روش PCR-RFLPو میکروستلایت و همچنین پورکاظمی (۱۳۸۵) اشاره نمود.که همه مطالعات مبین وجود جمعیت های متمایز از گونه های مختلف مورد بررسی بود.

تیرانی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از ماهی سرخو در خلیج فارس و دریای عمان با توالی‌یابی ژن 12SrRNA پرداختند. نتایج بدست آمده نشان داد که تعداد هاپلوتیپ‌های موجود در منطقه هرمزگان و چابهار چهار هاپلوتیپ و در منطقه بوشهر دو هاپلوتیپ می‌باشد. بیشترین تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت‌ها در آبهای چابهار و هرمزگان و کمترین تنوع هاپلوتیپی در بوشهر مشاهده شد. در این مطالعه مشخص گردید که دو جمعیت هرمزگان و چابهار در یک شاخه یا جد و نیای مشترک قرار می‌گیرند و جمعیت ماهی سرخو در منطقه بوشهر در یک شاخه جداگانه خود را نشان می دهد.

ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی راشگو معمولی *Eleutheronema tetradactylum* در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش تعیین توالی با استفاده از ژن 28SrRNA مورد بررسی قرار گرفت (خالدی و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج بررسی ۴۱ نمونه که از چهار منطقه خوزستان، بوشهر، بندرعباس و سیستان و بلوچستان جمع آوری شده بودند، بیشترین تعداد و تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی را در جمعیت بندرعباس و کمترین مقدار شاخص های مذکور را در جمعیت بوشهر نشان داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت بوشهر و بندرعباس و کمترین بین بوشهر و چابهار ثبت گردید. واگرایی جمعیتی بین جمعیت های خوزستان و چابهار بیشترین و بین جمعیت های بوشهر و چابهار کمترین مقدار بود.

بررسی طرح تهیه بانک ژنوم گونه های غالب پوشش گیاهی استان و دو نوع علفخوار(قوچ و میش) در ۳ منطقه کلاه قاضی – موته و قمیشلو از طریق سازمان حفاظت محیط زیست اصفهان و به موازات سازمان محیط زیست کل کشور از ابتدای سال ۸۴ آغاز شد و اواخر سال گذشته به پایان رسید .

همچنین پورکاظمی (۱۳۸۷) طرح جامع ساختار ژنتیکی تاسماهیان دریای خزررا انجام دادند. که در آن تعداد ۱۱۲۱ عدد نمونه مورد بررسی قرار گرفت .

در همین ارتباط توسط ذریه زهرا (۱۳۹۱) برای تشکیل بانک ژن ماهی آزاد دریای خزر با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و برنامه محیط زیست دریای خزر– Caspeco-CEP انجام شد که ضمن جمع آوری تعدادی مولدین وحشی ماهی آزاد از چند رودخانه مهم دراستانهای گیلان و مازندران نسبت به تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان به دریای خزر اقدام شد . بافت و DNA این مولدین جمع آوری ودر حال نگهداری است و بچه ماهیان جهت مولد سازی در حال پرورش میباشد. همانند ماهیان خاویاری مقداری از اسپرم آزاد ماهیان در ازت مایع منجمد و در بانک اسپرم در حال نگهداری است .

ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید دریای خزر توسط عبدالحی (۱۳۸۹) مورد مطالعه قرار گرفت که از رودخانه های لمیر، حویق، سفید رود، شیرود و تجن نمونه بافت از مولدین بالغ جمع آوری و با دو روش PCR-RFLP و میکروستلایت انجام گردید. لالوئی و همگاران (۱۳۸۴). ساختار ژنتیک جمعیت ماهی Barbus caspito در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر بروش pcr-rflp. مورد بررسی قرار دادند. خارا و همکاران (۱۳۸۴).ساختار مورفولوژیکی و ژنتیکی ماهی سیم (A. brama) در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر (ایران) و سواحل جنوب غربی دریای خزر (جمهوری آذربایجان) را مورد ارزیابی قرار دادند و جمعیت های متمایزی مشاهده نمودند.

رحمانی (۱۳۸۳) پویایی شناسی جمعیت و تنوع ژنتیکی ماهی شاه‌کولی Chalcalburnus chalcoides در رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود مورد مطالع قرار دادند. ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی سوف حاج طرخان در تالابهای انزلی و امیرکلایه لاهیجان و سوف سفید در سد ارس و حوضه جنوبی دریای خزر توسط

قریب خانی (۱۳۸۸) مورد بررسی قرار گرفت.ساختار مورفولوژی و ژنتیکی جمعیت گاوماهی خزری Neogobius caspius در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP توسط رزمجو (۱۳۸۸) مورد مطالعه قرار گرفت . در آبهای خلیج فارس و دریای عمان مطالعات ژنتیک مولکولی معدودی صورت گرفت از جمله بیوسیستماتیک سه جنس Carangoides، Caranx ، Parsatromateus از خانواده گیش ماهیان در آبهای خلیج فارس بروش ریخت‌سنجی و مولکولی (mtDNA) توسط ابدالی (۱۳۸۳)مورد بررسی قرار گرفت. ساختار مولکولی ژنتیک جمعیت سه گونه میگوی مهم خلیج فارس توسط بابایی در سال ۱۳۸۰ مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲ - مطالعه و تحقیق در خارج از کشور

در ویتنام بین سالهای ۱۹۹۶ تا۲۰۰۰ اقدام به تهیه بانک ژن از منابع دریایی به منظور حفظ و تولید پایدار از این منابع در آینده نمود . بدین منظور این پروژه در ۳ قسمت انجام کاریوتایپ و کرد آوری اطلاعات مورفولوژیکی ، نگهداری بافت در ازت مایع و همچنین نگهداری موجود زنده در استخر انجام گردید. .

شوستر با اشاره به «فهرست قرمز» گونه‌های به شدت در خطر انقراض که توسط انجمن بین‌المللی حفاظت از طبیعت، IUCNتهیه شده، پیشنهاد می‌کند که پژوهشگران برای تهیه توالی ژنی حیوانات این فهرست و هم‌چنین گونه‌های منقرض شده برنامه‌ریزی کنند، و «فهرستی از گونه‌های به دقت انتخاب شده جانوران در خطر انقراض و گونه‌های منقرض شده» را برای این کار تهیه کنند.

به گفته شوستر، اطلاعات مولکولی علاوه بر این می‌توانند به عنوان معیاری از در معرض خطر انقراض بودن نیز عمل کنند. او می‌گوید: «هنگامی که مشخص‌تر شود وقتی یک گونه به انقراض نزدیک می‌شود، بر سر تنوع ژنتیکی آن چه می‌آید؛ آنگاه شما می‌توانید این اطلاعات زیر بنایی را به اولیای امور و کسانی که تصمیمات سیاسی را اتخاذ می‌کنند، ارائه کنید و بگویید این روند باید کاملا متوقف شود.

دوین لاک از مرکز ژنوم دانشگاه واشنگتن، هنگامی که به شرکت‌کنندگان در کارگاه گفت که در پایان سال جاری، او و همکارانش انتظار دارند اطلاعات ژنوم را با سرعتی ۵۰۰ برابر آن‌چه در سال ۲۰۰۶ داشتند تهیه کنند، نشان داد که توانایی بالقوه فناوری‌های جدید چقدر زیاد است

برای سایر گونه های خاویاری در خارج از کشور مطالعات متعددی بر روی ساختار ژنتیک جمعیت گونه ها انجام گرفت که برحسب حوزه جغرافیایی مورد بررسی از جمعیت های متمایزی تشکیل یافته است شامل May et al (1997) با استفاده از روش مایکروستلایت بر روی گونه تاسماهی دریاچه ای McQuown et al. (2003) بر روی تاسماهی دریاچه ای (A. fulvensis)، در مطالعه دیگری توسط Ludwig et al. (2002) بر روی تاسماهی A. oxyrinchus که اثبات نمود این گونه ابتدا در قاره اروپا بوده ولی بتدریج منقرض شد و به پیشنهاد وی تعدادی از مولدین از آمریکای شمالی (کانادا) جهت پیوند به آبهای اروپا به طور زنده به کشور آلمان انتقال داده شد.

Zhu Bin و همکاران (۲۰۰۶) مطالعه ای در خصوص ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی چین انجام دادند و اثبات نمودند که این گونه از جمعیت های مختلفی تشکیل شده است.

در هر حال لازمه و گام نخست تشکیل بانک ژن زنده آبزیان آگاهی و شناخت کامل از وضعیت ساختار ژنتیکی و تعداد جمعیت های آن است تا بتوان بر اساس مارکرهای ژنتیکی هریک از جمعیت ها را شناسایی و برای آن خزانه ژنی مجزا و تفکیک شده ای تشکیل داد در غیراینصورت تشکیل خزانه ژنی از ماهیان متعدد بی هویت ژنتیکی ایجاد خواهد گردید.

Barcoding اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط هبرت و گروه تحقیقاتی اش از دانشگاه گولف وارد عرصه جامعه علمی گردید. هبرت در مقاله خود تحت عنوان شناسایی زیست شناختی با استفاده از شناساگر مولکولی DNA Barcoding (Biological identifications through DNA barcodes) سیستمی نوین را برای شناخت و شناسایی گونه ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می کند .

در ایران نیز تحقیقات در زمینه بارکدینک و ثبت در این زمینه در منطقه پارک ملی خلیج نایبند (استان بوشهر) بر روی ۷۰ گونه موجود در آن منطقه توسط انجام گردیده است . (Asgharian et al., 2011).

با پیشرفت تکنیک های جدید ، مخصوصا تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، مارکر های تهیه شده از ژن سیتو کروم اکسیداز (Co1) اطلاعات غیر قابل تصورو ارزشمندی را برای استفاده در جنبه های مختلف تکثیر و پرورش آبزیان در اختیار محققین قرار داد. این اطلاعات شامل شناسایی و تفکیک ژنتیکی ذخایر ، برنامه های به گزینی مولدین و اندازه گیری میزان تغییرات کروموزومی و ژنتیکی در زمینه های القاء پلی پلوییدی در مولدین بوده است (Ferguson, 1994) .

اولِین رده ء سلولی از ماهیان در سال ۱۹۶۲ توسط Wolf & Quimby ایجاد گردید سپس در سالهای ۱۹۹۰، ۱۹۹۲ و ۱۹۹۴ بترتیب توسط Lannan , Fryer و Zhang & Yang تحقیقاتی در زمینه ایجاد رده های متنوّعی از ماهیان سردآبی و گرمابی صورت گرفت که عمدتاً برای تشخیص آلودگی های ویروسی، ریکتزیایی و همچنین مطالعاتی در زمینه های سم شناسی و عوامل ایجاد کننده سرطان و مسائل ژنتیکی در این خصوص صورت پذیرفت.

۳- مواد و روشها

۳-۱ : موارد مورد استفاده

۱- بافر های STE (Salt, Triss, EDTA)

۲- SDS(Sodium dodesyl sulfate)

۳- پروتئیناز با غلظت ۱۰mg/ml

۴- phenol (pH= 7.8-8.2)

۵- الکل اتیلیک ۹۶ درصد

۶- ایزوامیل الکل

۷- کلروفورم

۸- پودر آگارز

۹- اتیدیوم بروميد (EtBr)

۱۰- بافر سنگین کننده (loading buffer)

۱۱- بافر TBE (۱۰×)

۱۲- Total DNA

۱۳- dNTP

۱۴- MgCl2

۱۵- بافر PCR

۱۶- Taq DNA Polymerase

۱۷- d H2O

۱۸- Primers

۱۹- مارکر 50bp

۲۰- مارکر DNA/Hind III

۲- ۳ : دستگاههای مورد استفاده

ردیف	نام دستگاه	شرکت تولیدکننده
۱	ترمال سایکلر (Thermal ceyler) مدل TC 341	Eppendorf , Germany
۲	ترمومیکسر (Thermomixer) مدل 5436	Eppendorf , Germany
۳	سانتریفوژ (Centrifuge) مدل 5415D	Eppendorf , Germany
۴	سانتریفوژ (Centrifuge) مدل 7200 - D	Eppendorf , Germany
۵	ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ mg OHAUS	Sartriuos , Germany
۶	شیکر لوله (Shaker) مدل SL68	Sartriuos , Germany
۷	شیکر (Orbital shaker) مدل $\frac{75}{OS-2040}$	Sartriuos , Germany
۸	اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) مدل C ≡ CIL	Eppendorf , Germany
۹	PH متر دیجیتالی مدل PH 523- WTW	Sartriuos , Germany
۱۰	الکتروفورزافقی مدل SH - 502, 503	Vilber – Lurmat, France
۱۱	EPS (Electrophoresis) مدل EPS	Vilber – Lurmat, France
۱۳	ژل داکیو متیشن(photo man gel documentation system) مدل UVIS-20	Vilber – Lurmat, France
۱۴	بن ماری	Memert Germany
۱۶	فریزر ۲۰ – درجه سانتی گراد.	Delongi, Italy
۱۷	تانک ازت مایع	
۱۸	فریزر منهای ۸۶	Labtech, Korea

۳-۳ - روشها

۱-۳-۳ - روش نمونه برداری

نمونه برداری از مناطق مهم زیستگاه های گونه های مورد مطالعه می‌باشد انجام گرفت. از هر نمونه ۲ گرم از عضله و باله پشتی و شکمی برداشته و در الکل اتیلیک خالص نگهداری و جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین از هر گونه به میزان ۲ گرم از عضله بصورت وکیوم شده در ازت مایع نگهداری شدند.

۲-۳-۳ - استخراج ژنوم کل (Total DNA)

برای استخراج DNA روشهای مختلفی وجود دارد که در این تحقیق از دو روش استفاده شد.

۱-۲-۳-۳ - اروش استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (Taggart et al.,1990)

در این روش ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوپهای ۱/۵ میلی لیتری بصورت قرارداده وخرد گردید . سپس بر روی آن مقدار۵۰۰ میکرولیتر از محلول STE (Salt,Triss,EDTA) ریخته شد. (طرز آماده سازی بافرها در ضمیمه آورده شده است). بدینصورت قطعات خرد شده بصورت سوسپانسیون در می‌آیند. در مرحله بعدی مقدار ۶ میکرولیتر پروتئیناز K (10 mg/ml) و ۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) به تیوبها اضافه کرده و تیوپها در ترمومیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۶ ساعت قرار داده شدند..بعد از مرحله هضم سلولی مقدار ۴۲۵ ماکرولیتر فنل (PH= 8) ۴۲۵ ماکرولیتر کلروفرم – ایزو آمیل الکل (۲۴ :۱) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از شیکلر هم زده شدند. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. بعد از سانتریفوژ دو فاز در داخل تیوبها تشکیل گردیدکه فاز آبی یا محلول رویی را برداشته و فاز آلی را دور ریخته شدند فاز آبی را به تیوپهای جدید انتقال و مرحله اول دوباره تکرارشد. عمل مخلوط کردن توسط شیکر و سانتریفوژ مجدداً تکرار گردید. فاز رویی را به تیوبهای جدید منتقل و به مقدار هم حجم آن کلروفورم - ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ کردن انجام گرفت. در نهایت دو برابر حجم محلول بالایی جدا شده، اتانول خالص و ۵۰ ماکرولیتر نمک ۴ مولار اضافه شد و بعد از چندین بار به هم زدن به مدت یک شبانه روز در فریزر ۲۰- قرار داده شد. روز بعد نمونه ها در دور ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریوفوژ گردید و فاز رویی دور ریخته و پلاک DNA در ته تیوب قابل مشاهده است. در مرحله بعد این پلاک را با الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس در هوای آزاد قرار داده تا خشک شود بعد از این مرحله بر روی رسوب به مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر TE و یا آب مقطر اضافه گردید و برای استفاده در مراحل بعدی در ۲۰ - درجه سانتی گراد و ازت مایع و همچنین فریزر منهای ۸۶ نگهداری شدند.

۲-۲-۳-۳ - روش استخراجTotal DNA بدون استفاده از فنل (Cattaneo 1997)

در این روش که سریعتر از روش قبلی می باشد ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوبهای ۱/۵ لیتری بصورت خرد شده قرار داده و سپس بر روی آن مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول STE اضافه کرده همچنین به میزان ۶ میکرولیتر پروتئیناز k (۱۰mg/ml) و ۲۰ میکرو لیتر SDS ۲۰٪ اضافه کرده و تیوبها را در ترمیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از هضم سلولها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم استات ۷/۵ مولار بر روی محلول داخل تیوب اضافه کرده و پس از هم زدن، نمونه ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۲۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را به تیوپهای جدید انتقال داده به میزان ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ مجدداً تکرار می شود در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوبات جدار لوله و ته لوله با الکل ۷۰° درجه شستشو داده شده و پس از آبگیری توسط کاغذ

صافی جهت خشک شدن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود که در نهایت بر روی رسوب به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه گردیده و برای استفاده در مراحل بعدی در ۴ درجه سانتی یا ۲۰- گراد نگهداری شدند.

۳-۳-۳- الکتروفورز DNA استخراج شده

الکتروفورز تکنیکی است که از طریق آن ذرات باردار در یک میدان الکتریکی از یکدیگر جدا می‌شوند. مولکولهای نظیر آمینو اسیدها و پروتئین به دلیل داشتن گروههای قابل یونیزاسیون می‌توانند در محیطهای بافری مختلف از نقطه نظر ایزوالکتریک آنها دارای بار الکتریکی مثبت یا منفی باشند.

بنابراین چنانچه این مولکولها تحت تاثیر میدان الکتریکی مناسب قرار گیرند می‌توانند به طرف الکترودها مهاجرت کنند. مولکولهایی که دارای بار یکسان ولی جرم مولکولی متفاوت هستند بدلیل تفاوت در نسبت جرم مولکولی به بار الکتریکی در میدان مناسب دارای سرعتهای مختلفی می‌باشند که این موضوع موجب جداسازی آنها میشود. به چنین فرایندی الکتروفورز می گویند.

در این تحقیق DNA استخراج شده از نمونه ها برای ارزیابی کمی یا کیفی با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز شدند. برای این کار در حدود ۴-۳ میکرولیتراز محصول استخراج شده را با ۲ میکرولیتر LB(بافر سنگین کننده) به همراه ۷-۶ مایکرولیتر آب مقطر استریل شده مخلوط و ترکیب بدست آمده در چاهک های ایجاد شده در داخل ژل آگارز در تانک الکتروفورز قرار داده و الکتروفورزگردیدند. الکتروفورز با جریان ۷۵ میلی آمپر (دستگاه EPS) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شده و سپس ژل با استفاده از دستگاه ظهور ژل (Gel Doccumentation) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۴-۳-۳- روش کار

جهت آماده کردن ژل آگارز با علم مشخص بودن حجم ظرفی که ژل در آن ریخته می شود و محلول TAE تهیه و با آب مقطر به نسبت ۱ به ۹ رقیق کرده و سپس بسته به غلظت ژل آگارز مورد نظر پودر آگارز بر روی محلول تهیه شده در داخل بشر ریخته و این ترکیب روی شعله تا وقتیکه رنگ آن شفاف شود هم زده می شود. بعد از کاهش درجه حرارت محلول به میزان ۱ میکرولیتر ایـتدیـوم بروماید (EtBr) به ازاء هر ۱۰ میل لیتر به محلول اضافه کرده و بعد از هم زدن ، محلول نسبتاً سرد شده داخل ظرف الکتروفورز حاوی شانه ریخته شد. ظرف ژل را در مکانی که دارای تراز یکنواخت باشد قرار داده تا محلول ژل ببندد. عمدتاً بعد از ۱۵ دقیقه ژل سفت شده و شانه را از داخل ژل خارج و ژل را در داخل دستگاه الکتروفورز قرار داده شد. بعد از قرار دادن ژل در داخل دستگاه الکتروفورز و اتمام کار الکتروفورز آنگاه ژل را از دستگاه خارج کرده و جهت بررسی کیفیت DNA زیر

اشعه UV (با استفاده از سیستم مستند ساز ژل) قرار داده تا با استفاده از خاصیت فلورسنت ایجاد شده باند DNA مورد ارزیابی قرار گیرد.

۱-۴-۳-۳ - بررسی کمی و کیفی DNA استخراجی

غلظت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری میشود تا مقادیری که در مرحله PCR بایستی استفاده شود معین شود. این عمل با استفاده از رابطه میزان جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام میگیرد. همچنین خلوص DNA استخراجی نیز با دستگاه اسپکتروفتومتر و با استفاده از نسبت جذبی OD260/OD 280 تعیین میشود. بدین صورت که اگر DNA کافی برای سنجش از طریق اسپکترومتری وجود نداشته باشد (<250 ng/ml) یا اینکه نمونه DNA، با مواد دیگری آلوده شده باشد که نور را جذب و مانع آنالیزهای دقیق شود در این صورت راه سریعی که برای تعیین مقادیر DNA در این گونه نمونه ها وجود دارد استفاده از خاصیت فلورسنت نمونه DNA که با اتیدیوم بروماید آغشته شده است و در مقابل نور فرابنفش قرار داده شده است می باشد. چون شدت نور متناسب با کل DNA موجودات بنابراین مقدار DNA نمونه ها را می توان با مقایسه خاصیت نوردهی کلی DNA استفاده شده با یکسری از نمونه های استاندارد تشخیص داد. با این روش تا حدود ۵-۱ نانوگرم را می توان جدا کرد. (Sambrook, 1989).

همچنین جهت تعیین مقادیر DNA یا RNA از طریق استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بایستی جذب نوری نمونه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شود. جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر نشاندهنده غلظت اسید نوکلئیک نمونه میباشد بصورتیکه اگر جذب نوری نمونه‌ای از DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر برابر با یک شود نشاندهنده وجود تقریباً ۵۰ µg/ml از DNA دو رشته ای در محلول و ۴۰ µg/ml از DNA تک رشته ای و ۲۰µg/ml از الیگو نوکلئوتید تک رشته‌ای می باشد. همچنین نسبت بین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (OD260/OD280) برای سنجش خلوص اسیدهای نوکلئیک بکار می‌رود بطوریکه این نسبت در مورد DNA خالص برابر ۱/۸ و در مورد RNA برابر ۲ می باشد.

چنانچه نمونه‌ای حاوی پروتئین یا فنل باشد این نسبت برای DNA و RNA پایین تر از مقادیر گفته شده خواهد بود و تشخیص دقیق میزان اسیدهای نوکلئیک ممکن نخواهد بود.

۲-۴-۳- ۳ - آغازگرها

آغازگر مورد استفاده در این تحقیق توسط شرکت metabition international AG آلمان سنتز شده است (جدول ۳-۴). آغازگر طبق دستور شرکت سازنده با غلظت 100 pm/µl در آب مقطر حل شد (Palumbi and Benzi 1991 (Tong *et al.*, 2000), Palumbi *et al.* (1991).

جدول ۲ : آغازگر مورد استفاده در PCR ژن 16SrRNA

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر
16SF	5′-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3′
16SR	5′-CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T−3′

۳-۴-۳-۳- نحوه محاسبه Tm و Ta

برای تخمین درجه حرارت مناسب جهت برقراری اتصالات رشته الگو و آغازگرها می توان از درجه حرارت ذوب (Tm) در رابطه با درجه حرارت اتصال (Ta) استفاده کرد. Tm درجه حرارتی است که در آن بازهای مکمل از هم جدا می شوند (ذوب می شوند) . (Untergrasser *et al*., 2007, Wallace *et al.*, 1979)

جهت تعیین دمای ذوب می توان از فرمول زیر استفاده کرد.

Tm= 40C(C+G) +20C (A+T)

معمولاً دمایی معادل ۲-۱ درجه سانتی گراد کمتر از دمای ذوب کافی است تا مجال دو رگه سازی صحیح بین آغازگرها و رشته‌های الگو حاصل شود ولی در عمل یک محدوده ۱۰-۸ درجه سانتی گرادی پایین تر از Tm جهت اطمینان از حصول بهترین نتیجه استفاده و آزمایش می‌شود.

در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی آغازگرها (پرایمر ها) مورد اشاره از طریق جستجوی اینترنتی از بانک ژنی تهیه گردید.

جهت انجام PCR ابتدا بافر ها و محلول های dNTP پس از خروج از فریزر در شرایط دمایی اطاق در زیر هود لامینار قرار داده تا از حالت انجماد خارج شود و جهت یکسان سازی ، مواد به مدت نیم دقیقه ورتکس گردید. و برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره گذاری گردید.

سپس بر روی یخ ترکیبات مورد نیاز برای انجام عمل PCR با مقادیر مربوطه افزوده شد. محتویات ویال ها توسط سمپلر بخوبی به هم زده و ویالها جهت ته نشین شدن محتویات به مدت ۱۰ ثانیه سانتریوفوژ گردید. در این راستا در حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در یک واکنش به میزان ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۰.۶ ماکرولیتر از پرایمر های Forward و Reverse (پیشرو و معکوس) ، ۲۵ میلی مولار MgCl2 ، ۱۰ میلی مولار dNTP(Promega USA) ، 5X PCR buffer (Promega) و ۵ واحد از(Taq DNA polymerase (Promega استفاده گردید.جهت بهینه کردن عملیات PCR ، در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی ، بهترین دمای اتصال (Annealing Temperature) هر کدام از آغاز گرها به رشته الگو بدست آمد و در مرحله بعد جهت اخذ بهترین و شفاف ترین باندها و حذف باند های ناخواسته اقدام به اپتیماز کردن محصول PCR از طریق تغییر غلظتهای MgCl2 ، DNA ژنومی و dNTP گردید.جهت تعین بهترین غلظت های ممکن در مقدار غلظت MgCl2 عملیات PCR طبق جدول شماره ۲ انجام گردید.

جدول۳: پروفایل غلظت مواد مورد استفاده برای انجام عمل PCR

	Mm ۱.۵ MgCl2	X۱۴	Mm۲.۰۰ MgCl2	X۱۴	Mm۲.۵ MgCl2	X۱۴	Mm۳.۰۰ MgCl2	X۱۴
D Water	۶/۲۰	۸۶.۸	۵/۹۵	۸۳/۳	۵.۷۰	۷۹.۸	۵/۴۵	۷۶/۳
۲۵Mm Mgcl2	۰/۷۵	۱۰/۵	۱.۰۰	۱۴	۱.۲۵	۱۷/۵	۱/۵۰	۲۱
5X Buffer	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵	۲/۵۰	۳۵
۲Mm dNTP	۱/۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵	۱.۲۵	۱۷/۵
10 µm F	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰
10 µm R	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰	۰/۵۰	۷/۰
Temp. DNA	۰/۷۵		۰/۷۵		۰/۷۵		۰/۷۵	
Taq. ۵µ/ ml	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷	۰/۵۰	۰/۷
Total	۱۲/۵		۱۲/۵		۱۲/۵		۱۲/۵	

محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی ایتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت. سیکل حرارتی مورد استفاده در دستگاه PCR شامل سیکل اولیه ۹۴ درجه به مدت ۴/۳۰ دقیقه ، بدنبال آن ۴۰ سیکل شامل دماهای واسرشته سازی (denaturation) ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه ، اتصال (annealing) ۴۵ ثانیه در دماهای اختصاصی برای هر پرایمر طبق جدول ۳، بسط و تکثیر(Extension) ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در آخر دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

جدول ۴: برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن 16SrRNA در ۱۰گونه مورد مطالعه

مراحل PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	
الحاق	۵۴–۵۸	۴۵ ثانیه	۳۰
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار BioEdit و ابزار قدرتمند Blast و رویه Blasten در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. پس از دریافت توالی ها، بازنگری توالی های مشابه با نرم افزار Chromas 2.23 انجام شد. به منظور شناسایی اختلاف میان توالی ها، نمونه های توالی یابی شده با نرم افزار Clustal W هم ردیف و آنالیز و رسم درخت فایلوژنی و میزان فاصله ژنتیکی گونه های مورد نظر با استفاده از نرم افزار MEGA 5 محاسبه شدند (Thompson 1997).

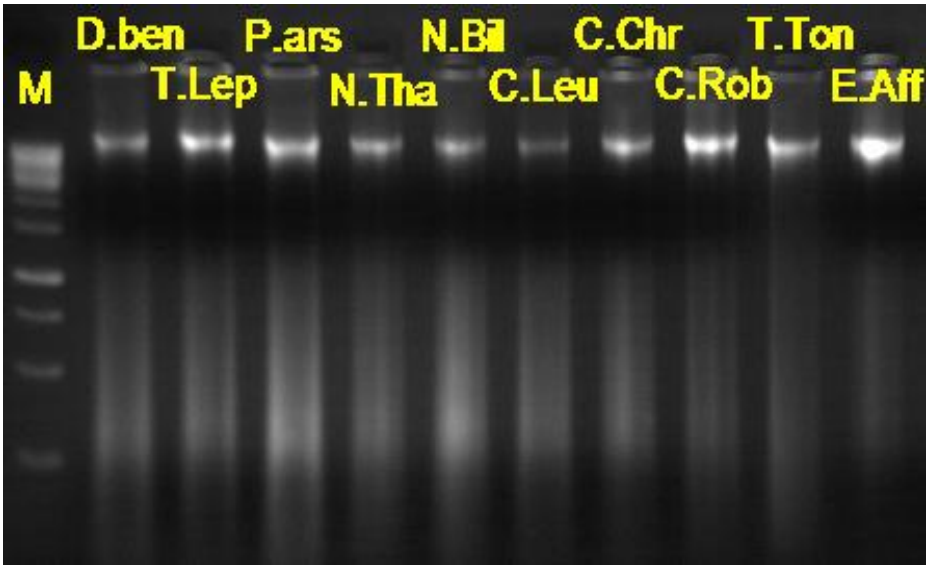
۴- نتایج

۴-۱ - ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

۴-۱-۱- روش الکتروفورز

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت باله شکمی ۱۰ گونه از ماهیان مورد مطالعه انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با دو روش استفاده از ژل آگارز یک درصد و مشاهده با اشعه ماوراء بنفش و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت .

وجود یک باند قوی و باریک بر روی ژل اگارز بدون شکستگی و یا اسمیر حاکی از یک استخراج مناسب دارد. همانطور که در شکل زیر ملاحظه میگردد ، DNAهای استخراج شده از باله شکمی به روش فنل- کلروفرم کیفیت مناسبی جهت استفاده برای انجام PCR دارد.وجود باندهای شارپ و شفاف نشاندهنده آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتیینی ، فنلی و یا آلودگی به RNA است.



شکل۱۲: استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم در ۱۰ گونه از ماهیان مورد مطالعه

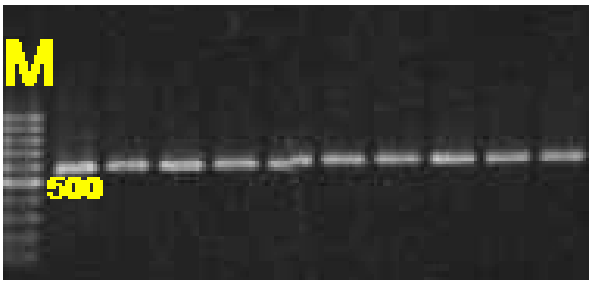
۴-۱-۲ - ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

میزان جذب نوری DNA استخراج شده در تمامی نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای تعیین کمیت و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به طول موج ۲۸۰ نانومتر در نمونه ها بین ۱/۸– ۲/۱ قرار داشت که نشانگر کیفیت خوب DNA نمونه ها بود.

۴-۲ - تکثیر و مقایسه توالی‌های 16SrRNA

۴-۲-۱ - تکثیر ژن 16SrRNA

بهینه سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتیگراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۵۲ -۵۸ درجه سانتیگراد برای گونه های مختلف میباشد.. آغازگرهای 16Sar5′ و 16Sbr3′ امکان تکثیر بخشی از ژن 16SrRNA به طول تقریبی ۶۰۰ جفت باز را فراهم نمودند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نمایش داده شده است.



شکل۱۳: الگوی باندی محصول PCR ژن 16SrRNA از ۱۰ گونه از ماهیان مورد مطالعه بر روی ژل آگارز یک درصد

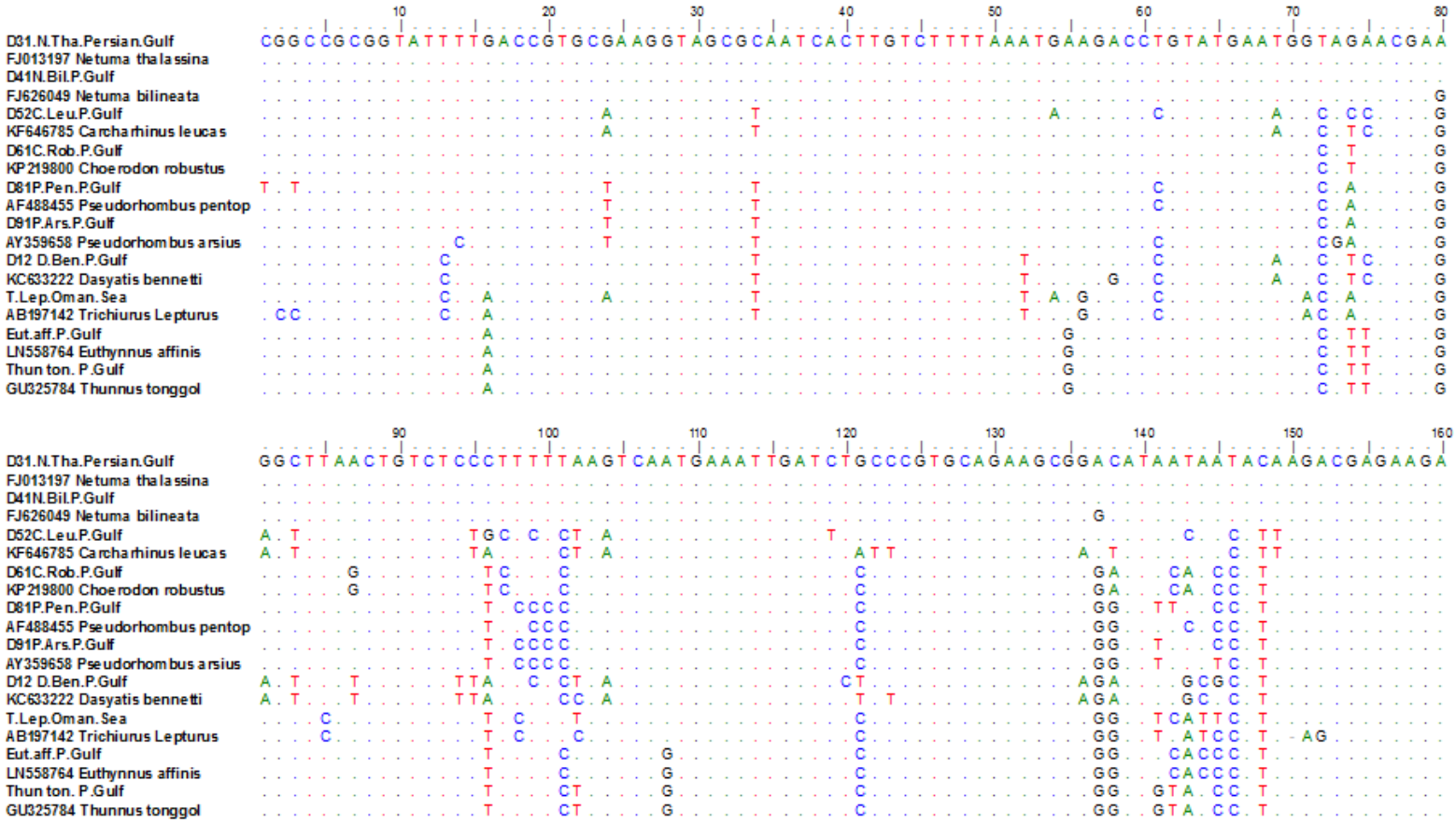
۴-۲-۲ - نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16SrRNA

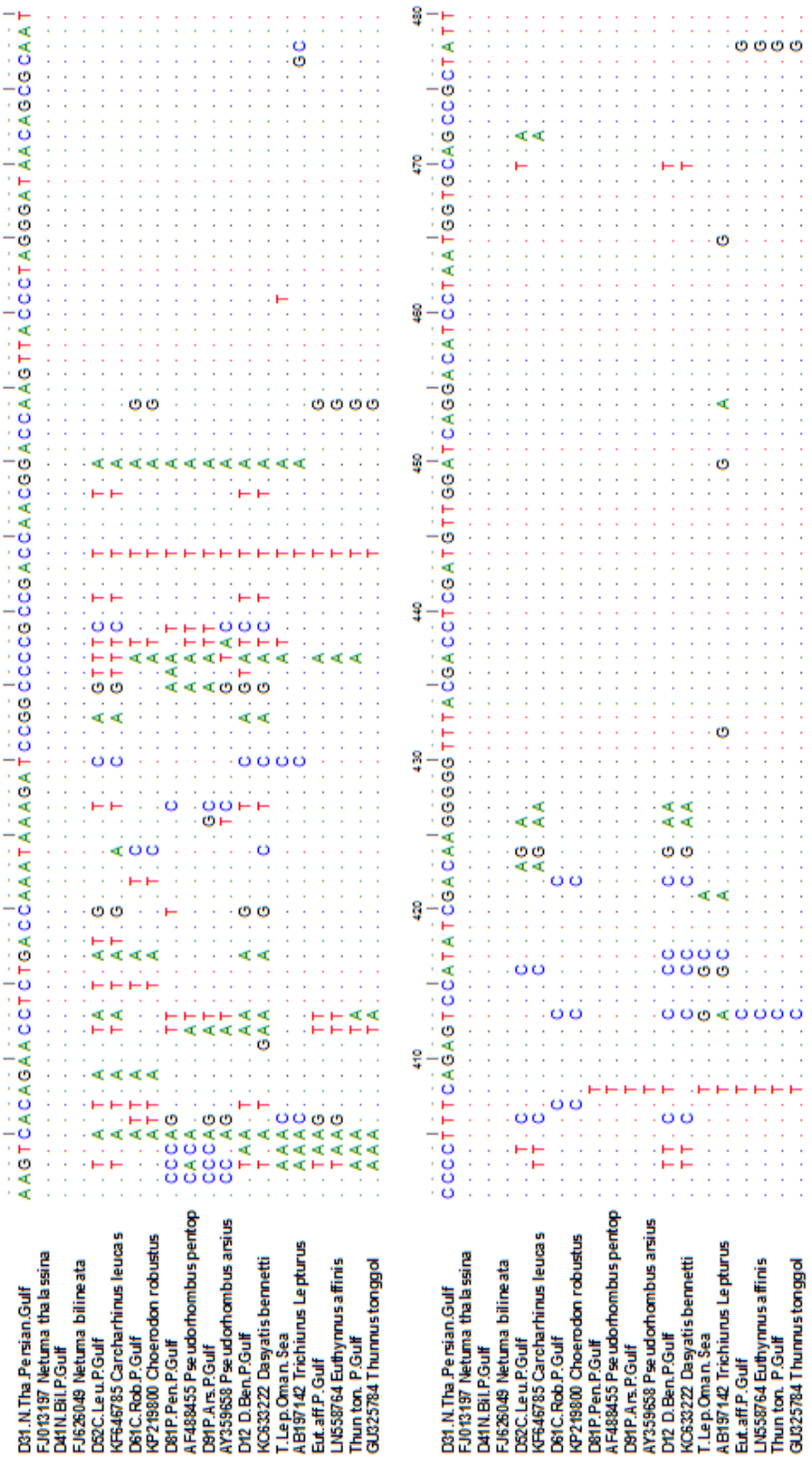
نتایج حاصل از تعیین توالی 16SrRNA با استفاده از پرایمر Forward، به صورت اختصاصی به دو شکل کروماتوگرام و fasta دریافت گردید. پس از دریافت توالی ها، بازنگری و بازسازی توالی های مشابه با استفاده از توالیهای Reverse و در جهت اصلاح اشتباهات احتمالی در هنگام sequencing انجام شد که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

۴-۲-۳ - هم ردیفی توالی‌های بازسازی شده با استفاده از Clustal W

هم ردیفی تمام توالی‌های 16SrRNA گونه مورد مطالعه و دریافت اطلاعات بصورت فایل کروماس، با استفاده از ابزار Clustal W موجود در نرم افزار Mega 4 انجام شد. از ۶۰۰ جفت باز از توالی‌های بدست آمده، ۵۲۰ جفت باز با بررسی و حذف موارد مبهم ردیف شدند .

شکل ١٤: همردیفی و اختلافات نوکلئوتیدی در توالی‌های 16SrRNA از ١٠ گونه ماهیان مختلف در مناطق مورد مطالعه

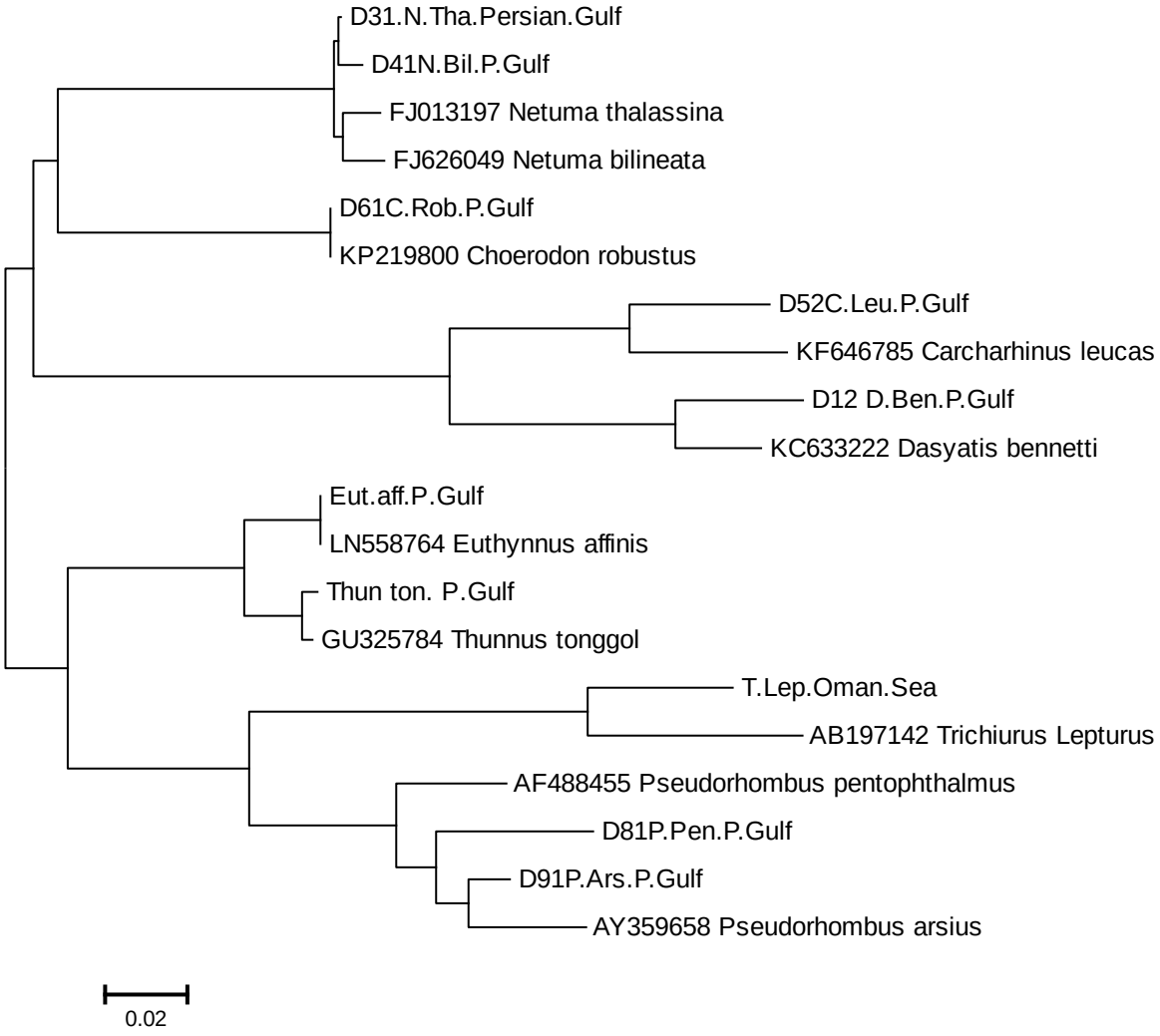



D31.N.Tha.Persian.Gulf
FJ013197 Netuma thalassina
D41N.Bil.P.Gulf
FJ626049 Netuma bilineata
D52C.Le.u.P.Gulf
KF646765 Carcharhinus leucas
D61C.Rob.P.Gulf
KP219800 Choerodon robustus
D61P.Pen.P.Gulf
AF488455 Pseudorhombus pentop
D91P.Ars.P.Gulf
AY359658 Pseudorhombus arsius
D12 D.Ben.P.Gulf
KC633222 Dasyatis bennetti
T.Lep.Oman.Sea
AB197142 Trichiurus Lepturus
Eut.aff.P..Gulf
LN558764 Euthynnus affinis
Thun.ton. P.Gulf
GU325784 Thunnus tonggol

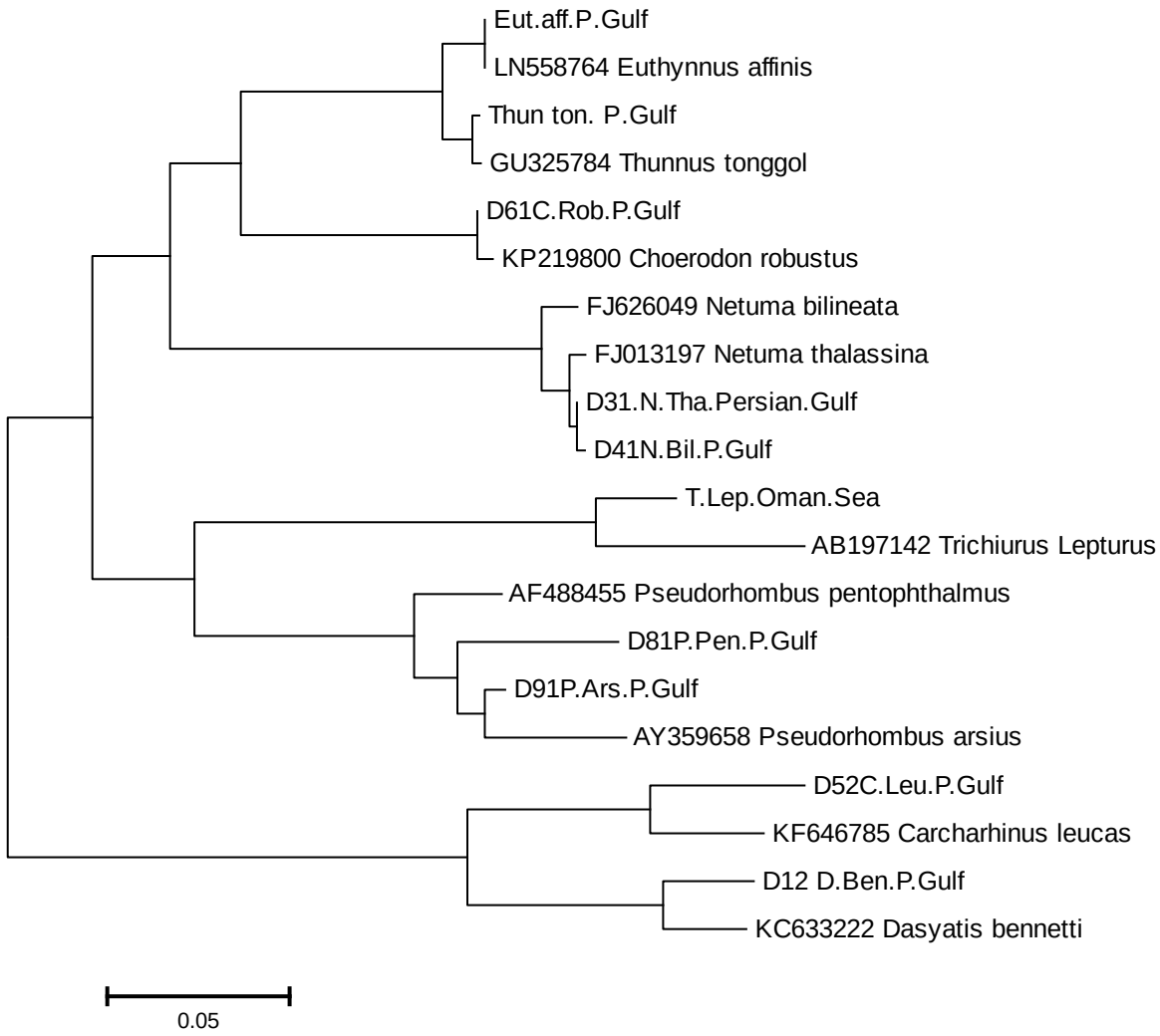
490
500
510
520
D31.N.Tha.Persian.Gulf A A G G G T T C G T T T G T T C A A C G A T T A A A A G T C C T A C G T G A T T G
FJ013197 Netuma thalassina
D41N.Bil.P.Gulf C T
FJ626049 Netuma bilineata
D52C.Leu.P.Gulf T G
KF646785 Carcharhinus leucas
D61C.Rob.P.Gulf C T
KP219800 Choerodon robustus C
D81P.Pen.P.Gulf T C T
AF488455 Pseudorhombus pentop
D91P.Ars.P.Gulf T G
AY359658 Pseudorhombus arsius
D12 D.Ben.P.Gulf T C A
KC633222 Dasyatis bennetti T T
T.Lep.Oman.Sea
AB197142 Trichiurus Lepturus
Eut.aff.P.Gulf C T
LN558764 Euthynnus affinis C T
Thun ton. P.Gulf A C T
GU325784 Thunnus tonggol C T

۴-۲-۴- ترسیم درخت تکاملی

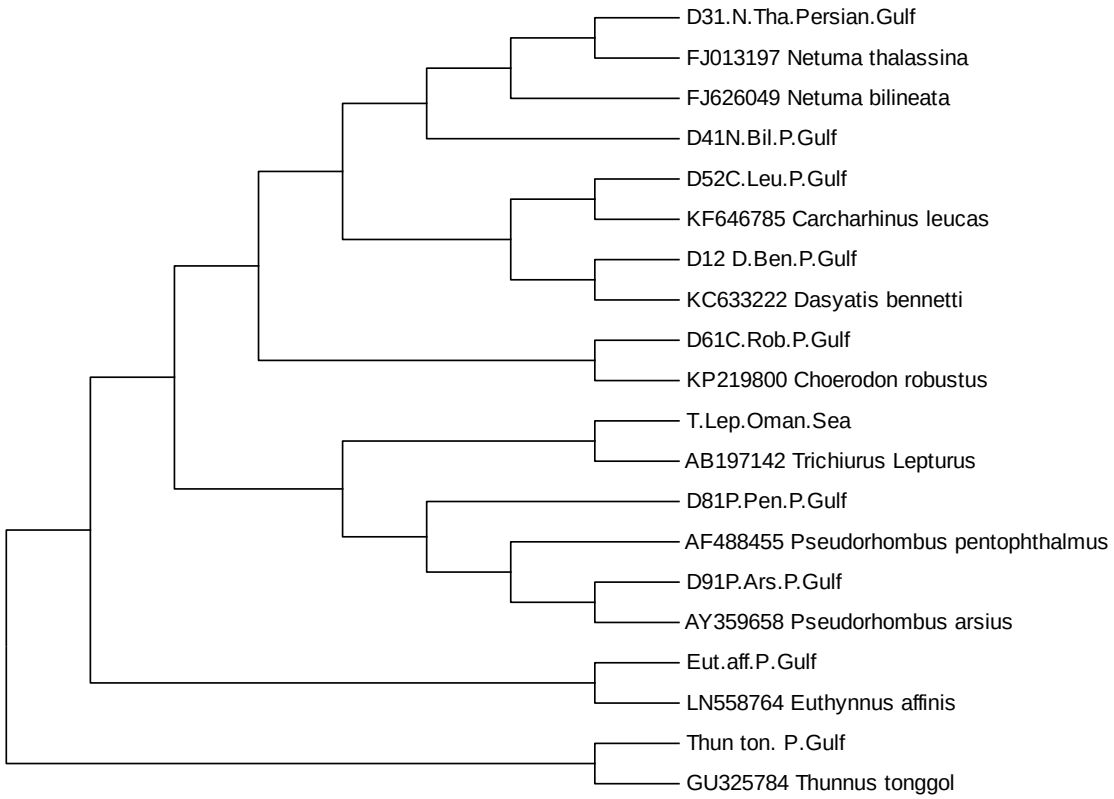
وضعیت جغرافیایی (topology) حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق بود که وجود دو کلاید اصلی و چهار کلاستر را نشان داد که نمونه های گونه های گربه ماهیان بزرگ و پوزه گرد و زمرد ماهی نوار اریب در کلاید اول کلاستر شده اند و همچنین سفره ماهی گزنده و کوسه ماهی شبه دندان کلاستر دوم را در کلاید اول به خود اختصاص داده اند . از سوی دیگر دو گونه از تون ماهیان (هوور معمولی و زرده) کلاستر اول و گونه یال اسبی به همراه دو گونه از کفشک ماهیان (کفشک پهن چپ رخ و کفشک پر لکه) کلاستر دوم را در کلاید بعدی به خود اختصاص داده اند . (شکل ۴).



شکل ۱۵: درخت تکاملی ژن 16SrRNA ۱۰ گونه از ماهیان مورد مطالعه به روش Neighbor-Joining



شکل۱۶: درخت تکاملی ژن 16SrRNA ۱۰ گونه ازماهیان مورد مطالعه به روش Maximum Liklihood



شکل۱۷: درخت تکاملی ژن 16SrRNA ۱۰ گونه از ماهیان مورد مطالعه به روش Maximum Parsimoney

جدول ۵: درصد فاصله ژنتیکی با استفاده از ژن 16s دربین گونه های مختلف ثبت شده

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. D31.N.Tha.Persian.Gulf																				
2. FJ013197 Netuma thalassina	0.01																			
3. D41N.Bil.P.Gulf	0.01	0.02																		
4. FJ626049 Netuma bilineata	0.01	0.02	0.02																	
5. D52C.Leu.P.Gulf	0.25	0.24	0.24	0.25																
6. KF646785 Carcharhinus leucas	0.24	0.24	0.24	0.25	0.07															
7. D61C.Rob.P.Gulf	0.13	0.15	0.14	0.15	0.26	0.27														
8. KP219800 Choerodon robustus	0.13	0.15	0.14	0.15	0.26	0.27	0.00													
9. D81P.Pen.P.Gulf	0.23	0.23	0.23	0.24	0.31	0.32	0.23	0.23												
10. AF488455 Pseudorhombus pentophthalmus	0.19	0.20	0.19	0.20	0.28	0.28	0.21	0.21	0.07											
11. D91P.Ars.P.Gulf	0.20	0.22	0.20	0.22	0.29	0.30	0.21	0.21	0.06	0.05										
12. AY359658 Pseudorhombus arsius	0.22	0.21	0.22	0.23	0.29	0.29	0.24	0.24	0.07	0.08	0.04									
13. D12 D.Ben.P.Gulf	0.30	0.28	0.30	0.29	0.17	0.17	0.27	0.27	0.34	0.29	0.31	0.31								
14. KC633222 Dasyatis bennetti	0.27	0.25	0.27	0.26	0.17	0.13	0.25	0.25	0.33	0.29	0.30	0.30	0.05							
15. T.Lep.Oman.Sea	0.28	0.28	0.29	0.29	0.34	0.37	0.25	0.25	0.17	0.19	0.18	0.19	0.32	0.33						
16. AB197142 Trichiurus Lepturus	0.29	0.31	0.29	0.30	0.41	0.41	0.25	0.25	0.20	0.21	0.19	0.23	0.35	0.34	0.09					
17. Eut.aff.P.Gulf	0.15	0.17	0.16	0.17	0.29	0.30	0.14	0.14	0.19	0.17	0.16	0.20	0.26	0.27	0.21	0.23				
18. LN558764 Euthynnus affinis	0.15	0.17	0.16	0.17	0.29	0.30	0.14	0.14	0.19	0.17	0.16	0.20	0.26	0.27	0.21	0.23	0.00			
19. Thun ton. P.Gulf	0.16	0.17	0.16	0.17	0.27	0.28	0.14	0.14	0.20	0.19	0.17	0.20	0.26	0.28	0.20	0.23	0.03	0.03		
20. GU325784 Thunnus tonggol	0.15	0.16	0.15	0.16	0.27	0.28	0.15	0.15	0.20	0.20	0.18	0.20	0.27	0.29	0.21	0.22	0.04	0.04	0.01	

	T(U)	C	A	G	Total
D31.N.Tha.Persian.Gulf	23.2	24.0	31.1	21.7	521.0
FJ013197 Netuma thalassina	22.6	24.4	31.2	21.8	509.0
D41N.Bil.P.Gulf	23.2	24.2	30.9	21.7	521.0
FJ626049 Netuma bilineata	23.5	23.5	30.8	22.2	510.0
D52C.Leu.P.Gulf	27.7	19.7	32.9	19.7	519.0
KF646785 Carcharhinus leucas	28.9	18.8	33.3	19.0	501.0
D61C.Rob.P.Gulf	22.2	25.0	30.4	22.4	519.0
KP219800 Choerodon robustus	22.2	25.1	30.5	22.2	518.0
D81P.Pen.P.Gulf	23.3	25.8	28.7	22.3	520.0
AF488455 Pseudorhombus pentophthalmus	23.0	25.2	28.5	23.4	492.0
D91P.Ars.P.Gulf	23.1	25.2	28.7	22.9	519.0
AY359658 Pseudorhombus arsius	21.6	26.6	27.8	24.1	482.0
D12 D.Ben.P.Gulf	27.1	21.3	31.1	20.5	521.0
KC633222 Dasyatis bennetti	27.0	21.8	30.4	20.8	519.0
T.Lep.Oman.Sea	20.4	27.6	30.5	21.4	485.0
AB197142 Trichiurus Lepturus	19.5	28.8	29.3	22.4	482.0
Eut.aff.P.Gulf	23.2	24.4	29.0	23.4	521.0
LN558764 Euthynnus affinis	23.2	24.4	29.0	23.4	521.0
Thun ton. P.Gulf	22.6	24.8	29.6	23.0	521.0
GU325784 Thunnus tonggol	23.0	24.6	29.2	23.2	521.0
Avg.	23.6	24.2	30.2	22.1	511.1

جدول ۶: ترکیب نوکلوتیدی توالی های ژن 16SrRNA در گونه های مورد مطالعه

۵- بحث و نتیجه گیری

بانک ژن میتواند از ژن ها با صفات خاص و همچنین سلول ها را محافظت کند. این ژنها بعد ممکن است مفید باشد زمانی که برخی از حملات همه گیری بیماری، زمانی که تغییرات آب و هوا و یا زمانی که عوامل دیگر بقای گیاهان یا حیوانات را تهدید کند. سلول یا بافت های ذخیره شده - برای بازگرداندن تنوع ژنتیکی و یا به معرفی صفات از نژادهای دیگر بسیار مورد توجه میباشند . ارتقاء بازده اقتصادی در سیستم های آبزی پروری ،عمیقاً به برنامه های اصلاح نژاد و آمیزش های هدفمند بین مولدین وابسته است .یک دلیل برای حفاظت از تنوع ژنتیکی آبزیان تهیه بانک ژن است .گام نخست درتشکیل بانک ژن زنده آبزیان آگاهی و شناخت کامل از وضعیت ساختار ژنتیکی آنها است تا بتوان بر اساس مارکرهای ژنتیکی هریک از جمعیت ها را شناسایی و برای آن خزانه ژنی مجزا و تفکیک شده ای تشکیل داد.با اینحال این خطر همواره وجود دارد که در دراز مدت ،عدم شناسایی و ضعف مدیریت صحیح بر ذخایر ژنتیکی موجب افزایش ضریب همخونی در جمعیت های والدی در کارگاه های تکثیر گردد.افزایش ضریب همخونی باعث کاهش تنوع ژنتیکی میگردد که به نوبه خود توان پاسخ به انتخاب را در نسلهای آتی کاهش داده و در نهایت منجر به کاهش رشد ،بازماندگی و خصوصیات تولید مثلی خواهد شد. بنا براین با اطلاع از ذخایر ژنتیکی و تولید بانک ژن از منابع ژنتیکی آبزیان مخصوصا میگو میتوان به افزایش تولید کمک کرد.

به منظور تهیه بانک ژن و بررسی و مطالعات ژنتیکی به یک منبع اولیه از DNA نیاز می باشد. جهت استخراج DNA از بافت های آبزیان روشهای مختلفی وجود دارد مثل روش فنل کلروفرم (Hillis and Moritz 1990)، روش اتانول (Shaw 1990)، کیت (McQuein et al.2000)، CTAB (Mayet al.1997) و روشهای دیگر. هر یک از روش های عنوان شده مزایا و معایبی دارند. در تحقیق حاضر جهت استخراج DNA از بافت باله شکمی در تهیه بانک ژن و از روش فنل- کلروفرم استفاده گردید. DNA های استخراج شده دارای کیفیت و کمیت (۱۰۰ ماکروگرم در ماکرولیتر) قابل قبولی جهت انجام PCR بودند به طوری که تمامی محصول PCR روی ژل آگارز بدون هیچ گونه آلودگی پروتئینی و یا باند اضافه مشاهده شدند.1999 ,Tagart *et, al.*). استفاده از روش فنل کلروفرم از متداول ترین روشها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در تهیه بانک ژن می‌باشد و به رغم سمی بودن تعدادی از مواد مورد استفاده، برای بافت هایی که طولانی مدت در الکل یا فریزر نگهداری شده اند و یا دارای بافت چربی دار هستند روش مناسبی است که در آن نسبت به بقیه روش ها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر است (Bonnauld et al.1994).

در یک مطالعه با هدف معرفی روش بهینه استخراج DNA از دو بافت باله و فلس اردک ماهی از طریق مقایسه سه روش فنل - کلروفرم، روش نمک فوق اشباع واستات آمونیوم صورت پذیرفت. برای انجام این مقایسه از ۹۰ نمونه باله و فلس اردک ماهی جمع آوری شده از استانهای گیلان و مازندران استفاده شد. پس از تخلیص DNA

از دو بافت مذکور پارامتر های کمی و کیفی به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ و همچنین قابلیت تکثیر DNA توسط نشانگر ریزماهواره و با استفاده از آغازگر ELU19 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد بالاترین کارایی در مواردی که غلظت DNA واجد اهمیت می‌باشد به ترتیب ازروش فنل – کلروفرم و بافت باله حاصل می شود و در مواردی که غلظت اهمیت کمتری دارد روش نمک اشباع و بافت باله یا فلس نتایج بهتری در بر خواهند داشت. همچنین با توجه به نتایج PCR-SSCP اندازه باندهای حاصله ۱۵۰ bpبود و کیفیت باند ها در بافت باله با استفاده از روش فنل - کلروفرم و نمک اشباع نسبت به فلس با سه روش به کاربرده دیگر بهتر بود.(تبرک و همکاران۱۳۹۳)

وانا و همکاران (۲۰۰۴) جهت استخراج DNA از بافت منجمد شده ماهیچه و بررسی مولکولی جمعیت های گونه میگوی موزی از روش فنل- کلروفرم استفاده نمودند. خامنامتونگ و همکاران (Khamnamtong et al.2009) نیز جهت بررسی ساختار ژنتیکی میگوی ببری سیاه از روش فنل- کلروفرم جهت استخراج DNA از پای منجمد شده میگو استفاده کردند.

سلیمانی و همکاران ۱۳۹۳ جهت استخراجDNA از کپور ماهیان در منطقه خوزستان از از روش فنل- کلروفرم استفاده نمودند.

همچنین کشیری و همکاران ۱۳۹۳در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه) (caspicus Rutilus rutilus در مناطق انسلی و گمیشان با استفاده ازنشانگر ریزماهواره از روش فنل- کلروفرم با استفاده از رسوب اتانولی طبق روش Hillis و همکاران در سال ۱۹۹۶ استفاده کردند که با توجه به استخراج مناسب محصول PCRجهت توالی بسیار مناسب بدست آمد.

خالدی و همکاران ۱۳۹۱ نیز در بررسی ساختار جمعیتی ماهی راشگوبه روش توالی یابی ژن 28S از روش فنل- کلروفرم با استفاده از رسوب اتانولی استفاده کردند که با توجه به استخراج مناسب با این روش قسمتی از ژنوم به خوبی امپلیفای گردید.

از آنجا که ذخیره مناسب و پایای نمونه های انسانی و جانوری ضامن تامین نمونه های تحقیقاتی مورد نیاز در این زمینه است، از رو شهای مختلفی برای حفظ نمونه ها از جمله نگهداری در دمای -۷۰$^{\circ}$C وهمچنین نگهداری در ازت مایع استفاده می شود.. در تهیه بانک ژن در این پروژه از از روش نگهداری نمونه ها در دمای منهای ۸۶ استفاده گردید.

در این مطالعه، ژن mtDNA ، 16S rRNA با موفقیت آمپلی فای و توالی شد. دو روش مختلف تجزیه و تحلیل رابطه فایلوژنی یعنی درخت Maximum Parsimony و Nighbor Joining که بترتیب با توجه به داده های کلادیستیکی و فنتیکی به منظور تعیین روابط بین اعضای گونه های مطالعه شده استفاده میکنند برای تهیه بانک ژن استفاده شد.

یکی از اهداف مهم تهیه بانک ژن ، حفاظت از گونه های بومی و اندمیک منطقه خلیج فارس میباشد . در این مطالعه گونه هایی که از نظر تکاملی پست تر از گونه های دیگر منطقه میباشند در یک کلاید قرارگرفتند که خانواده گربه ماهیان به همراه کوسه و سفره ماهیان از آن جمله بوده که در کلاید اول قرار گرفتند و اختلاف ژنتیکی ۲۵ درصدی بین سفره ماهی و گربه ماهیان در این منطقه دو از انتظار نبود .از سوی دیگر خانواده تون ماهیان به همراه ماهی یال اسبی و کفشک ماهیان در کلاید بعدی قرار گرفتند . نکته قابل توجه در این زمینه شناسایی گونه ای از کفشک ماهیان به نام Pseudorhombus pentophthalmus میباشد که به صورت یک هاپلوتایپ جدید با اختلاف ژنتیکی ۷ درصدی از دیگر نمونه های ثبت شده در بانک جهانی ژن متمایز شده است و به همراه دیگر گونه های دیگر کفشک ماهیان (P.arsius) مورد مطالعه در این تحقیق با یک اختلاف بالای ژنتیکی تقریبا مشابه متمایز شده است. این گونه تاکنون در آبهای خلیج فارس مشاهده نگردیده و مشخصات مورفومتریکی و ظاهری آن بیشتر شبیه P.asius میباشد. اگر این فرضیه به اثبات برسد میتوان این گونه را به عنوان یک گونه و یا مورفوتایپ جدید و اندمیک منطقه خلیج فارس مورد بررسی قرار داد. لذا لزوم تهیه بانک ژن این واریته اجتناب ناپذیر میباشد که در این پروژه از این گونه بافت و DNA تهیه گردید .

منطقه ژنی 16SrRNA با جهش کم حفظ شده و دارای یک نرخ پایین از تکامل میباشد (Mayer 1994).به این معنی که ممکن است این ژن را بیشتر برای افتراق بین گونه ای از درون گونه ای بکار برد. به این ترتیب، با تجزیه و تحلیل این ژن (16S r RNA) به نظر می رسد که دو morphotypes ممکن است دو گونه متفاوت باشد.

Chakraborty وهمکاران ۲۰۰۶ به بررسی تاکسونامی و رابطه فایلوژنی ماهی یال اسبی در ۴۳ نمونه از اینگونه در آبهای سواحل غربی آفریقا و هند غربی و اقیانوس آرام به جهت وجود مورفوتایپهای مختلف و رنگهای متنوع پرداختند که در نهایت از ۵۰۹ جفت باز بدست آمده ۵۸ سایت متغیر شناسایی گردید . انالیز فیلوژنی با استفاده از اندیس های Parsimoney و Nighbor Joining نشان دادند که هاپلوتایپهای بدست آمده از مناطق غرب آفریقا و ایندو پاسیفیک و سواحل غربی اقیانوس آرام بصورت مشهود و بدون همپوشانی از یکدیگر متمایز میباشند. همچنین تحقیقات مورفولوژیکی و ژنتیکی قبلی در این زمینه نیز موید این نظریه بوده و به احتمال زیاد سه جمعیت متفاوت میباشند.

Maggioni و همکاران (۲۰۰۱) بر روی یک مورفوتیپ از میگوی صورتی، *Farfantepenaeus subtiliss* به عنوان "مورفوتیپ II" با استفاده از توالی ژن 16S rRNA مطالعاتی انجام دادند. این مطالعه واگرایی ژنتیکی بالایی (۴-۶ درصد) در هنگام مقایسه این مورفوتایپ با مورفوتیپ دوم و نسبت به دیگر گونه های Farfantepenaeus نشان داد.

با این حال، اگر داده ها در حال حاضر به دست آمده انعکاس واقعی از ترکیب ژنتیکی گونه های مورد استفاده در تهیه بانک ژن باشد میتوان استنتاج کرد که ترکیب ژنی گونه های مورد بررسی و ارتباط فایلوژنی آنها دور از انتظار نبود ولی جداسازی ۹ هاپلوتایپ از نمونه های ده گونه از ماهیان منطقه در مقایسه با نمونه های ثبت شده

بسیار قابل تامل میباشد.تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری وضوح خوب واگرایی ژنتیکی میان گونه های مختلف مورد اقدام برای تهیه بانك ژن را نشان داد. این نوع تحلیل را می توان به عنوان یك ابزار مهم برای در انتخاب مولدین در برنامه های اصلاحی و همچنین باز سازی ذخایر این کونه ها استفاده کرد. در این موردمیبایست، مدیریت های مختلف در برنامه broodstocking اجرا گردد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان می دهد که در برسیهای ژنتیکی و تهیه ژن بانکها گاها مواردی که میتوان متمایز کننده مورفوتایپ های جدید باشد مهم میباشد.

پیشنهادها

۱ – گونه های مهم و اقتصادی بیشتری در تهیه بانک ژن ماهیان خلیج فارس و دریای عمان مورد توجه قرار گیرد.

۲ – در تهیه بانک ژن ،بانک سلولی آبزیان و تشکیل آزمایشگاه کشت سلول جانوری آبزیان خلیج فارس نیز به منظور دسترسی جامعه علمی کشور به رده های سلولی و هیبریدوماهایی که کاربرد آنها در واکسیناسیون و تحقیقات بنیادی - کاربردی مهم میباشد مورد توجه قرار گیرد.

۳ – اهدای بافت یا سلول های شاخص و بارزش ژنتیکی از طرف مراکز تحقیقاتی داخل و خارج از کشور مورد توجه قرار گیرد.

۴ - شناسائی ساختار ژنتیکی گونه های در معرض تهدید و در حال انقراض ، تهیه شناسنامه و ثبت کامپیوتری مشخصات سلولهای ذخیره شده و ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه با همکاری کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان مورد توجه قرار گیرد.

۵ - حفظ و نگهداری گونه های مهم وقابل نگهداری در شرایط پایلوت و تکثیر آنها مورد توجه قرار گیرد .

۶ - انتقال بین گونه ای ژن‌های مطلوب از خویشاوندان وحشی به گونه های اهلی در آبزیان در برنامه های به نژادی مورد توجه قرار گیرد.

۷ - افزایش آگاهی های عمومی در زمینه حفاظت ذخایر ژنتیکی از طریق چاپ و انتشار کاتالوگ ها و اطلاعات لازم برای حفاظت و ارزیابی و بهره برداری منابع ژنتیکی آبزیان منطقه مورد بررسی و توجه قرار گیرد.

۸ - برگزاری کارگاه های آموزشی بین المللی سالانه (بیشتر با کشور های حوزه خلیج فارس و دریای عمان) در جهت بررسی وضعت موجود و حفاظت و ارزیابی و بهره برداری از منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی و توجه قرار گیرد.

منابع

- تبرک مونا، کلباسی مسجد شاهی محمدرضا، علوی یگانه محمد صادق. ۱۳۹۲ . مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از باله و فلس اردک ماهی (Esox lucius). ژنتیک در هزاره سوم. ۱۱ (۳) :۳۲۰۰-۳۲۰۵
- تیرانی، ن.، تمدنی جهرمی، س.، روز بهانی، ش.، ۱۳۹۲. تنوع ژنتیکی ماهی سرخو منطقه خلیج فارس و دریای عمان توسط ژن 12SrRNA به روش تعیین توالی. همایش ملی علوم جانوران آبزی، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، ۵-۷ شهریور.
- سلیمانی ،ن ،محمدی ،غ و خدادادی ، م ، ۱۳۹۳ بررسی تنوع ژنتیکی ماهی Cyprinus carpio پرورشی در استان خوزستان با استفاده ازروش ریزماهواره ها. مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی -ملکولی دوره چهارم، شماره چهاردهم،
- کشیری ح ، شعبانی ، ع ، شعبانپور ف ، رضایی،م ۱۳۹۰بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه *Rutilus rutilus caspicus*در مناطق انسلی و گمیشان با استفاده ازنشانگر ریزماهواره. مجله علوم و فنون دریایی دوره۱ ، شماره ۴
- خالدی، ه.، رضوانی گیل کلایی، س.، ذوالقرنین، ح.، سواری، ا.، صفاهیه، ع.، ۱۳۹۱. مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی در جمعیت راشگو معمولی (*Eleutheronema tetradactylum*) در خلیج فارس و دریای عمان به روش توالی یابی ژن 28SrRNA. مجله دامپزشکی ایران، ۸(۱): ۳۳-۴۱.
- صفری ، م ، ۱۳۸۵ . بررسی ساختار جمعیت ماهی شیپ (*A. nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش ماکروساتلایت. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات . دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ ص.
- قرایی، ا.، غفاری، م.، ۱۳۹۰. کاربرد ژنتیک مولکولی در مطالعات آبزیان. سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی، (۱) :۳۷-۲۲.
- نوروزی ، م ، ۱۳۸۶ . بررسی ساختار جمعیتهای ماهی ازون برون (*Acipenser steilatus*) دریای خزر با استفاده از روش ملکولی میکروساتلایت. رساله دکتری رشته بیولوژی دریا . دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات۱۶۹ ص.

- Alexeyev, M. F., Ledoux, S. P. and Wils, G. L. 2004. Mitochondrial DNA and aging. *Clinical Science*, 107: 355-364.
- Berrebi, P., 1995. Speciation of the Genus barbus in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. *Biological conservation*, 72:237-249.
- Billington, N., Hebert, P.D.N. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish and Aquat. Sci*., 48:80-94.
- Bonnauld, L., Boucher-Rodoni, R., Monnerot, M., 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16SrDNA nucleotide sequences. C. R. de l'Acad. Sci., Paris, *Sciences de la vie/Life Sci*., 317:575-580.
- Brown, W.M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. Pp. 62-88 *in* M. NEI and R. K. KOEHN, eds. Evolution of genes and proteins. Sinauer, Sunderland, Mass.

- Brown, R.P., Terrasa, B., Pérez-Mellado, V., Castro, J.A., Hoskisson, P.A., Picornell, A., Ramon, M.M. 2008 . Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in BalearicIsland lizards. *Molecular Phylogenetics*, 48:350-358.
- Bruford, M., Bradley, D., Luikart, G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. *Genet.*, 3:900-910.
- Biagi, P. and Nisbet, R. 2006. The prehistoric fisher-gatherers of the western coast of the Arabian Sea: A case of seasonal sedentarization, *World Archaeology*, 38: 220-238.
- Bruford, M.w., Cheesman, D.J., Coote, T., Green, H.A.A., Haines, S.A. and Oryan, C. 1996. Microsattelite and their application to conservation genetics. In Smith, T.B.,Wayne, R.K. (Eds.), Molecular Genetic approaches in conservation. Oxford University press, Oxford, PP. 278- 297
- Cattaneo, C Cognetti, G., Maltagliati, F. 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 48:811-812.
- Chakraborty, A. and Iwatsuki Y.(2006). Genetic Variation at the Mitochondrial 16S rRNA Gene among *Trichiurus lepturus* (Teleostei:Trichiuridae) from Various Localities: Preliminary Evidence of a New Species from West Coast of Africa,Hydrobiologia, Volume 563, Issue 1, pp 501-513
- Dunham, R.A. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology Genetic Approaches. CABI Publishing, University of Auburn. Cambridge, MA 02139.385P.
- Hara, M. and Sekino, M. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture,* 217: 107-114.
- Hillis, D.M., Moritz, C. 1990. Molcular taxonomi.Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
- Khamnamtong, B., Klinbunga, S., Menasveta, P. 2009. Genetic Diversity and Geographic Differentiation of the Gaint Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand Analyzed by mithochondrial COI sequencs. *Biochem Genet*., 47:42-55.
- Kai, Y., Nakayama, K. and Nakabo, T. 2002. Genetic differences among three colour morphotypes of the black rockfish, *Sebastes inermis*, inferred from mtDNA and AFLP analyses. *Molecular Ecology*, 11(2): 591-2598.
- Kucuktas, H. and Liu, Z. 2007. Allozyme and mitochondrial markers, Aquaculture Genome Technologies, edited by Z Liu. Blackwell Publishing, Ames, IA, pp. 73-85.
- Liu, Z. J. and Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Maggioni, R., Rogers, A. D. and Maclean, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 12: 3213-3217.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74(2):560-564.
- Mullis KB. 1986. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol*. vol. 51 pp. 263–73
- Naderi, S., Rezaei, H.R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S.A., Naghash, H.R., Elbarody, M.A.A., Ertugrul, O., Pompanon, F. 2007: Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *PLoS ONE*, 2:10, e1012.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C. 1998. Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. and Fuerst, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361- 382.
- Rezvani Gilkolaei1, S., Kavan, S. L. and Safari, R. 2012. A Study of Genetic Structure of Rutilus frisii kutum in Anzali Lagoon, using Microsatellite markers. *Journal of Agriculture Science and Techonoly*. 14: 327-337.
- Sanger, F., Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol*., 94(3):441-448.
- Shaw, P.W., Turan, C., Wright, J.M., O'connell, M., Carvalho, G.R.1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis. *Heredity*, 83:490-499.
- Stepien, C.A., Kocher, T.D.1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Molecular Systematics of Fishes (eds Kocher TD, Stepien CA), 1-12. Academic Press, San Diego, CA
- Taggart, J. B., hynes, R. A., Prodohal, P. A. and Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40: 963-965.

- Tjensvoll, K., Heikkilä, R., Oltedal, S., Gilje, B., Oddmund, N . 2008. High-Fidelity DNA Polymerase Enhances the Sensitivity of a Peptide Nucleic Acid Clamp PCR Assay for K-ras Mutations. *Molecular Diagnostics*, 10:325-331
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy R, Bonner J, Hirose T, Itakura K 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ΦX 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic acids research*; 6(11):3543-3558

- .

Abstract

Genetic studies and gene banks preparation can identify guidelines for improving diversity and population structure and estimation, poaching and also the amount of cross breeding and provide genetic classification. In this study, sampling was performed from the important studied species habitats areas for the species such as: *Dasyatis bennetti* ،*Netuma thalassina, Netuma bilineata Carcharhinus leucas* ،*Choerodon robustus* ، *Pseudorhombus pentophthalmus* ،*Pseudorhombus arsius Thunnus tonggol* ،*Euthynnus affinis and Trichiurus lepturus*.

Total DNA extraction was performed using phenol - chloroform method which is the most common method for DNA extraction in order to achieve high quality of DNA was performed in the preparation of gene bank in this study.

After relevant studies on this gene primers were designed and in use. After editing the sequences, nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) was performed using NCBI blast main page.The sequences obtained from each sample were aligned and corrected from any ambiguities and assembled using Bio edit program .Trees were generated using maximum parsimony (MP), a character-based algorithm and neighbor joining (NJ) a distance-based algorithm for phenetic analysis. The distance matrix option of MEGA4 was used to calculate genetic distance according to the Kimura 2-parameter model of sequence evolution.

Based on the results obtained, the optical density of 260 to 280 nm in the samples was recorded between 1/8 - 2, indicating good quality DNA samples.

Optimized PCR reaction to 16SrRNA gene amplification using the gradient between 48 - 60° C showed that the most suitable criteria for binding primers, 54 to 58 Celsius degrees respectively.The project objectives including the identification of the genetic structure of the species, and draw the phylogenetic trees using two genes 16SrRNA, making identification and registration of specified computer storage and regulate the structure and management of mentioned species by focus on genetic resources 10 species of majour commercial and non-commercial fishes in the Persia Gulf and Oman Sea through the creation of an integrated network of aquatic genetic resources in the region to try to identify genetic resources and aquatic gene bank.This type of analysis could be considered as an important tool to be used in broodstock selection in breeding programs. Also identify the species of fish named as *Pseudorhombus pentophthalmus* with a new haplotype and genetic differences 7% in compare to the samples recorded in the World gene Bank can considered as a major achievements of this research.

Keywords: Gene bank, mtDNA ، Marine fish ،16S rRNA، Persian Gulf.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title : Fish gene bank of the Persian Gulf and Oman Sea
Approved Number: 014-12-12-8919-89211
Author: Ahmad Ghoroghi
Project Researcher : Ahmad Ghoroghi
Collaborator(s) *:* M. Pourkazemi, S. Rezvani, Gh. Salehi, F. Laloei, M.R. Hossieni, Kh. Aeinjamshid, M. Nazemi, H. Abdolhai, M.R. Azini, F. Ehteshami, S. Aminzadeh, F. Peshevarzad, A. Malolahi, E.Jorfi, R. Safari, E. Safavi, S. Hajrezaei, E. Maghsodlo, M. Aanjari, T. Valinasab, Y. Moradi, H. Hosseinzadeh
Advisor(s):A.A. Mottalebi
Supervisor:-
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 5 Years
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

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

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

Project Title :

Fish gene bank of the Persian Gulf and Oman Sea

Project Researcher :

Ahmad Ghoroghi

Register NO.

50849