دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش آبزیان

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی حلوا سیاه *Parastromateus niger* با استفاده از روش مولکولی AFLP

استاد راهنما:

دکتر ایمان سوری نژاد

استاد مشاور:

دکتر سید جواد حسینی

مهندس سید احمد قاسمی

نگارش:

مژده شریفی

شهریور ۱۳۹۲

تقدیم به پدر و مادرعزیزم

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش

آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم،دستان پرمهر پدرم

به مهربان ترین نگاه زندگیم، چشمان پر مهرمادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از

دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

را آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم،باشد

که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید.

بوسه بر دستان پرمهرتان

تشکر و قدردانی:

شکر و سپاس خدای را که بزرگترین امید و یاوردر لحظه لحظه زندگیست. بر خود لازم می دانم از زحمت تمام کسانی که در مراحل مختلف انجام این تحقیق مرا یاری رساندند مراتب قدردانی را به عمل آورم.

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد راهنمای عزیزم جناب دکتر ایمان سوری نژاد که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بوده اند.

از اساتید مشاور آقایان دکتر سید جواد حسینی و مهندس سید احمد قاسمی تشکر و قدردانی می نمایم. چرا که بدون راهنمایی هایشان انجام این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

از جناب آقای دکتر آرش اکبر زاده و جناب آقای دکتر شریفی که زحمت داوری این پایان نامه را به عهده گرفتند، سپاسگزارم.

از ریاست محترم و سایر پژوهشگران گرامی مرکز مطالعات و پژوهش های دانشگاه خلیج فارس- بوشهر که امکان به انجام رسیدن این پایان نامه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می نمایم.

همچنین از پدر و مادر و خانواده عزیز، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم سپاسگزاری می نمایم. در آخر از جناب مهندس احمد فقیه و جناب دکتر لالویی و خانم مهندس آویژگان و تمامی دوستان عزیزم به دلیل یاریها و راهنمایی های بی چشمداشت شان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند، تقدیر و تشکر می نمایم.

چکیده

ماهی حلوا سیاه *Parastromateus niger* جزء مهمترین ماهیان تجاری سواحل جنوبی ایران است که به دلیل افزایش آلودگی ها و بهره برداری و صید بی رویه ذخایر آن در حال کاهش می باشد و بنابراین ارزیابی جمعیت های این گونه به منظور حفظ ذخایر ارزشمند ژنتیکی آن ضروری است. در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۳۲ عدد ماهی حلوا سیاه در سه منطقه بندرعباس، بوشهر و آبادان با استفاده از نشانگر ملکولی AFLP با به کارگیری ۷ جفت ترکیب پرایمر *EcoRI*/*Mse*I بررسی شد. در مجموع ۳۸۱ باند قابل امتیاز دهی ایجاد شد که ۴۶ باند پلی مورف بودند (۱۲/۰۷٪). درصد باند پلی مورفیسم در ماهیان حلوا سیاه بوشهر (۹۱/۳۰٪)، نسبت به آبادان (۸۴/۷۸٪) و بندرعباس (۷۳/۹۱٪) بیشتر بود. بیشترین هتروزیگوسیتی بر اساس ضریب Nei و شاخص شانون به ترتیب در ماهیان حلوا سیاه بوشهر (۰/۱۶±۰/۳۸۱ و ۰/۲۱ ±۰/۵۴۸)، آبادان (۰/۱۸ ±۰/۳۴۵ و ۰/۲۴ ±۰/۵۰۱) و بندرعباس (۰/۲۰±۲۹۷ /۰ و ۰/۲۸ ±۰/۴۳۳) محاسبه شد. کمترین تعداد آلل های مشاهده شده و آلل موثر در جمعیت بندرعباس (۰/۴۴ ±۱/۷۳ و ۰/۴۰ ±۱/۵۳) و بیشترین در بوشهر (۰/۲۸ ± ۱/۹۱ و ۰/۳۴ ± ۱/۷۰) مشاهده گردید. بر اساس آنالیز PCA، ماهیان بندرعباس، آبادان و بوشهر همپوشانی بالایی ندارند و جمعیت های جدا از یکدیگر را مشخص می کنند. بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های آبادان و بندرعباس (۰/۲۵۸ و ۰/۷۷۳) و کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه های بوشهر و آبادان (۰/۱۵۹ و ۰/۸۵۳) مشاهده شد. آنالیز AMOVA بیانگر اختلاف بین جمعیتی ماهیان سه منطقه به میزان ۱۹٪ و اختلاف درون جمعیتی به میزان ۸۱ ٪ می باشد. کمترین مقدار Fst و بیشترین میزان جریان ژنی بین جمعیت بوشهر و آبادان (۰/۱۵۲ و ۲/۸۰) و بیشترین مقدار Fst و کمترین میزان جریان ژنی بین جمعیت بندرعباس و آبادان (۰/۲۱۹ و ۱/۲۴) برآورد شد. بر اساس درخت فیلوژنی حاصل از ضریب Nei بر اساس روش UPGMA، ماهیان سه منطقه نمونه برداری به دو کلاستر تقسیم شدند که در یک گروه نمونه های آبادان و بوشهر و در گروه دیگر نمونه های بندر عباس قرار گرفتند.

واژگان کلیدی: حلوا سیاه *Parastromateus niger*، نشانگر ملکولی AFLP، ساختار جمعیت، خلیج فارس

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱مقدمه ۲

۱-۱-۱ سوالات تحقیق ۷

۱-۱-۲ سوالات تحقیق ۷

۱-۱-۳ اهداف تحقیق ۷

۱-۱-۴ فرضیه هایی که در این تحقیق مطرح است ۷

۲-۲ کلیات ۸

۱-۲-۱ مروری بر خانواده گیش ماهیان ۸

۱-۲-۲ رده بندی ماهی حلوا سیاه ۹

۱-۲-۳ خصوصیات مورفولوژیک ماهی حلوا سیاه ۹

۱-۲-۴ خصوصیات تولید مثلی ماهی حلوا سیاه *Parastromateus niger* ۱۱

۱-۲-۵ جمعیت، ساختار جمعیت ۱۲

۱-۲-۶ ژنتیک جمعیت ۱۲

۱-۲-۷ تنوع ژنتیکی ۱۳

۱-۲-۸ تمایز ژنتیکی ۱۳

۱-۲-۹ فاصله ژنتیکی ۱۴

۱-۲-۱۰ نشانگرهای مولکولی ۱۴

۱-۲-۱۱ نشانگر مولکولی AFLP ۱۷

۱-۲-۱۱-۱ مراحل روش AFLP ۱۹

۱-۲-۱۱-۱-۱ هضم با آنزیم برشی ۱۹

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱-۲-۱۱-۱-۲ اتصال آداپتورهای الیگو نوکلئوتیدی..... ۲۰

۱-۲-۱۱-۱-۳ تکثیر پیش از مرحله انتخاب..... ۲۱

۱-۲-۱۱-۱-۴ تکثیر انتخابی ۲۲

۱-۲-۱۱-۱-۵ الکتروفورز فرآورده های PCR..... ۲۳

۱-۲-۱۱-۲ مزایای AFLP..... ۲۳

۱-۲-۱۱-۳ معایب AFLP..... ۲۴

۱-۲-۱۱-۴ کاربرد AFLP..... ۲۶

فصل دوم: مروری بر مطالعات ۲۷

۲-۱ مروری بر برخی مطالعات انجام شده AFLP در آبزیان در خارج از کشور ۲۸

۲-۲ مروری بر برخی مطالعات انجام شده AFLP در آبزیان در داخل کشور..... ۳۱

۲-۳ مروری بر برخی مطالعات ژنتیکی در گیش ماهیان و ماهی حلوا سیاه ۳۲

فصل سوم: مواد و روش ها ۳۵

۳-۱ مواد ۳۶

۳-۱-۱ مواد مصرفی جهت استخراج DNA و بررسی کیفیت و کمیت آن ۳۶

۳-۱-۲ مواد مصرفی جهت آزمایشات PCR ۳۶

۳-۱-۳ مواد مصرفی جهت ساخت آداپتورهای *Mse*I و *EcoR*I ۳۷

۳-۱-۴ مواد مصرفی جهت هضم آنزیمی ۳۷

۳-۱-۵ مواد مصرفی جهت اتصال آداپتور به DNA ژنومی ۳۸

۳-۱-۶ مواد مصرفی جهت الکتروفورز محصول PCR و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید ۳۸

۳-۲ وسایل و تجهیزات مورد نیاز..... ۳۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۳-۳ روش کار ۳۹

۳-۳-۱ نمونه برداری ۳۹

۳-۳-۲ تهیه و آماده سازی بافرها و محلول ها ۴۰

۳-۳-۲-۱ تهیه بافر STE (Sodium chloride، Tris، EDT) ۴۰

۳-۳-۲-۲ ساخت بافر TAE (10X) ۴۰

۳-۳-۲-۳ ساخت بافر TBE (10X) ۴۰

۳-۳-۲-۴ ساخت لودینگ بافر (Loading Buffer) ۴۰

۳-۳-۲-۵ ساخت SDS (سدیم دودسیل سولفات) ۱۰ درصد ۴۰

۳-۳-۲-۶ ساخت آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد (APS) ۴۱

۳-۳-۲-۷ آماده سازی محلول بایند (Bind) ۴۱

۳-۳-۲-۸ آماده سازی Ladder ۴۱

۳-۳-۲-۹ ساخت محلول اکریل آمید ۴۰٪ ۳۹

۳-۳-۲-۱۰ ساخت محلول اکریل آمید ۶٪ ۴۱

۳-۳-۳ استخراج DNA ژنومی ۴۱

۳-۳-۳-۱ مراحل استخراج فنل- کلروفرم ۴۲

۳-۳-۴ ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده ۴۳

۳-۳-۴-۱ روش اسپکترو فتومتری ۴۳

۳-۳-۴-۲ روش الکتروفورزی با استفاده از ژل آگارز ۴۴

۳-۳-۵ رقیق سازی نمونه ها ۴۶

۳-۳-۶ اجرای مراحل AFLP ۴۶

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۳-۳-۶-۱ واکنش هضم آنزیمی ۴۶

۳-۳-۶-۲ واکنش ساخت آداپتورها ۴۷

۳-۳-۶-۳ واکنش اتصال آداپتور به قطعات حاصل از هضم ۴۷

۳-۳-۶-۴ واکنش PCR پیش انتخابی ۴۸

۳-۳-۶-۵ واکنش PCR انتخابی ۴۹

۳-۳-۶-۶ الکتروفورز محصول بدست آمده از PCR انتخابی ۵۱

۳-۳-۶-۶-۱ آماده سازی دستگاه الکتروفورز جهت تزریق ژل ۵۱

۳-۳-۶-۶-۲ طرز ساخت ژل اکریل آمید ۶٪ ۵۱

۳-۳-۶-۶-۳ رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره ۵۲

۳-۳-۷ آنالیز داده ها ۵۳

فصل چهارم: نتایج ۵۴

۴-۱ نتایج بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده ۵۵

۴-۱-۱ روش الکتروفورز ۵۵

۴-۱-۲ اسپکتروفتومتری DNA ۵۵

۴-۲ بررسی کیفیت محصول PCR پیش انتخابی ۵۶

۴-۳ نتایج محصول PCR انتخابی ۵۶

۴-۳-۱ تعداد باندها و درصدباندهای پلی مورفیسم در ژل AFLP برای ۳ منطقه ۵۶

۴-۴ تنوع ژنتیکی جمعیت ها ۶۱

۴-۵ ساختار جمعیت ها ۶۴

فصل پنجم: بحث نتیجه گیری ۶۷

۵- بحث ۶۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۵-۱ تعداد نمونه مورد بررسی، تعداد پرایمر AFLP مورد استفاده، تعداد باند پلی مورفیسم ۷۰
۵-۲ تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی حلوا سیاه در خلیج فارس..... ۷۲
۵-۳ ساختار جمعیت ماهی حلوا سیاه در خلیج فارس ۷۷
۵-۴ نتیجه گیری کلی ۸۲
۵-۵آزمون فرضیات ۸۳
۵-۶ پیشنهاد پژوهشی ۸۳
منابع ۸۴

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۳-۱ توالی پرایمر *Mse*I/*Eco*RI استفاده شده در واکنش انتخابی PCR ۳۷

جدول ۳-۲ مقادیر مورد نیاز واکنشگرهای هضم آنزیمی برای نمونه های DNA در واکنش AFLP..... ۴۶

جدول ۳- ۳ مقادیر مورد نیاز واکنشگرهای اتصال آداپتور به قطعات حاصل از هضم در واکنش AFLP ۴۸

جدول ۳- ۴ مقادیر واکنشگرهای PCR پیش انتخابی در واکنش AFLP..... ۴۸

جدول ۳- ۵ چرخه حرارتی PCR پیش انتخابی در واکنش AFLP..... ۴۹

جدول ۳- ۶ مقادیر واکنشگرهای PCR انتخابی در واکنش AFLP ۵۰

جدول ۳- ۷ چرخه حرارتی PCR انتخابی در واکنش AFLP..... ۵۰

جدول ۴-۱ نمونه ای از امتیاز دهی باندهای پلی مورف در نرم افزار Excel..... ۵۶

جدول ۴-۲ تعداد باندهای کل و باندهای چند شکل امتیاز دهی شده حاصل از ۷ ترکیب پرایمر AFLP در ماهی حلوا سیاه ۵۷

جدول ۴-۳ نتایج حاصل از آنالیز الگوی آللی ماهیان حلوا سیاه بندرعباس، بوشهر و آبادان..... ۶۲

جدول ۴-۴ نتایج حاصل از پارامترهای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی حلوا سیاه در مناطق مختلف نمونه برداری..... ۶۳

جدول ۴-۵ شباهت ژنتیکی (بالا) و فاصله ژنتیکی (پایین) بر اساس ضریب Nei (1978) ۶۵

جدول ۴-۶ میزان جریان ژنی (*N*m) (پایین) و تمایز ژنتیکی (Fst) (بالا) بین جمعیت های ماهی حلوا سیاه در خلیج فارس..... ۶۵

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ ماهی حلوا سیاه *Parastromateus niger*..... ۱۰

شکل ۱-۲ خلاصه ای از مراحل روش AFLP..... ۱۸

شکل ۱-۳ مراحل اجرای AFLP. ساختار آداپتورها، جایگاه نوکلئوتید های انتخابی و جایگاه اتصال آغازگر به آداپتور..... ۲۱

شکل۳-۱ نقشه مناطق نمونه برداری در خلیج فارس..... ۳۹

شکل ۳-۲ دستگاه الکتروفورز افقی..... ۴۵

شکل ۳- ۳ دستگاه DNA sequencing gel (۳۸×۳۰)..... ۵۲

شکل ۴-۱ ژل آگارز جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده به روش فنل کلروفرم از ۱۱نمونه ماهی حلوا سیاه بوشهر..... ۵۵

شکل ۴-۲ الکتروفورز نمونه ای از محصول PCR پیش انتخابی بر روی ژل آگارز..... ۵۶

۴-۳ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACA/M-CCG)..... ۵۸

۴-۴ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACC/M-CCG)..... ۵۸

۴-۵ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACC/M-CCC)..... ۵۹

۴-۶ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACA/M-CAA)..... ۵۹

۴-۷ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACA/M-CCC)..... ۶۰

۴-۸ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-AAC/M-CAA)..... ۶۰

۴-۹ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر (E-ACC/M-CCG)..... ۶۱

نمودار ۴-۱ نمودار حاصل آنالیز الگوی آللی ماهیان حلوا سیاه (Pop 1 بندرعباس،Pop 2 بوشهر وPop 3 آبادان)..... ۶۲

شکل ۴-۱۰ آنالیز PCA برای ماهیان حلوا سیاه بندرعباس..... ۶۴

شکل ۴-۱۱ آنالیز واریانس ملکولی (AMOVA) بین و درون جمعیتی نمونه های ماهی حلوا سیاه..... ۶۴

شکل ۴-۱۲ نمایش خوشه ای فاصله ژنتیکی نمونه های ماهی حلواسیاه در خلیج فارس بر اساس NTSYS..... ۶۶

شکل ۴-۱۳ نمایش خوشه ای فاصله ژنتیکی نمونه های ماهی حلواسیاه در خلیج فارس بر اساس روش UPGMA..... ۶۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

از اواسط دهه ۱۹۸۰، تحقیقات در زمینه ژنتیک و زیست فناوری در آبزی پروری و شیلات رشد پیوسته خود را آغاز کرده است و در حال حاضر تحقیقات در این زمینه بسیار فعال است. از جمله ی 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 (Dunham, 2004).

تغییرات شرایط اقلیمی و جغرافیایی طی سالهای متمادی بر جمعیت های آبزیان تاثیر گذاشته و سبب تغییرات در تنوع ژنتیکی یا انقراض گونه ها گردیده است. تنوع ژنتیکی، قابلیت بقای یک گونه یا جمعیت را از طریق ایجاد توانایی سازگاری با تغییرات محیطی فراهم می کند و بنابراین وجود تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است. به طور کلی مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است. بنابراین آگاهی و برسی دایمی وضعیت ژنتیکی گونه هایی که در معرض بهره برداری و صید بی رویه قرار دارند، برای حفظ و مدیریت آنها ضروری است. به عبارت دیگر دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان و تمایز جمعیتهای متفاوت و آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی یکی از مولفه های بسیار مهم و اساسی در موفقیت و دستیابی به مدیریت پایدار زیست شناختی و ژنتیکی و به عنوان پیش نیازی برای حفظ جمعیت ها و سازگاری آنها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می گردد (Diz and Persa, 2009).

تمایز جمعیتهای متفاوت آبزیان به سه روش متداول مانند استفاده از ویژگیهای ریخت شناسی، نشانگرهای پروتئینی و مولکولی (DNA و mtDNA) انجام می گیرد. در گذشته بیشتر، ارزیابی ذخایر و تشخیص گونه ها و جمعیت ها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک صورت می گرفت اما با توجه

به حساسیت بالای این صفات و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها، علم استفاده از نشانگرهای ملکولی همچون ریزماهواره، AFLP، RAPD و RFLP جهت شناسایی ساختار ژنتیکی آبزیان توسعه یافته است. امروزه هدف اصلی استفاده از نشانگرهای مولکولی در تحقیقات ژنتیک آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تشخیص وسعت تنوع ژنتیکی داخل و بین گونه ها و محاسبه این تنوع، ارتباطات گونه ای، سیستماتیک و طبقه بندی گونه ها، نقشه یابی و ردیابی ژنها، تعیین جنسیت و... می باشد (Adams and Hutchings, 2003).

روش استفاده از تفاوت در توالی های DNA از دقیقترین روش ها در طبقه بندی موجودات بوده و دور از هرگونه خطا است و امروزه نشانگرهای DNA به ابزاری قابل اعتماد در مطالعات تنوع گونه ای تبدیل شده اند (Templeton, 2002). بطور معمول در توالی نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن یا بخشی از یک ژن در گونه‌های مختلف یا حتی در افراد مختلف یک گونه، تفاوت‌هایی به چشم می‌خورد که هر چند این تفاوت‌ها بسیار اندک می باشند ولی می‌توانند به عنوان ملاکی جهت بررسی تنوع ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گیرند (Cronin *et al*., 1994). یک نشانگر ملکولی مناسب باید خصوصیاتی از قبیل توارث مندلی، پلی مورفیک بودن، هم بارزی، خنثی بودن، مستقل بودن از محیط، نداشتن اپیستازی و تکرار پذیری بالا در طول ژنوم را دارا باشد.

تکنیک AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) یا بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از قطعات برش خورده و تکثیر شده DNA نشانگر جدیدی است که تمام ویژگی های یک نشانگر ملکولی مناسب، غیر از همبارز بودن را دارا می باشد؛ اما به علت پلی مورفیسم بالایی که تشخیص می دهد، خصوصاً در مواقعی که روابط نزدیکی وجود دارد از کارآمد ترین نشانگرها می باشد (Bonin *et al*., 2005).

تکنیک AFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده و تلفیقی از روش های RFLP و RAPD می باشد که بر مشکلات آنها فائق آمده است (Liu and Cordes, 2004). هدف اولیه آن در زمینه تعیین تنوع ژنتیکی مشابه RFLP است اما به جای بررسی یک لوکوس در زمان معین، امکان بررسی لوکوس‌های بسیاری را به طور همزمان فراهم می‌کند. همچنین این روش ظرفیت شناسایی جهش های نقطه ای بیشتری را نسبت به RFLP داراست (Vos *et al*., 1995). در مقایسه با روش RAPD، به دلیل حساسیت بالای این نشانگر به مسائلی از قبیل شرایط واکنش، غلظت DNA الگو و خلوص آن و همچنین برنامه دمایی PCR، کاربرد آن محدود شده است. شرایط دمای اتصال AFLP قابلیت تکثیر بیشتری را تضمین می کند (Folkertsma *et al*., 1996). همچنین در مقایسه با سایر نشانگرهای ژنتیکی، نشانگرهای AFLP دارای کارایی بسیار در ارزیابی تنوع درون جمعیتی و بین جمعیت ها می باشند. در این روش نیاز به اطلاع اولیه از ژنوم موجود نمی باشد و حتی اگر هیچ اطلاعی از توالی ژنوم گونه موجود نباشد محدودیت ایجاد نمی کند (Ajmone- Marsan *et al*., 2001; Knijff *et al*., 2001). در مطالعه ای مقایسه ای که توسط Liu در سال ۲۰۰۷ با استفاده از نشانگر AFLP و ریزماهواره انجام شد بیان گردید که احتمالا AFLP نیز نسبت به ریزماهواره برای مطالعات ژنتیک جمعیتی بهتر است چون توانایی نمایش دادن صدها عدد باند در یک زمان را داراست. بنابراین قابلیت بررسی لوکوس های زیاد در یک آنالیز از مزیت های این نشانگر می باشد که به طور قابل ملاحظه ای هزینه را در یک آنالیز کاهش داده و همچنین پلی مورفیسم زیادی را نشان می دهند (Vos *et al*., 1995). در جمع بندی، AFLP یکی از نشانگرهای ژنتیکی قوی است که کاربرد وسیعی در سیستماتیک مولکولی، آنالیز ساختار جمعیت، مهاجرت، شناسایی هیبریدها و نژادها، بررسی تنوع ژنتیکی در گونه ها و بین جمعیت ها، اکولوژی مولکولی، تهیه نقشه ژنومی و شناسایی گونه های در معرض خطر دارد. به کارگیری این روش در مطالعات ژنتیک جمعیت ماهی در حال افزایش است و در آینده احتمالا وسیع تر خواهد شد (Liu and Cordes, 2004 ؛ Liu, 2007).

شرایط زیست محیطی مناسب در خلیج فارس باعث گردیده که این منطقه محل زیست گونه های متعددی از آبزیان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری باشد. گونه های مختلفی از آبزیان کفزی، نزدیک به کف، صخره ای و جزایر مرجانی و همچنین سطح زیان مهاجر در خلیج فارس دیده می شوند (Siddeek *et al*., 1999). در میان ماهیان سطح زی، گیش ماهیان Carangidae دارای اهمیت بسیار بالایی در زمینه های غذایی، صنعتی و تجاری هستند. خانواده گیش ماهیان گستره وسیعی از گونه‌های مختلف و دارای اهمیت اکولوژی و اقتصادی را تشکیل می دهند. در جهان بیش از ۳۲ جنس و ۱۴۰ گونه از خانواده گیش ماهیان شناخته شده است و در آبهای خلیج فارس و دریای عمان نیز تاکنون ۴۵ گونه شناسایی شده است که اغلب دارای ارزش اقتصادی می باشند. ماهی حلوا سیاه Black pomfret (*Parastromateus niger*) از خانواده گیش ماهیان، یک گونه بنتوپلاژیک است و الگوی مهاجرت عمودی روزانه از بستر های گلی (در عمق ۴۰-۱۵ متر) دارد. روزها در نزدیک بستر و شبها به سوی سطح می آید، دارای شنای کند است و معمولاً بصورت گله ای[1] شنا می کنند (Carpenter *et al*., 1997). ماهی حلوا سیاه در سراسر فلات قاره هند و غرب اقیانوس آرام، سواحل شرقی آفریقای جنوبی و اندونزی، استرالیا و سواحل جنوبی ژاپن و چین و در دریاهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله خلیج فارس و دریای عمان پراکنش دارد (Bannikov, 1987). تخم ریزی در ماهی حلوا سیاه در دریای عمان و حوزه شمالی و جنوبی خلیج فارس در تمامی ماه های سال به غیر از دی ماه اتفاق می افتد ولی اوج تخمریزی در فصل تابستان و تیر می باشد (نیامیمندی، ۱۳۶۹؛ رزمجو و خضرائی نیا، ۱۳۷۲؛ محمد خانی، ۱۳۷۵). این موضوع نشان دهنده این است که حلوا سیاه تناوب تخم ریزی طولانی مدت در خلیج فارس و با همبستگی بالا با دوره افزایش درجه حرارت آب دریا دارد (Dadzie and Abou-Seedo, 2008).

[1] schooling

ماهی حلوا سیاه علاوه بر اهمیت بوم شناختی، به دلیل ارزش غذایی زیاد، در بازارهای داخلی و جهانی از اهمیت زیادی برخوردار است. طبق آمار سازمان شیلات در سال ۱۳۹۰، صید ماهی حلوا سیاه حدود ۵۴۶۸/۸ تن از صید کفزیان را در استانهای جنوبی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان تشکیل داده است. بیشترین میزان صید ماهی حلوا سیاه در سواحل شمالی خلیج فارس طی ماههای اسفند و فروردین صورت می گیرد که بیشترین سهم میزان صید در سواحل هرمزگان و به میزان ۱۷۱۶ تن بوده است. اگر چه ماهی حلوا سیاه از نظر اقتصادی در دنیا بسیار ارزشمند است اما اطلاعات کمی از ساختارهای ژنومیک آن گزارش شده است. درک ساختار ذخایر ماهیان یکی از مولفه های بسیار مهم و اساسی در دستیابی به مدیریت پایدار زیست شناختی است (Shaklee and Currens, 2003).

به دلیل افزایش آلودگی ها و بهره برداری و صید بی رویه ماهی حلوا سیاه در خلیج فارس ذخایر آن در حال کاهش می باشد و بنابراین ارزیابی جمعیت های این گونه به منظور حفظ ذخایر ارزشمند ژنتیکی آن بسیار ضروری است. بهره برداری از ذخایر آبزیان بدون دانستن ساختار جمعیتی آنها باعث از بین رفتن ساختارهای ژنتیکی جمعیت ها و گونه ها و همچنین بالا رفتن آسیب پذیری گونه ها نسبت به شرایط محیطی می شود. یکی از عمده ترین مسائل در ژنتیک جمعیت شناخت تفاوت های بین جمعیت های مناطق مختلف در محدوده جغرافیایی پراکنش آنها است که می تواند در تصمیم گیری های مدیریت شیلاتی از جمله بهره برداری پایدار و حفاظت از تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که اطلاعات در مورد ژنوم این گونه در حال حاضر کم می باشد در این پروژه با استفاده از روش AFLP ساختار جمعیتی این گونه در خلیج فارس بررسی می شود. با انجام این پروژه جمعیت های این گونه، قرابت بین جمعیت ها و تنوع درون گونه ای بدست خواهد آمد که این اطلاعات در حفاظت، ارزیابی ذخایر و تکثیر و پرورش این گونه کاربرد زیادی دارد. در این راستا پژوهش حاضر بر اساس تکنیک AFLP درجهت بررسی

تنوع ژنتیکی و شناسایی ژنتیکی جمعیتهای ماهی حلوا سیاه در مناطق مختلف خلیج فارس و معرفی جمعیت هایی که بیشترین تنوع ژنتیکی را دارند در دستور کار قرار گرفت.

۱-۱-۵ سوالات تحقیق

- آیا میزان تنوع ژنتیکی ماهی حلوا سیاه در بین مناطق مختلف نمونه برداری در حوزه خلیج فارس متفاوت است؟
- ماهی حلوا سیاه دارای چه میزان تمایز ژنتیکی در مناطق مختلف نمونه برداری می باشد و آیا نشانگر AFLP قادر به تفکیک جمعیت این گونه در حوزه خلیج فارس خواهد بود؟

۱-۱-۶ اهداف تحقیق

- محاسبه میزان تنوع ژنتیکی جمعیت های ماهی حلوا سیاه در مناطق مختلف نمونه برداری در خلیج فارس.
- تعیین میزان تمایز ژنتیکی جمعیت های ماهی حلوا سیاه در مناطق مورد مطالعه و شناسایی جمعیت های احتمالی قابل جداسازی.

۱-۱-۷ فرضیه هایی که در این تحقیق مطرح است عبارتند از:

- میزان تنوع ژنتیکی ماهی حلوا سیاه در بین مناطق مختلف نمونه برداری در حوزه خلیج فارس متفاوت است.

- ماهیان حلوا سیاه مورد بررسی در خلیج فارس دارای یک جمعیت یکسان نبوده و میزان تمایز ژنتیکی بالایی دارند.

۱-۲ کلیات

۱-۲-۱ مروری بر خانواده گیش ماهیان

خانواده گیش ماهیان، ماهیانی اغلب دریازی و ندرتاً ساکن آبهای لب شور هستند که شامل گونه های متنوعی از جمله Jacks, Scads, Trevallies, Pampano, Amberjacks, Queenfishes می باشند که همگی دارای اهمیت اکولوژیکی و ارزش اقتصادی هستند(Reed *et al*., 2002). گیش ماهیان در همه آبهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دریاها و مصب های جهان حضور دارند و در بعضی مناطق معتدل هم یافت می شوند (Bannikov, 1987). خانواده گیش ماهیان، در آب های ساحلی و دریای باز حضور داشته و در خلیج فارس به عنوان خانواده غالب و متنوع ترین گروه ماهیان از نظر جنس و گونه محسوب می شوند (Kuronuma and Abe, 1986). از نظر شکل ظاهری ماهیانی متوسط تا بزرگ و به طور عام از طرفین فشرده و تقریباً بیضی شکل بوده که با توجه به ساقه دمی باریک و دم چنگالی در بیش تر نمونه ها، شناگران فعال و شکارچیان سریعی هستند و اغلب به صورت گله ای یا گروه های کوچک زندگی می کنند به جز جنس Alectis که انفرادی زیست می کند (Honebrink, 2000). گیش ماهیان عمدتاً تخمریزی پلاژیکی داشته که اغلب نیز در فصل تابستان رخ می دهد (Smith-Vaniz, 1984). گیش ماهیان بیشتر از سخت پوستان و ماهیها تغذیه می کنند.