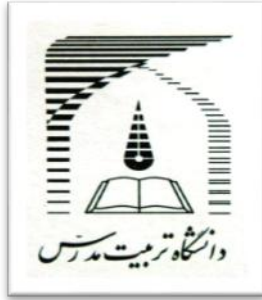


صلى الله عليه وسلم



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم دریایی

گروه زیست‌شناسی دریا - گرایش جانوران دریا

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان:

بیوسیستماتیک جنس *Alosa* spp. در سواحل ایرانی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریختی و

مولکولی (توالی بخشی ژن Cyt-b)

نگارنده:

سید رامین قطبی جوکندان

استاد راهنما:

دکتر محمد صادق علوی یگانه

استاد مشاور:

دکتر شیرین جمشیدی

پاییز ۹۳



دانشگاه گیلان

دانشکده منابع طبیعی

باسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه

بدین وسیله گواهی می‌شود آقای سیدرامین قطبی جوکندان دانشجوی رشته زیست‌شناسی دریا در تاریخ ۹۳/۹/۲۶ از پایان نامه ۶ واحدی خود با عنوان: بیوسینتتاتیک جنس *Alosa spp.* در سواحل ایرانی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریختی و مولکولی (توالی بخشی ژن Cyt-b)، دفاع کرده است. اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آن را برای دریافت درجه کارشناسی ارشد تأیید می‌نمایند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
استاد راهنما	دکتر محمدصادق علوی یگانه	استادیار	
استاد مشاور	دکتر شیرین جمشیدی	استادیار	
استاد ناظر (داخلی)	دکتر سیدجعفر سیف‌آبادی	دانشیار	
استاد ناظر (خارجی)	دکتر سیدحامد موسوی ثابت	استادیار	
نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر سیدجعفر سیف‌آبادی	دانشیار	

آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب سید رامین قطبی جوکندان دانشجوی رشته زیست شناسی دریا ورودی سال تحصیلی ۹۱ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم دریایی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدین وسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»


سید رامین قطبی جوکندان
امضا:

تاریخ: ۱۳۹۳/۱۰/۷

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته زیست شناسی دریا است که در سال ۹۳ در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر محمد صادق علوی یگانه، مشاوره سرکار خانم دکتر شیرین جمشیدی از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب سید رامین قطبی جوکندان دانشجوی رشته زیست شناسی دریا مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا:

۱۳۹۳/۱۰/۷



سید رامین قطبی جوکندان

تقدیم نامہ

ما حاصل آموختہ ہایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مهر آسمانی شان، آرام بخش آلام زمینی‌ام است
به استوارترین مکلمه گاهم، دستان پر مهر پدرم، به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم و به برادر و خواهرانم
که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بگو شتم قطره ای از دریای بی‌کران مهربانتان را پاس توانم بگویم.

تقدیر نامہ

از تکلم‌های بی‌دریغانه اساتید راہما جناب آقای دکتر محمد صادق علوی یگانہ و استاد مشاور گرامی سرکار خانم دکتر شیرین
جمشیدی سپاسگزاری می‌نمایم؛ همچنین از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر جعفر سیف‌آبادی، دکتر صابر خداوند و دکتر بہروز
زارعی دارکی مراتب تقدیر و تشکر را بجای آوردم. از داوران محترم جناب آقای دکتر سید حامد موسوی ثابت و سید جعفر
سیف‌آبادی که بزرگواران ہ بندہ را راہمائی نموده اند، تقدیر و تشکر می‌نمایم. همچنین از دوستان عزیزم آقایان مهندس حسینی
(مسئول آزمون پویشی دریا)، حسین خیدہ، عبدالہ دیرستانی، مرتضی فرشی، اشکان رضایی، محبتی رضایی، حمید پنا، جمشید اسلام
دوست، احسان فلور، پیمان اشکانی، جواد دلپسند و خانم‌های مهندس مینو کرمی و زحمتکش، شہلا ہمتی، زہرا اشرافیانی، سحر شعبانی،
نیم زارعی پلگردنی، مریم حامدی، زینب محرمی فرد، لیچہ روسنگر و در نہایت از جناب آقای خسرو سیدی و تمامی عزیزانی کہ در
مدت این دو سال یاری‌ام کرده اند، کمال قدردانی را دارم و از خداوند متعال سربلندی و موفقیت روز افزون را برای این
عزیزان خواستارم.

چکیده:

تنوع بالایی از گونه‌های جنس *Alosa* در ناحیه Ponto - Caspian زیست می‌کنند و تنها از دریای خزر، تعداد ۵ گونه و ۱۴ زیرگونه از شگ‌ماهیان متعلق به جنس *Alosa* گزارش شده است. با توجه به تنوع گونه‌ای بالا و فقدان اطلاعات ریختی کافی در رده‌بندی گونه‌های این جنس به خصوص در دریای خزر ابهاماتی وجود دارد. در این تحقیق، بیوسستماتیک جنس *Alosa* spp. در سواحل ایرانی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریختی و مولکولی (توالی‌بخشی ژن Cyt-b) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۳۹ عدد ماهی از چهار گونه موجود در سواحل ایران شامل *A. braschnikowi*، خزری (*A. caspia*)، مهاجر (*A. kessleri*) و چشم‌درشت (*A. saposchnikowii*) از ایستگاه‌های انزلی، نور- محمودآباد و خلیج گرگان در سه مرحله از آبان تا اسفند سال ۹۲ نمونه‌برداری انجام شد. تعداد ۱۴ نمونه (برای چهار گونه مذکور) جهت مطالعات مولکولی استفاده شد. نتایج آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، آنالیز تابع تشخیصی (DA) و تحلیل به مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تحلیل صفات ریختی به دست آمده از گونه‌های ذکر شده در دریای خزر، بیانگر کارایی بهتر صفات اندازه‌گیری در مقایسه با صفات شمارشی در تمایز این چهار گونه بود. صفات شمارشی و اندازه‌گیری تشخیصی اشاره شده در منابع و کلیدهای شناسایی موجود اغلب مرتبط با اندازه و تعداد خارهای شعاع‌های کمان اول آبششی می‌باشد، اما در این تحقیق علاوه بر صفات فوق، صفاتی اندازه‌گیری از قبیل ارتفاع باله مخرجی و پشتی، ارتفاع، عرض و طول سر، طول پوزه، ارتفاع ساقه دم، فاصله پس چشمی، طول باله سینه‌ای و شکمی و صفات شمارشی همچون تعداد شعاع باله دم و تعداد شعاع منشعب و غیر منشعب باله پشتی نیز در تمایز چهار گونه مورد بررسی نقش داشتند. هرچند دامنه تغییرات صفات اندازه‌گیری و شمارشی زیست‌سنجی شده در مقایسه بین گونه‌های جنس *Alosa* در جنوب دریای خزر واجد همپوشانی بودند، اما می‌توانند در شناسایی بهتر و دقیق‌تر این گونه‌ها مفید باشند. در نمودارهای رسته‌بندی بر اساس صفات ریختی به استثنای دو گونه *A. braschnikowi* و *A. saposchnikowii* جدایی نسبی بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. نتایج تحلیل مولکولی توالی‌بخشی ژن Cyt-b (۴۵۹ جفت-باز)، به طور کامل قادر به تفکیک چهار گونه از شگ‌ماهیان جنس *Alosa* نبود. فواصل ژنتیکی و موقعیت تبارشناسی، بیانگر قرابت بالایی سه گونه *A. braschnikowi*، *A. saposchnikowii* و *A. caspia* بود، به طوری که هاپلوتیپ‌های دو گونه *A. braschnikowi* و *A. saposchnikowii* در یک شاخه قرار گرفتند. اما گونه *A. kessleri* بیشترین فاصله ژنتیکی را با سه گونه دیگر نشان داد و در موقعیت خواهر گروهی از گونه‌های فوق الذکر جدا شد. این جدایی احتمالاً به دلیل الگوی متفاوت مهاجرت تولیدمثلی این گونه به عنوان تنها گونه رود کوچ از جنس *Alosa* در دریای خزر می‌باشد. در مقایسه گونه‌های بررسی شده از دریای خزر با سایر گونه‌های این جنس در جهان، سه گونه *A. braschnikowi*، *A. caspia* و *A. saposchnikowii* در موقعیت خواهر گروهی با گونه‌های اروپا قرار گرفتند که بیانگر قرابت بیشتر نمونه‌های خزر با نمونه‌های این منطقه بود. در مجموع، نتایج بیانگر تمایز ریختی و ژنتیکی اندک سه گونه خزری، چشم‌درشت و *A. braschnikowi* بود که می‌تواند به دلیل وقوع انشقاق اخیر یا تماس ثانویه در تاریخ تکامل گونه‌های فوق باشد.

کلمات کلیدی: بیوسستماتیک، جنس *Alosa*، دریای خزر، ریخت‌شناسی، سیتوکروم b

فهرست مطالب

۱	فصل اول: مقدمه و کلیات
۱-۱	مقدمه
۲-۱	اهداف مطالعه
۳-۱	سوالات تحقیق:
۴-۱	فرضیه‌ها/پیش فرض‌ها
۵-۱	کلیات
۵-۱-۱	دریاچه خزر
۵-۱-۲	خانواده شگ‌ماهیان
۵-۱-۳	رده‌بندی شگ‌ماهیان
۵-۱-۴	ویژگی عمومی جنس <i>Alosa</i>
۵-۱-۵	رده بندی جنس <i>Alosa</i>
۵-۱-۶	رده‌بندی جنس <i>Alosa</i> در دریای خزر
۵-۱-۷	توصیف گونه‌های <i>Alosa</i> موجود در دریای خزر
۵-۱-۷-۱	شگ‌ماهی براشنی کووی (<i>Alosa braschnikowi</i> (Borodin, 1904)
۵-۱-۷-۲	شگ‌ماهی خزری (<i>Alosa caspia</i> (Eichvald, 1838)
۵-۱-۷-۳	شگ‌ماهی مهاجر (<i>Alosa kessleri</i> (Grimm, 1887)
۵-۱-۷-۴	شگ‌ماهی چشم‌درشت (<i>Alosa saposchnikowii</i> (Grimm, 1887)
۵-۱-۷-۵	شگ‌ماهی سر گرد (<i>Alosa sphaerocephala</i> (Berg, 1913)
۵-۱-۸	صید شیلاتی کل شگ‌ماهیان جنس <i>Alosa</i> دریای خزر
۵-۱-۹	اهمیت مطالعات ریخت‌شناسی
۵-۱-۱۰	اهمیت مطالعات مولکولی
۵-۱-۱۰-۱	اهمیت روش استخراج DNA
۵-۱-۱۰-۲	سیر تحول در نشانگرهای مولکولی
۵-۱-۱۱	ژنوم میتوکندریایی
۵-۱-۱۱-۱	ژن سیتوکروم b (Cyt- b)
۳۳	فصل دوم: مروری بر منابع
۳۴	۱-۲ سابقه تحقیق
۳۹	فصل سوم: مواد و روش‌ها
۴۰	۱-۳ انتخاب ایستگاه و نحوه نمونه‌برداری
۴۱	۲-۳ مطالعات ریخت‌شناسی
۴۵	۳-۳ مطالعات مولکولی
۴۵	۳-۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج DNA مطالعات مولکولی
۴۷	۳-۳-۲ استخراج DNA
۵۱	۳-۳-۳ تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی

۵۳.....	۴-۳-۳ روش تهیه ژل آگارز ۱ درصد (Sambrook و همکاران، ۱۹۸۹)
۵۴.....	۵-۳-۳ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
۵۴.....	۱-۵-۳-۳ مواد شیمیایی مورد استفاده در واکنش PCR
۵۵.....	۲-۵-۳-۳ مواد مورد استفاده و شرایط دمایی برای تکثیر ژن Cyt- b بهینه کردن شرایط PCR
۵۹.....	۳-۵-۳-۳ بررسی کیفیت محصول PCR
۵۹.....	۶-۳-۳ فرآیند تخلیص DNA از روی ژل
۶۰.....	۱-۶-۳-۳ تخلیص DNA از ژل، از طریق دستور العمل کیت تخلیص Gene All ^R Expin TM SV
۶۲.....	۷-۳-۳ توالی‌یابی
۶۲.....	۸-۳-۳ تحلیل داده‌های مولکولی
۶۴.....	فصل چهارم: نتایج
۶۵.....	۱-۴ نتایج ریخت‌شناسی
۷۵.....	۲-۴ نتایج مولکولی
۷۶.....	۱-۲-۴ کیفیت محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)
۷۷.....	۲-۲-۴ توالی‌یابی
۸۷.....	فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری
۸۸.....	۱-۵ ریخت‌شناسی
۹۴.....	۲-۵ بخش مولکولی
۹۶.....	۲-۲-۵ ترکیب نوکلئوتیدی
۹۷.....	۲-۲-۵ فاصله ژنتیکی
۱۰۱.....	۳-۲-۵ تبارشناسی
۱۰۳.....	۳-۵ جمع‌بندی نهایی
۱۰۴.....	۴-۵ آزمون فرضیات
۱۰۵.....	۵-۵ پیشنهادات پژوهشی
۱۰۶.....	فهرست منابع

فهرست جداول

- جدول ۱-۳ حروف اختصاری مربوط به صفات اندازه‌شی و شمارشی برای مطالعه شگ‌ماهیان جنس *Alosa* دریای خزر..... ۴۲
- جدول ۲-۳ مواد مورد نیاز جهت ساخت ژل آگارز ۱ درصد..... ۵۸
- جدول ۳-۳ فهرست پرایمرهای مورد استفاده (Alexandrino و همکاران (۲۰۰۶))..... ۵۸
- جدول ۴-۳ شرایط دمایی واکنش PCR (Alexandrino و همکاران (۲۰۰۶))..... ۵۸
- جدول ۵-۳ مواد استفاده شده برای واکنش PCR..... ۵۹
- جدول ۱-۴ نتایج صفات شمارشی در چهارگونه شگ‌ماهی شامل *A. braschnikowi* (۷۵ عدد)،..... ۶۶
- جدول ۲-۴ نتایج صفات اندازه‌شی نسبی در چهارگونه شگ‌ماهی *A. braschnikowi* (۷۵ عدد)، *A. caspia* (۶۷ عدد)، *A. kessleri* (۶۵ عدد) و *A. saposchnikowii* (۳۲ عدد)..... ۶۷
- جدول ۳-۴ مقادیر بارعاملی صفات اندازه‌شی و شمارشی در دو مؤلفه اول از آزمون تحلیل..... ۶۹
- جدول ۴-۴ نتایج آنالیز تشخیصی صفات اندازه‌شی برای چهار گونه از شگ‌ماهیان جنس *Alosa* در دریای خزر..... ۷۰
- جدول ۵-۴ نتایج آنالیز تشخیصی صفات شمارشی برای چهار گونه از شگ‌ماهیان جنس *Alosa* در دریای خزر..... ۷۰
- جدول ۶-۴ شماره دسترسی ژن Cyt-b گونه‌های مختلف شگ‌ماهیان جنس *Alosa* قاره‌ی اروپا و آمریکا که در بانک ژنی ثبت شده است..... ۷۹
- جدول ۸-۴: درصد فاصله ژنتیکی بر مبنای فاصله ۲ عامله کیمورا چهار گونه از جنس *Alosa* دریای خزر از طریق محاسبه میانگین فاصله ژنتیکی درون گروهی..... ۸۱
- جدول ۹-۴ فاصله ژنتیکی بر حسب تعداد نوکلئوتید در گونه‌های مختلفی از جنس *Alosa* در دریای خزر، اروپا و آمریکا از طریق محاسبه میانگین فاصله ژنتیکی بین گروهی..... ۸۲
- جدول ۱۰-۴: درصد فاصله ژنتیکی بر مبنای فاصله ۲ عامله کیمورا در گونه‌های مختلفی از جنس *Alosa* در دریای خزر، اروپا و آمریکا از طریق محاسبه میانگین فاصله ژنتیکی بین گروهی..... ۸۲
- جدول ۱۱-۴ (الف) فراوانی ترکیب نوکلئوتیدی توالی ژن Cyt- b در چهار گونه از جنس *Alosa* در دریای خزر..... ۸۳
- جدول ۱۱-۴ (ب) مقایسه جایگاه ترکیب نوکلئوتیدی توالی ۴۵۹ جفت باز ژن Cyt- b، در چهار گونه از جنس *Alosa* دریای خزر..... ۸۳
- جدول ۱۲-۴ محاسبه نرخ جایگزینی Transition/Transversion در توالی ژن Cyt- b در گونه‌های دریای خزر..... ۸۴

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ نقشه دریای خزر ۷
- شکل ۲-۱ نقشه پراکنش جهانی جنس *Alosa* spp. (Sabatie' و همکاران، ۲۰۰۳) ۱۱
- شکل ۳-۱ شکل شماتیک از گونه *A. braschnikowi* (Whitehead, ۱۹۸۵) ۱۱
- شکل ۴-۱ شکل شماتیک گونه *A. caspia* (Whitehead, ۱۹۸۵) ۱۳
- شکل ۵-۱ شکل شماتیک گونه *A. kessleri* (Whitehead, ۱۹۸۵) ۱۵
- شکل ۶-۱ شکل شماتیک گونه *A. saposchnikowii* (Whitehead, ۱۹۸۵) ۱۸
- شکل ۷-۱ شکل شماتیک گونه *A. sphaerocephala* (Whitehead, ۱۹۸۵) ۱۹
- شکل ۸-۱ تصویر میتوکندری و ساختار غشاء داخلی میتوکندری ۲۹
- شکل ۹-۱ تصویری شماتیک ساختار حلقوی DNA میتوکندری که حاوی ۲۲ ناحیه ژنی کد کننده tRNA و ۱۳ ناحیه کد کننده پروتئین می باشد (Anderson و همکاران، ۱۹۸۱) ۳۱
- شکل ۱-۳ ایستگاه‌های نمونه برداری شگ ماهیان، برای مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی ۴۰
- شکل ۲-۳ (الف) صفات اندازه‌گیری و شمارشی در نمونه ماهیان و کمان آبششی، برای مقایسه ریختی چهار گونه از شگ ماهیان جنس *Alosa* در سواحل جنوبی دریای خزر. ۴۴
- شکل ۳-۳ ریزسنج (کولیس) با دقت ۰/۰۱ میلیمتر، جهت اندازه‌گیری صفات اندازه‌گیری ۴۴
- شکل ۴-۳ (الف) مراحل استخراج DNA از روش فنل - کلروفرم (Taggart و همکاران، ۱۹۹۲) ۵۰
- شکل ۴-۳ (ب) مرحله ۶ استخراج DNA ایجاد ۳ فاز بعد از اضافه کردن فنل - کلروفرم - ایزوآمیل بعد از سانتریفیوژ. ۵۱
- شکل ۵-۳ (الف) بن ماری (ب) سانتریفیوژ ۵۱
- شکل ۶-۳ دستگاه‌های سنجش کیفیت و کمیت DNA. (الف) Nanodrop، (ب) ژل داک، (ج) الکتروفورز افقی. ۵۳
- شکل ۷-۳ (الف) محلول پایه (Master Mix) (ب) دستگاه ترموسایکلر (PCR) ۵۶
- شکل ۸-۳ انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (https://www.mun.ca/biology/scarr/pcr_sketch_3.gif) ۵۷
- شکل ۹-۳ (الف) تیغ اسکالپل، (ب) دستگاه Gel Cutter ۶۰
- شکل ۱۰-۳ (الف) کیت تخلیص و مراحل تخلیص (ب) ستون تخلیص ۶۲
- شکل ۱-۴ به ترتیب از بالا به پایین، تصویر چهار گونه شگ ماهی شناسایی شده از سواحل جنوبی دریای خزر و اولین کمان آبششی آنها شامل: (الف) شگ ماهی *A. braschnikowi*، (ب) شگ ماهی خزری *A. caspia*، (ج) شگ ماهی مهاجر *A. kessleri* و شگ ماهی چشم‌درشت (د) *A. saposchnikowii* ۶۵
- شکل ۲-۴ نمودار رسته‌بندی چهار گونه شگ ماهی *A. braschnikowi* (+)، *A. caspia* (■)، *A. keesleri* (○) و *A. saposchnikowii* (Δ). (نمودار بالا) با استفاده از دو مولفه اول آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی برای صفات اندازه‌گیری و (نمودار پایین) با استفاده از دو مولفه اول آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی برای صفات شمارشی. ۷۲
- شکل ۳-۴ نمودار خوشه‌ای چهار گونه از شگ ماهیان جنس *Alosa* در دریای خزر برحسب صفت شمارشی. ۷۳
- شکل ۴-۴ نمودار خوشه‌ای چهار گونه از شگ ماهیان جنس *Alosa* در دریای خزر برحسب صفت اندازه‌گیری. ۷۴
- شکل ۵-۴ DNA ژنومی از بافت باله نمونه ماهیان جنس *Alosa* spp. در ژل آگارز ۱ درصد (سمت راست) و نمودار نانودراپ (سمت چپ) که بیانگر غلظت آن می‌باشد. ۷۶
- شکل ۶-۴ محصول PCR بعد از استخراج DNA از نمونه ماهیان جنس *Alosa* دریای خزر، در ژل آگارز ۱ درصد. ۷۷
- شکل ۷-۴ هم‌ردیف کردن توالی‌های نمونه گونه‌های جنس *Alosa* مطالعه شده در این تحقیق، و توالی گونه‌های موجود در بانک ژنی. ۷۹

شکل ۴-۸ درخت تبارشناسی که از روش حداکثر تشابه (ML) در نرم‌افزار Mega6 و روش Bayesian در نرم‌افزار Mrbayes، برای مقایسه فاصله گونه‌های دریای خزر ترسیم شده است (*Sardinella sp.* به عنوان Outgroup). عددهای روی هر شاخه پشتوانه تکرار را نشان می‌دهد. عدد اول، پشتوانه تکرار روش حداکثر تشابه (ML) و عدد دوم، احتمال پسین (پشتوانه تکرار) از روش Bayesian را نشان می‌دهد. ۸۵.....

شکل ۴-۹ درخت تبارشناسی حاصل از روش حداکثر تشابه در نرم‌افزار Mega6 و روش Bayesian در نرم‌افزار Mrbayes، برای گونه‌های دریای خزر و سایر گونه‌های جنس *Alosa* در اروپا و آمریکا ترسیم شده است (جنس *Sardinella sp.* به عنوان Outgroup). عدد اول، پشتوانه تکرار روش حداکثر تشابه (ML) و عدد دوم، احتمال پسین (پشتوانه تکرار) از روش Bayesian را نشان می‌دهد. ۸۶.....

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

شگ‌ماهیان Clupeidae سطح‌زی^۱ بوده و به راسته شگ‌ماهی شکلان^۲ تعلق دارند (Nelson, ۲۰۰۶). بدن آنها معمولاً طویل و از دو پهلو صاف، مسطح بوده و بیشتر از موجودات پلانکتونی کوچک تغذیه می‌کنند (Whitehead, ۱۹۸۵؛ Nelson, ۲۰۰۶). اندازه بالغین آنها از ۲۰-۷۵ سانتی‌متر متغیر (معمولاً بالاتر از ۴۰ سانتی‌متر) است (Whitehead, ۱۹۸۵؛ Nelson, ۲۰۰۶).

خانواده شگ‌ماهیان Clupeidae در دریای خزر دارای دو جنس *Clupeonella* و *Alosa* می‌باشد (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷؛ Berg, ۱۹۶۲). در دریای خزر، جنس *Alosa* spp. دارای ۵ گونه *A. caspia*, *A. braschnikowi*, *A. kessleri*, *A. saposchnikowii* و *A. sphaerocephala* می‌باشد (Berg, ۱۹۶۲؛ Whitehead, ۱۹۸۵). شناسایی گونه‌های جنس *Alosa* بیشتر بر اساس صفات ریختی از جمله تعداد خار آبششی روی اولین کمان آبششی (King و Roche, ۲۰۰۸) صورت می‌گیرد، اما به دلیل شباهت زیاد و وجود هیبریداسیون احتمالی در برخی از گونه‌ها، ویژگی ریختی به تنهایی جهت شناسایی گونه‌های جنس *Alosa* کافی نمی‌باشد (Alexandrino و همکاران، ۲۰۰۶؛ King و

^۱Epipelagic

^۲Clupeiformes

Roche, ۲۰۰۸). اغلب تفاوت‌های ریختی فعلی، مرتبط با الگوی تغذیه این ماهیان بوده و برای رفع این مشکلات کاربرد تکنیک‌های مولکولی را جهت درک روابط تکاملی معرفی نموده‌اند (کد، ۱۹۹۷). امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای بازسازی تبارشناسی^۱ و رده‌بندی گونه‌ها و زیرگونه‌ها بر اساس قرابت خانوادگی نتایج مطلوبی در این دست مطالعات فراهم نموده است (Blouin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Lugon-Moulin و Balloux, ۲۰۰۲).

جنس *Alosa* به دلیل داشتن گونه‌های مهاجر و رود کوچ بودن، ایجاد تغییر در استراتژی تاریخچه‌ی زندگی خود و ظرفیت بالا جهت زیستن در زیستگاه‌های جدید، یک مدلی جالبی برای مطالعات تکاملی و تبارشناسی و بررسی ساختار ژنتیکی در دوره‌های تاریخی و جغرافیای زیستی مختلف می‌باشد (Bagliniere, ۲۰۰۰؛ McDowall, ۲۰۰۳؛ Alexandrino و همکاران، ۲۰۰۶؛ Faria و همکاران، ۲۰۰۶؛ Bowen و همکاران، ۲۰۰۸).

معدود مطالعات ریخت‌شناسی صورت گرفته بر روی این جنس در استان‌های حاشیه جنوبی خزر (حسینی، ۱۳۷۹؛ افراپی و همکاران، ۱۳۸۵؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۰) بیشتر منطقه‌ای بوده و محدود به یک استان می‌شوند، لذا همپوشانی بارزی در صفات تشخیصی (ویژگی‌های مرتبط با کمان آبششی به عنوان صفت تشخیصی) گزارش شده، مشاهده می‌گردد. در مجموع مطالعه جدید و دقیقی روی تنوع گونه‌های *Alosa* در حوضه جنوبی دریای خزر صورت نگرفته است، به طوری که معتبرترین منبع مورد استفاده برای شناسایی و همچنین رده‌بندی گونه‌های این جنس از ماهیان، همچنان بر پایه مطالعات Loe Berg (کتاب "ماهیان جماهیر شوروی سابق و کشورهای همسایه" (Berg, ۱۹۶۲) می‌باشد (نظر شخصی کد، ۱۳۹۲).

در مطالعه حاضر با بررسی محدوده جغرافیایی گسترده‌تر و تعداد نمونه‌های بیشتر، ضمن بازبینی مجدد صفات ریختی، از نشانگرهای مولکولی نیز جهت بررسی سیستماتیک گونه‌های جنس *Alosa* و

^۱Phylogenetic

درک روابط تبارشناسی آنها در سواحل ایرانی دریای خزر انجام شده است، با این امید که مطالعات مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توانند مشکلات موجود در سیستماتیک گونه‌های جنس *Alosa* که مطالعات ریختی قادر به حل آن نبوده، هموار سازند.

۱-۲ اهداف مطالعه

۱. شناسایی صفات ریختی تایید شده با نشانگرهای مولکولی جهت استفاده در کلید شناسایی گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر
۲. مشخص کردن قرابت ژنتیکی و روابط تبارشناسی بین گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر
۳. تطابق الگوی شباهت و فواصل ریختی با الگوی فواصل ژنتیکی جهت اعتبارسنجی کلیدهای شناسایی موجود

۱-۳ سوالات تحقیق:

۱. آیا صفات ریخت‌شناسی اعم از شمارشی و اندازه‌شناسی قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر می‌باشند؟
۲. آیا نشانگر مولکولی (توالی‌بخشی ژن Cyt-b) چند ریختی بین گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر را نشان می‌دهد؟
۳. قرابت تبارشناسی گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر به چه شکل است؟
۴. آیا فواصل و شباهت‌های ژنتیکی و ریخت‌شناسی از یک الگو تبعیت خواهند کرد؟

۴-۱ فرضیه‌ها / پیش فرض‌ها

۱. صفات ریختی مورد بررسی (اعم از شمارشی و اندازه‌شی) به‌طور تشخیصی^۱ قادر به تمایز گونه‌های جنس *Alosa* در سواحل ایرانی دریای خزر خواهند بود.
۲. نشانگر مولکولی انتخابی (توالی بخشی ژن Cyt-b) چند ریختی بین گونه‌های جنس *Alosa* را در جنوب دریای خزر نشان خواهد داد.
۳. رابطه تبارشناسی دو گونه شگ‌ماهی *A. braschnikowi* و *A. saposchnikowii* در کنار دو گونه *A. kessleri* و *A. caspia*، به‌صورت رابطه خواهر گروهی مشاهده خواهد شد.
۴. تنوع ریختی و تنوع ژنتیکی از الگوی مشابهی تبعیت خواهند کرد.

^۱Diagnostic

۱-۵ کلیات

۱-۵-۱ دریاچه خزر

خزر بزرگترین دریاچه روی زمین است که در غرب آسیا و جنوب شرقی اروپا (شرق قفقاز) و شمال کوه‌های البرز (50.6667°E ; 41.6667°N) قرار دارد (شکل ۱-۱). این دریاچه در مقایسه با اقیانوس-ها از تنوع گونه‌ای کمی برخوردار بوده و حدود ۱۳۰ رودخانه در اندازه‌های متفاوت به آن تخلیه می‌شوند (Aubrey, ۱۹۹۴). بیشترین سهم ورود آب رود به دریای خزر، متعلق به رودخانه ولگا بوده که در حدود ۸۰٪ است (Aubrey, ۱۹۹۴). حداکثر و متوسط عمق خزر به ترتیب ۱۰۲۵ و ۲۰۸ متر بوده و طول خطوط ساحلی آن، حدود ۷۰۰۰ کیلومتر است (Aubrey, ۱۹۹۴). از ویژگی‌های بسیار مهم دریای خزر، وجود گونه‌های آبزیان بومی^۱ آن است که به دلیل ارتباط محدود آن با آب‌های آزاد می‌باشد (Yablonskaya و Kosarev, ۱۹۹۴). دریای خزر از نظر تولید اولیه، دریایی حاصلخیز و پر بار

^۱Endemic

بوده و تولید اولیه (کربن آلی) در خزر شمالی، میانی و جنوبی به ترتیب، ۲۲/۷، ۵۰/۹ و ۴۱ میلیون تن برآورد شده است (Kosarev و Yablonskaya، ۱۹۹۴).



شکل ۱-۱ نقشه دریای خزر

دریای خزر دارای ۱۷ خانواده، ۱۲۶-۷۶ گونه و زیرگونه از ماهیان بوده که حدود ۱۱۵ زیر گونه آن بومی خزر می باشد که سهم کپور ماهیان حدود ۳۳٪، گاو ماهیان ۲۸٪ و شگ ماهیان ۱۴٪ می باشد (Kazanchev، ۱۹۸۱؛ Cep، ۱۹۹۸؛ a و b؛ Aubrey، ۱۹۹۴؛ Dumont، ۱۹۹۸؛ Kasymov، ۱۹۹۴).

از آغاز قرن ۲۰ دخالت های انسانی در جریان رودخانه ها با احداث سدها، کاهش کیفیت آب در مناطق صنعتی (Baglinier و همکاران، ۲۰۰۳) و صیادی بیش از حد، تأثیرات منفی شدیدی بر ذخایر ماهیان بر جای گذاشته است، به طوری که بسیاری از گونه های ماهیان رود کوچ^۱ و Diadromous بسیاری از حوضه رودخانه های محل تولیدمثل خود را از دست داده اند (Jonsson و

^۱Anadromous

همکاران، ۱۹۹۹؛ Walpes و همکاران، ۲۰۰۸). در حقیقت، تکه تکه شدن رودخانه‌ها ممکن است رفتار تخم‌ریزی ماهیان را تغییر داده و ماهیان از رسیدن به محل تخم‌ریزی سنتی و قدیمی خود باز مانده، در نتیجه احتمال وقوع هیبریداسیون بین همجنس‌هایی^۱ که ارتباط نزدیکی داشته، افزایش یابد (Alexandrino و همکاران، ۲۰۰۶؛ Walpes و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۵-۲ خانواده شگ‌ماهیان^۲

خانواده شگ‌ماهیان شامل شاه‌ماهیان^۳، شگ‌ماهیان، sardines، pilchards، menhadens بوده که عمدتاً دریایی بوده و برخی از این ماهیان رودکوچ یا به‌طور دائمی ساکن آب شیرین هستند (Gaudant، ۱۹۹۱؛ Whitehead، ۱۹۸۵؛ Nelson، ۲۰۰۶). البته این ماهیان را ماهیان Diadromous نیز می‌گویند یعنی هم در محیط آب شیرین و هم محیط دریایی یافت شده و از هر دو محیط استفاده می‌کنند (McDowall، ۲۰۰۳)؛ این ویژگی باعث شده که در مناطق پراکنش خود بتوانند با تغییرات شرایط محیطی مقابله کنند. برخی از جمعیت‌ها کاملاً محصور در خشکی بوده که مرحله بلوغ، تولیدمثل و مرگ آنها کاملاً دریایی می‌باشد (Whitehead، ۱۹۸۵؛ McDowall، ۲۰۰۳). پراکنش شگ‌ماهیان به شرایط اکولوژیکی (به‌خصوص دمایی) ارتباط دارد. همچنین روابط غذایی موجودات و سازگاری‌های صورت گرفته با محیط زیست بر میزان تراکم و پراکنش گونه‌های مختلف این جنس تأثیر دارد (Sheldon، ۱۹۶۸؛ Nelson، ۲۰۰۶).

۱-۵-۳ رده‌بندی شگ‌ماهیان

اخیراً در رده‌بندی شگ‌ماهیان تجدید نظر صورت گرفته است (Didario، ۲۰۰۹). خانواده شگ - ماهیان از راسته شگ‌ماهی شکلان و دارای ۵۰ جنس و حدود ۱۹۰ گونه می‌باشد، که از این تعداد

^۱Congener

^۲Clupeidae

^۳Herrings