

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

منت خدای را عز و جل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت. و منت خدای را که حکیم است و علیم و سه حق را چه نیکو بر گردن آدمی نهاده است که به جای آورند و سپاس گویند. اول حق الله را که شکرانه خداوند است برای دلی و پایی، دلی برای ماندن و پایی برای رفتن و ذهنی که ارزانی داشت تا بینم بزرگی آفریدگاری را که تا به حال ندیده بودم عظمتش را این چنین آشکار. دوم حق الناس را که سپاس گویم از مرشدانی که یآوری کردند در این راه سخت دانستن، و توانمند شدن که به بودنشان دل گرم بودم و اطمینان داشتم که در پس هر گامی که بر میدارم چشمانی بصیر مرا نظاره می کنند.

سوم حق النفس را جسمی که تاب آورد تا بیازماید و ببالد، بی اندیشد و ببیند عظمتی را که جان می بخشد و سرچشمه حیات است و همه موجودات بدان زنده اند و پرودگار به چه آسانی آن را در هم پیچیده، کلاف کرده و در دل تک تک یاخته ها گذارده است و بدانم که در آغاز هیچ نبود، خدا بود که خلق کرد کلاف پیچ در پیچ حیات را در کمتر از نفسی و دمید از جوهره خویش بر آن تا جریان یابد ذات حق در تمام هستی و کائنات و بینم که عطر مهربانی اش در سراسر گیتی گسترده است و دست های کریمش سخاوتمندانه حتی ماهیان کوچک حوض های آبی زمین را پاسداری میکنند تا سفره بندگانش خالی از نان نباشد و دستهایشان شرمسار بر هم نماند.



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان نامه برای اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M.Sc)

در رشته مهندسی شیلات-تکتیر و پرورش آبزیان

**بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی (*Liza aurata*) در حوضه
جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگر ریزماهواره (مایکروستلایت)**

نگارنده:

زهرة قدسی

استاد راهنما:

دکتر علی شعبانی

استاد مشاور:

دکتر بهاره شعبانپور

۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

(۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

(۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

(۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب زهره قدسی دانشجوی رشته مهندسی شیلات - تکثیر و پرورش آبزیان مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به:

اگر چه نا چیز اما حاصل سه سال از عمرم را به کسانی تقدیم می‌کنم که در سختی‌های این راه طولانی مرا همراهی کرده و پشت و پناهم بودند، به کسانی که به من زندگی بخشیدند و با گرمای محبتشان ذره ذره در من نور امید به آینده را کاشتند و زمانی که از سختی‌ها و سردی‌های روزگار گله‌مند می‌شدم با مهربانی نابشان قندیل‌های غم را از ذهنم آب می‌کردند تا باز امید در رگ زندگی‌ام جاری شود، به پدر و مادر عزیزم و به دو خواهر دوست داشتی‌ام که اگر نبودند من در بیکران هیاهوی دنیا شما انسان‌ها گم می‌شدم.

تشکر و قدردانی:

می‌خواهم از استاد راهنمای بزرگووارم آقای دکتر شعبانی قدردانی کنم نه فقط بخاطر حمایت‌های بی‌شائبه ایشان در این راه سخت، بلکه بخاطر اعتمادشان، که فرصت آزمون، یافتن و دانستن را در اختیارم نهاد و همچنین از مشاور مهربانم خانم دکتر شعبانپور به خاطر تمام لحظات همراهی‌اش در دشواری‌های روزگار که گاه گاه خود را بی‌باکانه به من نشان می‌داد، تشکر کنم و از خداوند طلب عمری طولانی برای این دو بزرگووار دارم.

چکیده

ماهی کفال طلایی از گونه‌های تجاری ارزشمندی است که در نواحی جنوبی دریای خزر به علت طعم خوب گوشت دارای تقاضای زیادی می‌باشد. شناخت تنوع ژنتیکی منابع دریایی اهمیتی حیاتی در مدیریت و حفاظت از آنها دارد زیرا این مسئله اولین پیش‌نیاز برای حفظ سازگاری جمعیت‌ها تحت شرایط محیطی در حال تغییر است. در این مطالعه از ۶ جایگاه ریزماهواره به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کفال طلایی در مناطق گمیشان و میانکاله در استان گلستان، بابلسر و چالوس در استان مازندران و کیاشهر، انزلی و آستارا در استان گیلان با استفاده شد. طبق نتایج حاصله میزان F_{st} در محدوده ۰/۰۱۰-۰/۰۵۴ به دست آمد که نشان از تمایز ژنتیکی پایین جمعیت‌های مورد نظر می‌باشد. نمونه‌های مورد بررسی در اکثر لکوس‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند که دلیل آن را می‌توان به کاهش هتروزیگوسیتی نسبت داد. تعداد الل‌ها در محدوده ۲۶-۱۱ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب در دامنه ۰/۴۶۴-۰/۹۱۱ (میانگین: ۰/۷۳۲) و ۰/۸۵۶-۰/۹۰۰ (میانگین: ۰/۸۸۵) به دست آمد، این مطلب نشان دهنده، تنوع ژنتیکی این گونه در سطح مطلوب می‌باشد. همچنین طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد. محافظت و بازسازی زیستگاه‌ها می‌تواند به افزایش اندازه جمعیت و کاهش خطر آسیب‌پذیری این گونه در آینده کمک کند.

کلمات کلیدی: کفال طلایی، تمایز ژنتیکی، میکروستلایت، هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی-واینبرگ

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه	
۱-۱- کلیات	۲
۲-۱- کفال ماهیان در خزر	۲
۳-۱- کفال طلایی	۳
۴-۱- ژنتیک جمعیت	۷
۵-۱- کاربرد ژنتیک جمعیت در مدیریت شیلاتی	۷
۶-۱- تعادل هاردی-واینبرگ و دلیل انحراف از آن	۸
۷-۱- تنوع ژنتیکی	۱۰
۸-۱- عوامل موثر بر تنوع ژنتیکی	۱۰
۹-۱- تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها	۱۱
۱۰-۱- فاصله ژنتیکی	۱۱
۱۱-۱- بررسی ساختارهای ژنتیکی	۱۲
۱۲-۱- روشهای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی	۱۲
۱۳-۱- نشانگرهای مبتنی بر DNA در ژنتیک آبزیان	۱۴
۱۴-۱- کاربرد مایکروستلایت در تحقیقات شیلاتی	۱۴
۱۵-۱- نشانگر ریزماهواره	۱۵
۱۶-۱- اشکال مختلف ریزماهواره‌ها	۱۶
۱۷-۱- پیدایش ریزماهواره‌ها	۱۶
۱۸-۱- مزایای ریزماهواره‌ها	۱۷
۱۹-۱- معایب و مشکلات ریزماهواره‌ها	۱۷
۲۰-۱- ضرورت تحقیق	۱۸
۲۱-۱- اهداف تحقیق	۱۹
۲۲-۱- فرضیه‌های تحقیق	۱۹

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل دوم- مروری بر منابع

۲۲	۱-۲- منابع داخلی
۲۴	۲-۲- منابع خارجی
۲۴	۱-۲-۲- مروری بر مطالعه ژنتیکی کفال ماهیان
۲۵	۲-۲-۲- مطالعات ژنتیکی کفال ماهیان بر پایه میکروستلایت
۲۶	۳-۲-۲- سایر مطالعات مبتنی بر میکروستلایت
۲۷	۴-۲-۲- مطالعه تنوع کفال طلائی در دریای خزر

فصل سوم- مواد و روش ها

۳۰	۱-۳- نمونه گیری
۳۰	۲-۳- استخراج DNA
۳۱	۳-۳- تعیین کیفیت و کمیت DNA
۳۱	۱-۳-۳- الکتروفورز افقی (ژل آگارز)
۳۲	۲-۳-۳- روش اسپکتروفتومتری
۳۳	۴-۳- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)
۳۳	۱-۴-۳- بهینه سازی شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز
۳۴	۲-۴-۳- انجام PCR
۳۴	۳-۴-۳- چرخه های حرارتی PCR
۳۵	۵-۳- الکتروفورز محصول PCR
۳۵	۱-۵-۳- تهیه ژل اکریل آمید
۳۶	۲-۵-۳- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید
۳۷	۶-۳- ثبت تصاویر
۳۷	۷-۳- آنالیز آماری

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل چهارم - نتایج

- ۴-۱- بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده ۴۰
- ۴-۲- تکثیر با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده ۴۰
- ۴-۳- فراوانی الیها ۴۱
- ۴-۴- تعداد الیهای واقعی (Na) و موثر (Ne) ۴۳
- ۴-۵- هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) ۴۴
- ۴-۶- شاخص شانون ۴۶
- ۴-۷- تعادل هاردی- واینبرگ ۴۶
- ۴-۸- آنالیز واریانس مولکولی ۴۸
- ۴-۹- شباهت و فاصله ژنتیکی ۵۰

فصل پنجم - بحث

- ۵-۱- بحث ۵۴
- ۵-۲- نتیجه گیری کلی ۶۳
- ۵-۳- پیشنهادات اجرایی ۶۴
- ۵-۴- پیشنهادات پژوهشی ۶۴
- فهرست منابع ۶۶

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- دسته بندی نشانگرهای DNA.....	۱۳
جدول ۱-۳- شرایط بهینه برای اجرای واکنش های PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر.....	۳۴
جدول ۲-۳- چرخه حرارتی واکنش زنجیره ای پلیمراز.....	۳۵
جدول ۳-۳- مقادیر مورد نیاز از مواد مورد استفاده جهت آماده سازی ۲ عدد ژل اکریل آمید.....	۳۶
جدول ۴-۳- محلول های مورد نیاز برای رنگ آمیزی ژل عمودی پلی اکریل آمید.....	۳۶
جدول ۱-۴- توالی و ویژگی های پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز میکروستلایت ماهی کفال طلایی.....	۴۱
جدول ۲-۴- فراوانی ال ها.....	۴۲
جدول ۳-۴- تعداد اللهای واقعی (N_a) و موثر (N_e).....	۴۳
جدول ۴-۴- مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e).....	۴۵
جدول ۵-۴- مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در سطح ۶ جایگاه ژنی در کل نمونه ها.....	۴۵
جدول ۶-۴- شاخص شانون (Shannon Index).....	۴۶
جدول ۷-۴- تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف در ۶ لکوس در ماهی کفال طلایی.....	۴۷
جدول ۸-۴- میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه برداری.....	۴۸
جدول ۹-۴- میزان ضرایب تمایز و درون آمیزی و جریان ژنی در لکوس های مختلف.....	۴۹
جدول ۱۰-۴- میزان N_m محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه برداری.....	۴۹
جدول ۱۱-۴- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA). df (درجه آزادی)، SS (مجموع مربعات)، Ms (انحرافات میانگین مربع)، Prob (معنی دار بودن انحراف بعد از ۹۹ جایگزینی تصادفی).....	۴۹
جدول ۱۲-۴- ماتریس فاصله ژنتیکی.....	۵۰
جدول ۱۳-۴- ماتریس شباهت ژنتیکی.....	۵۱

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۶.....	شکل ۱-۱-.....
۳۰.....	شکل ۱-۳-.....
۴۰.....	شکل ۱-۴-.....
۵۰.....	شکل ۲-۴-.....
۵۲.....	شکل ۳-۴-.....

فهرست ضمائم

عنوان	صفحه
الف- محلول‌ها و بافرهای موردنیاز.....	۷۴
الف-۱ بافر TAE (Tris, Acetic Acid, EDTA).....	۷۴
الف-۲ بافر سنگین کننده (Loading Buffer).....	۷۴
الف-۳ آمونیوم پرسولفات (A.P.S) (Amonium per sulfate).....	۷۴
الف-۴ TEMED.....	۷۴
الف-۵ تهیه آکریل آمید ۳۰ درصد.....	۷۵
الف-۶ تهیه ژل آگارز ۱٪.....	۷۵
الف-۷ تهیه ۱۰ X TBE (Tris, Boric Acid, EDTA).....	۷۵
الف-۸ تهیه بافر STE (Sodium Cloride , Tris. EDTA).....	۷۵
الف-۹ تهیه بافر SDS (Sodium, 2 decyle, sulfat).....	۷۶
الف-۱۰ فنل کالیبره.....	۷۶

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- کلیات

کفال ماهیان^۱

کفال ماهی از راسته سوف ماهی شکلان دارای یک خانواده به نام کفال ماهیان هستند. کفال ماهیان *Mugilidae* با ۱۷ جنس تنها خانواده در این زیر راسته به حساب می‌آیند (هراس و همکاران ۲۰۰۹). آن‌ها ماهیانی طویل هستند که معمولا دارای سری وسیع و پهن می‌باشند. پوزه کند و بدن استوانه ای یا کمی از دو پهلو فشرده است. چشم‌ها غالبا توسط بافت چربی (پلک چربی) پوشیده شده است. دهان نسبتا کوچک و انتهایی است. دویاله پشتی کوتاه دارند و فاقد خط جانبی هستند. کفال‌ها ماهیانی با اندازه نسبتا بزرگ تا متوسط هستند که در آب‌های کرانه ای دریاها، خلیج‌ها و آب‌های شیرین به سر می‌برند و می‌توانند خود را با تغییرات شدید شوری سازگار کنند (اعتماد و مخیر، ۱۳۷۷؛ ستاری، ۱۳۸۲). برگ (۱۹۶۵) پراکنش این گونه را در دریای مدیترانه، کل نوار ساحلی دریای سیاه، دریای آزوف، در اقیانوس اطلس از انگلستان تا آفریقای جنوبی و جزایر قناری اعلام کرد (دریانبرد، ۱۳۸۷). این ماهی‌ها قادرند شوری آب از صفر قسمت در هزار (آب شیرین) تا ۳۸ قسمت در هزار و حرارت آب تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد به نحوی مطلوبی تحمل کنند (عمادی، ۱۳۷۵)، از جلبک‌ها و ذرات ریز روی بستر دریا تغذیه کرده، آن‌ها را وارد معده سنگدان مانند خود می‌کنند (اعتماد و مخیر، ۱۳۷۷) کفال ماهیان پوسیده‌خوار^۲ هستند و از مواد غذایی پوسیده بستر تغذیه می‌نمایند و همراه با این مواد همواره مقداری شن و ماسه و مواد دیگر غیر قابل هضم را می‌بلعند (عمادی، ۱۳۷۵).

۱-۲- کفال ماهیان در خزر

معرفی هدفمند گونه‌ها و جوامع ماهیان از زمان‌های دور انجام شده است. گسترش و پراکندگی وسیع گونه‌هایی مانند کپور معمولی *Cyprinus carpio*، قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و گامبوزیا *Gambusia affinis* در زیستگاه‌های مناسب، گواهی بر انجام این فعالیت‌ها است (هاشم‌زاده سقرلو، ۱۳۸۴).

1 - Mugilidae

2 - Detrivour