بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی‌ارشد در رشته شیلات

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت (*Barbus grypus*) در رودخانه‌های کارون، کرخه، دز و جمعیت پرورشی استان خوزستان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره

پژوهش و نگارش:
محبوبه کرمی‌نسب

استاد راهنما:
دکتر علی شعبانی

استاد مشاور:
دکتر حامد کلنگی میاندره

تابستان ۱۳۹۳

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه انجام فعالیت‌های پایان‌نامه‌های تحصیلی با بهره‌گیری از حمایت‌های علمی، مالی و پشتیبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت می‌پذیرد، به منظور رعایت حقوق دانشگاه، نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می‌شوم:

۱. این گزارش حاصل فعالیت‌های علمی- پژوهشی و دانش و آگاهی نگارنده است مگر آنکه در متن به نویسنده یا پدید آورنده اثر ارجاع داده شده باشد.

۲. چاپ هر تعداد نسخه از پایان‌نامه با کسب اجازه کتبی از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه خواهد بود.

۳. انتشار نتایج پایان‌نامه به هر شکل (از قبیل کتاب، مقاله و همایش) با اطلاع و کسب اجازه کتبی از استاد راهنما خواهد بود. نام کامل دانشگاه:

به فارسی: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

و به انگلیسی: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

در بخش آدرس‌دهی درج خواهد شد.

٤. در انتشار نتایج پایان‌نامه در قالب اختراع، اکتشاف و موارد مشابه، نام کامل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به عنوان عضو حقوقی در انتهای فهرست اسامی درج گردد.

۵. تعیین ترتیب اسامی نویسندگان در انتشار نتایج مستخرج از پایان‌نامه و هر گونه تفاوت احتمالی در آن با فهرست مصوب اسامی هیات راهبری پایان‌نامه با تایید استاد راهنمای اول خواهد بود.

اینجانب **محبوبه کرمی‌نسب** دانشجوی رشته **شیلات** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

محبوبه کرمی‌نسب

تابستان ۱۳۹۳

تقدیم به

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 سبزترین نگاه زندگیم، چشمان مهربان مادرم

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

ره 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

تقدیم به همسرم

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود

و

تقدیم به خواهران همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند .و سلام و درود بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز**...**

پس از ارادت خالصانه به درگاه خداوند بی‌همتا لازم است از استاد ارجمندم جناب آقای **دکتر علی شعبانی** که مرا از محضر علمی‌شان مستفیض گردانیدند؛ قدردانی نمایم.

همچنین از جناب آقای **دکتر حامد کلنگی میاندره** به خاطر سعه‌ی صدر و رهنمودهای دلسوزانه که در تهیه‌ی این تحقیق مرا مورد لطف خود قرار دادند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از هیات محترم داوران سرکار خانم **دکتر رقیه صفری** و جناب آقای **دکتر محمد مازندرانی** که قبول زحمت نموده و داوری و بازبینی این پایان‌نامه را برعهده داشتند، تشکر می‌نمایم.

از سرکارخانم‌ها حمیده زکریایی، زینب حسین‌نیا، مریم حقی‌پور، آذر بیک‌زاده، و آقای مجید محمدی و تمامی دوستانی که به نوعی در انجام این پایان‌نامه به اینجانب کمک کرده‌اند، بسیار سپاسگزارم و موفقیت و سعادت همگان را از خداوند بزرگ خواهانم.

محبوبه کرمی‌نسب- تابستان

چکیده

ماهی شیربت (*Barbus grypus*) یکی از گونه‌های مهم تجاری در آبزی پروری ایران به‌شمار می‌رود که متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidea) است و در منابع آبی غرب و جنوب‌غرب ایران به‌ویژه آب‌های استان خوزستان حضور گسترده‌ای دارد. اطلاعات در سطح مولکولی راجع به این گونه محدود است. برخی از گزارشات نشان می‌دهد که جمعیت این گونه در رودخانه‌های خوزستان کاهش یافته است. مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است. یکی از مهم‌ترین نشانگرهای ژنتیکی که برای توصیف ساختار ذخایر بسیاری از گونه‌های ماهیان به‌کار رفته است ریزماهواره‌ها هستند. در این تحقیق، برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت در رودخانه‌های کارون، کرخه و دز و نمونه‌های پرورشی استان خوزستان با استفاده از نشانگر ریزماهواره، تعداد ۱۲۰ نمونه (۳۰ نمونه از رودخانه کارون، ۳۰ نمونه از رودخانه کرخه، ۳۰ نمونه از رودخانه دز و ۳۰ نمونه پرورشی) جمع‌آوری شد. DNA نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج و با استفاده از ۷ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی شد. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۸۵۹ و ۰/۷۲۳ به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بالایی (۹۶ درصد) در درون جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. متوسط آماره F_{st}، ۰/۰۳٤ به دست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های مورد بررسی است. در بررسی انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در سطح جایگاه‌ها، دو جایگاه در جمعیت کارون در تعادل بوده و سایر جایگاه‌ها از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی‌داری داشتند ($P \leq$ ۰/۰۵). طبق دندروگرام UPGMA ترسیم‌شده بر اساس مقدار فاصله ژنتیکی، نمونه‌های رودخانه‌های کارون و دز از هم جدا نشده اما احتمالاً جمعیت رودخانه کرخه از جمعیت دو رودخانه دیگر و جمعیت پرورشی از جمعیت هر ۳ رودخانه جدا گردیده است.

واژه‌های کلیدی: *Barbus grypus*، پرورشی، دز، ریزماهواره، کارون و کرخه

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

۱-۱ کلیات ۲

۱-۲ طبقه بندی ۲

۱-۳ تولیدمثل ۳

۱-٤ اکولوژی ۳

۱-۵ رشد ۵

۱-٦ تنوع ژنتیکی ۵

۱-٦-۱ چگونه تنوع ژنتیکی اندازه‌گیری می‌شود؟ ۵

۱-٦-۲ نشانگرهای مورفولوژیکی ٦

۱-٦-۳ نشانگرهای سیتوژنیک ٦

۱-٦-٤ نشانگرهای مولکولی ٦

۱-٦-۵ نشانگرهای پروتئینی ۸

۱-٦-٦ نشانگرهای DNA ۸

۱-٦-۷ نشانگرهای ریزماهواره ۸

۱-۷ قانون هاردی- واینبرگ و دلیل انحراف از آن ۹

۱-۸ F- Statistics ۱۱

۱-۹ فرضیه‌ها: ۱٦

فصل دوم

۲-۱ منابع داخلی ۲٤

۲-۲ منابع خارجی ۲٤

فصل سوم

۳-۱ نمونه‌برداری ۲٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱-۱ مکان‌های نمونه‌برداری ۱٤
۳-۱-۲ نحوه نمونه برداری ۲٦
۳-۲ استخراج DNA ۲٦
۳-۳ ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۲۷
۳-۳-۱ ارزیابی کمیت DNA با دستگاه اسپکتروفتومتر ۲۷
۳-۳-۲ ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز افقی ژل آگارز ۲۸
۳-٤- PCR ۲۹
۳-٤-۱ بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیرهای پلیمراز ۲۹
۳-٤-۲ انجام PCR ۳۰
۳-٤-۳- چرخه‌های حرارتی PCR ۳۰
۳-۵ الکتروفورز محصول PCR ۳۱
۳-۵-۱ تهیه ژل اکریل آمید ۳۱
۳-۵-۲ رنگ آمیزی ژل ۳۲
۳-٦ عکس‌برداری از ژل ۳۳
۳-۷ آنالیز آماری ۳۳

فصل چهارم:

٤-۱ نتایج بررسی کیفیت و کمیت آپأ استخراجی از ماهی شیربت ۳٦
٤-۱-۱ روش الکتروفورزی ۳٦
٤-۱-۲ اسپکتروفتومتری DNA ۳٦
٤-۲ نتایج PCR ۳۷
٤-۲-۱ پرایمر Bbar11 ..... ۳۷
٤-۲-۲ پرایمر Bl1-۱۵۳ ..... ۳۷

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٢-٣ پرایمر GATA20 ..... ٣٨
٤-٢-٤ پرایمر GGM024 ..... ٣٨
٤-٢-٥ پرایمر MFW2 ..... ٣٩
٤-٢-٦ پرایمر MFW7 ..... ٤٠
٤-٢-٧ پرایمر MFW26 ..... ٤٠
٤-٣ فراوانی و تعداد آلل‌ها ٤١
٤-٣-١ تعداد آلل‌های واقعی (N_a) و موثر (N_e) ٤١
٤-٤ تنوع ژنتیکی ٤١
٤-٤-١ تعادل هاردی- واینبرگ ٤٣
٤-٥ تست AMOVA ٤٤
٤-٦ شباهت و فاصله ژنتیکی ٤٧

فصل پنجم

بحث ٤٩
٥-١ تنوع ژنتیکی ٥٠
٥-٢ نتیجه‌گیری کلی ٥٧
٥-٣ پیشنهادات اجرایی ٥٧
٥-٤ پیشنهادات پژوهشی ٥٨

منابع ٦١

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر ۲۹
جدول ۳-۲ چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۱
جدول ۳-۳ مقادیر مورد نیاز از مواد مورد استفاده جهت آماده سازی ۲ عدد ژل اکریل آمید ۳۲
جدول ۳-٤ محلول‌های مورد نیاز برای رنگ آمیزی ژل عمودی پلی اکریل آمید ۳۲
جدول ٤-۱ خصوصیات جایگاه‌های به کار گرفته شده در این مطالعه ۲۹
جدول ٤-۲ تعداد آلل‌های واقعی (N_a) و موثر (N_e) شش جایگاه بررسی شده در ماهی شیربت ٤۱
جدول ٤-۳ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) برای مناطق نمونه‌برداری در هر جایگاه ٤۲
جدول ٤-٤ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در سطح شش جایگاه ژنی در کل نمونه‌ها در ماهی شیربت ٤۲
جدول ٤-۵ شاخص شانون (shanon Index) ٤۳
جدول ٤-٦ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف در ۷ جایگاه در ماهی شیربت ٤۳
جدول ٤-۷ میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس فراوانی برای مناطق نمونه‌برداری ٤٤
جدول ٤-۸ میزان F_{st} محاسبه شده بر اساس آنالیز AMOVA ٤۵
جدول ٤-۹ میزان ضرایب تمایز (F_{st}) و درون‌آمیزی (F_{is}) در جایگاه‌های مختلف ٤۵
جدول ٤-۱۰ آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) ٤۵
جدول ٤-۱۱ آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) ٤٦
جدول ٤-۱۲ میزان R_{st} محاسبه‌شده برای مناطق نمونه‌برداری ٤۷
جدول ٤-۱۳ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی ٤۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ پراکنش جهانی ماهی شیربت (سوریه، ترکیه، عراق، ایران، کویت، آلمان، فرانسه)..... ٤
شکل ٤-۱ کیفیت باندهای DNA بر روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از الکتروفورز افقی ١٤
شکل ٤-۲ نتایج حاصل از F_{st} به دست آمده از آنالیز AMOVA..... ٤٦
شکل ٤-۳ نتایج حاصل از R_{st} به دست آمده از AMOVA ٤٧
شکل ٤-٤ دندروگرام UPGMA روابط فیلوژنیک میان نمونه‌های رودخانه‌های مختلف..... ٤٨

فهرست معادلات

عنوان **صفحه**

(رابطه ۱-۱) ۷
(رابطه ۱-۲) ۱۲
(رابطه ۱-۳) ۱۲
(رابطه ۱-٤) ۱۲
(رابطه ۱-٥) ۱۳
(رابطه ۱-٦) ۱۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

ماهی شیربت با نام علمی *Barbus grypus* (Heckel, 1843)، نام مترادف *Labeobarbus kostchi* و نام محلی شیربت، شبوط و سرخه یکی از گونه‌های خانواده Cyprinidae است و در حوضه رودخانه فرات، خلیج فارس و حوضه هرمز یافت می‌شود (Coad, 1996). باله مخرجی و دمی این ماهی تیره و سایر باله‌ها دارای رنگ روشن می‌باشند (Selki., 2005). این گونه به احتمال زیاد در اکثر منابع آبی ایران انتشار داشته اما آنچه مسلم است در منابع آبی غرب و جنوب‌غرب کشور بویژه آب‌های خوزستان حضور گسترده‌ای دارد (نجف‌پور و همکاران، ۱۳۷۵). ماهی شیربت دارای اهمیت اقتصادی در میان مردم محلی است و یک گونه‌ی مهم تجاری در آبزی پروری ایران به‌شمار می‌رود. برخی از گزارشات نشان می‌دهد که جمعیت این گونه در رودخانه‌های خوزستان کاهش یافته است. تحقیقاتی که بر روی خصوصیات بیولوژیک این ماهی در استان خوزستان انجام گرفت نشان داد که این گونه در بسترهای شنی و ماسه‌ای تخم‌ریزی می‌کند (نیک‌پی، ۱۳۷۵). این گونه نسبت به تغییرات محیطی مقاومت نشان داده و در دامنه وسیعی از تغییرات دما و شوری زیست می‌کند (مرمضی، ۱۳۷۳). به‌واسطه رشد مناسب و کیفیت بالای گوشت آن، طرفداران بسیاری دارد (غفله مرمضی، ۱۳۷٦).

۱-۲- طبقه بندی

سلسله: Animalia

شاخه: Chordata

رده: Actinopterygii

راسته: Cypriniformes

خانواده: Cyprinidae

جنس: *Barbus*

گونه: *grypus*

۱-۳- تولیدمثل

شیربت یکی از ماهی‌های مهم رودخانه‌ی کارون واقع در استان خوزستان است که در اردیبهشت ماه جهت تخمریزی از بالادست رودخانه کارون به سمت پایین‌دست آن مهاجرت می‌کند (نیک‌پی، ۱۳۷۵). ماهیان ماده در سن ۳-۲ سالگی و ماهیان نر در سن ۲ سالگی به بلوغ می‌رسند (پذیرا و همکاران، ۱۳۸٦). سیکل رسیدگی تخمدان در این گونه از اواخر تابستان آغاز می‌شود. تخمریزی تقریباً از اوایل اردیبهشت آغاز شده و تا اواسط مرداد ادامه دارد و نشان می‌دهد که شیربت فصل تخمریزی تقریباً طولانی دارد. نوع تخمدان این ماهی همزمان و با ظرفیت چند بار تخمریزی در یک فصل تولید مثلی است. رسیدگی تخمدان در این ماهی در فصل تولید مثل شامل سه بخش است: پیش زرده سازی، زرده سازی و رسیدگی جنسی. تخم‌های ریخته شده توسط این ماهی در روی گیاهان آبزی پراکنده می‌شوند و به گیاهان می‌چسبند (گلدیای [1] و بالیک [2]، ۱۹۹۸؛ الپر [3] و همکاران، ۲۰۰۱).

۱-٤- اکولوژی

شیربت یکی از گونه‌های اصلی کپورماهیان در رودخانه کارون است که پراکنش وسیعی در رودخانه‌های غرب و جنوب غربی ایران بویژه خوزستان دارد. این گونه همچنین در عراق و ترکیه یافت می‌شود. این ماهی بنتوپلاژیک است و در آب‌های شیرین و لب شور زندگی می‌کند و توانایی تحمل دامنه وسیعی از شوری و درجه حرارت را دارد و جهت تخمریزی از بالادست رودخانه‌ی کارون به پایین‌دست آن مهاجرت می‌کند (نیک پی، ۱۳۷۵). جمالپور در سال ۱۳۷٦ مطالعات مختصری در مورد پراکنش این گونه در رودخانه حله انجام داد و اظهار داشت که این گونه در بالادست این رودخانه که دارای آبی با املاح و شوری کمتر است پراکنش بیشتری نسبت به پایین دست دارد. حتی در مناطق پایین دست که آب شور می‌شود تعداد آن‌ها بسیار اندک است. این ماهی یک گونه تجاری است و طول آن تا حدود ۲ متر و وزن آن به بالای ۵۰ کیلوگرم می‌رسد (کد [4]، ۱۹۹٦). غفله مرمضی در سال ۱۳۷٦ ماهی شیربت را ماهی همه چیز خوار معرفی نموده و اجزاء غذایی یافت شده در دستگاه

[1] Geldiay
[2] Balik
[3] Epler
[4] Coad

گوارش آن را الیاف گیاهی، پلانکتون و کرم‌های پرتار همراه با قطعات گوشتی متلاشی شده، تعدادی استخوان مهره ماهی و انواع حشرات و لارو آن‌ها ذکر کرده‌اند. بر اساس مطالعات نیک پی و همکاران در سال ۱۳۷۵ با توجه به اینکه در محتویات دستگاه گوارش این ماهی بقایای گیاهی، جلبک و مواد غیر از گیاه و جلبک دیده شده آن را یوری فاگ و در عین حال غیر شکارچی معرفی نمود. پذیرا و همکاران در سال ۱۳۸٦ با توجه به اینکه در محتویات دستگاه گوارش ماهیان مسن تر از ۵ سال، ماهی یافت کرده و اینکه این ماهی با قلابی که طعمه‌اش ماهی بود به راحتی صید می‌گردید که همگی سن بالای ٤ سال داشتند، بیان کرد که ماهی شیربت در سنین بالا رژیم غذایی گوشتخواری دارد و حالت شکارچی بودن را پیدا می‌کند.

شکل ۱-۱ پراکنش جهانی ماهی شیربت (سوریه، ترکیه، عراق، ایران، کویت، آلمان، فرانسه)

۱-۵- رشد

در مطالعات هاشمی و مرتضوی در سال ۱۳۹۰ از پنج منطقه تخلیه صید در رودخانه کارون (گتوند، شوشتر، ملاثانی، اهواز و دارخوین) بر ماهی شیربت، زیست سنجی انجام شده میانگین طولی ۸/۱۸ ± ۳۷/۹٤ در دامنه ۷٦-۲۰ سانتی‌متر و میانگین وزنی ۱۰۹/٤٥ ± ۸۷۳/۲۰ در دامنه ۱۱۷۰-۵۲ گرم را نشان داد. رابطه‌ی طول و وزن (R^2=۰.۸۵, W=۰.۰۱۹۲$L^{۲.۸۵}$, n=۴۱۰) بدست آمد. پویایی جمعیت ۸٦/٦٤ سانتی‌متر، ضریب رشد ۰/۲۷ در سال، زمان طول صفر ۰/٤٦-، مرگ و میر طبیعی ۰/۵ در سال، مرگ و میر صیادی ۱/۲۲ در سال و مرگ و میر کل ۱/۷۲ در سال بدست آمد که با توجه به پارامترهای رشد و مرگ و میر بدست آمده از این ماهی و براساس شاخص انجمن شیلاتی امریکا (AFS) این ماهی جزء ماهیان با آسیب پذیری متوسط رو به زیاد بشمار می‌آیند.

۱-٦- تنوع ژنتیکی

تا کنون در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیربت مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

۱-٦-۱- چگونه تنوع ژنتیکی اندازه‌گیری می‌شود؟

تنوع ژنتیکی با چندین روش اندازه‌گیری می‌شود، یکی از روش‌ها به دست آوردن توالی دقیقی از طول DNA و چگونگی تنوع آن بین نمونه‌های مختلف است. روش دیگر مشخص کردن تفاوت‌های بین اندازه قطعات DNA است (آویس[1]، ۱۹۹٤). همچنین به منظور اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی می‌توانیم تفاوت‌های پروتئینی ناشی از تنوع در توالی‌های کدکننده DNA را تعیین کنیم. در آخر گاهی امکان تعیین تنوع فنوتیپی که محصولی از تنوع ژنتیکی در یک یا دو جایگاه است وجود دارد (بیامونت[2] و هوآر[3]، ۲۰۰۳).

[1] Avise
[2] Beaumont
[3] Hoare

۱-٦-۲- نشانگرهای مورفولوژیکی[1]

تفاوت‌های موجود بین توالی‌های DNA کروموزوم ممکن است به صور مختلفی بروز یابند. برخی از این تفاوت‌ها به صورت صفات قابل رویتی بروز می‌نمایند که به عنوان نشانگرهای مورفولوژیک قلمداد می‌گردند. اگرچه این نشانگرها در علوم زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما دارای محدودیت‌های اساسی از جمله تعداد کم آن‌ها، دقت پایین، عدم تشخیص خالص یا ناخالصی و تأثیرپذیری شدید از محیط زیست می‌باشند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-٦-۳- نشانگرهای سیتوژنیک[2]

اختلاف در شکل، اندازه و تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند بیانگر اختلافات ژنتیکی باشد. مطالعات سیتوژنیک به منظور مقایسه اختلاف موجود بین افراد یک گروه و آشکار شدن مسیر تکاملی تغییرات در کروموزوم‌های تشکیل‌دهنده ژنوم، تفکیک گونه‌ها و گاها جمعیت‌های مختلف از نظر تعداد و نوع کروموزوم‌ها انجام می‌گیرد (جوانروح علی‌آباد، ۱۳۸۱).

۱-٦-٤- نشانگرهای مولکولی[3]

این دسته از نشانگرها به دو دسته نشانگرهای مبتنی بر پروتئین و مبتنی بر DNA تقسیم می‌شوند. چندین نوع نشانگر وجود دارد که در ژنتیک آبزیان رایج‌ترند. در گذشته آلوزایم‌ها و DNA میتوکندریایی در تحقیقات آبزیان رایج بوده‌اند. انواع نشانگرهای جدیدی که در این زمینه گزارش شده‌اند شامل RFLP[4]، RAPD[5]، AFLP[6]، ریزماهواره‌ها[7] (میکروستلایت)، SNP[8] و EST[9] می‌باشند.

---

[1] Morphological markers
[2] Cytogenetical markers
[3] Molecular markers
[4] Restriction Fragment Length Polymorphism
[5] Random Amplified polymorphic DNA
[6] Amplified Fragment Length Polymorphism
[7] Microsatellite
[8] Single Nucleotide Polymorphism
[9] Expressed Sequence Tag

نشانگرهای مولکولی به دو گروه تقسیم می‌شوند، نشانگرهای نوع I با ژن‌های با عملکرد مشخص در ارتباط است و نشانگرهای نوع II با قطعات ژنومی بدون عملکرد در ارتباط‌اند (ابراین[1]، ۱۹۹۱). اهمیت نشانگرهای نوع اول در زمینه ژنتیک آبزیان در مراحل ابتدایی است، اما واضح است که این نشانگرها بسیار مهم می‌باشند. علاوه بر عملکرد آن‌ها در مطالعات جمعیتی، در مطالعات پیوستگی ژنتیکی و تهیه نقشه QTL[2] اهمیت زیادی دارند و نشانگرهای نوع I در مطالعات ژنوم (مقایسه‌ای)، شناسایی ژن مورد نظر و افزایش ارتباط بین مراکز تحقیقاتی مفید هستند. اگر اطلاعات ژنتیکی گونه‌های ماهیان در دسترس باشد در توسعه استفاده از نشانگرها در زمینه ژنتیک آبزیان در زمان و هزینه صرفه‌جویی می‌توان نمود.

نشانگرهای نوع دوم مثل RAPD، ریزماهواره و AFLP به عنوان نشانگرهای غیر کدکننده در نظر گرفته می‌شوند. چنین نشانگرهایی در مطالعات ژنتیک جمعیت کاربرد گسترده‌ای دارند و شناسایی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها بر اساس تعادل هاردی- واینبرگ انجام می‌شود (لئو[3] و کوردس[4]، ۲۰۰٤).

مزیت نشانگرهای مولکولی را می‌توان بر اساس ظرفیت اطلاعات پلی‌مورفیک آن‌ها (PIC[5]) سنجید. PIC به ارزش یک نشانگر جهت شناسایی چندشکلی اشاره می‌کند و به تعداد آلل‌های شناسایی‌شده و فراوانی آن‌ها بستگی دارد (رابطه ۱-۱).

PIC =۱ − حاصل جمع مربع فراوانی آلل‌ها **(رابطه ۱- ۱)**

با مقایسه ارزش‌های PIC اطلاعات خامی را که نشان‌دهنده توان انواع نشانگرهای مولکولی است می‌توان در اختیار محققان قرار داد تا به سؤالات خاص ژنتیک آبزیان پاسخ داده شود (بوتستین[6] و همکاران، ۱۹۸۰).

---

[1] Obrien
[2] Quantitative trait loci
[3] Liu
[4] Cordes
[5] Polymorphic information content
[6] Botstein

۱-٦-۵- نشانگرهای پروتئینی

برخی از تفاوت‌ها در ترتیب نوکلئوتیدی DNA بین دو موجود ممکن است به صورت پروتئین‌هایی با اندازه‌های مختلف تجلی یابند و از طریق بیوشیمیایی قابل رویت بوده و مورد مطالعه قرار می‌گیرند. از این نشانگرها می‌توان به ایزوزایم/ آلوزایم اشاره نمود (کاروالهو[1]، ۱۹۹۸). از مزایای این نشانگرها این است که تحت تأثیر عوامل محیطی نمی‌باشند، امکان مطالعه تعداد زیادی ژن به طور هم‌زمان وجود دارد و از عیوب این نشانگرها می‌توان به نیاز داشتن مقدار زیادی نمونه تازه یا تازه فریزشده (کشتن موجود زنده)، چندشکلی پایین و محدودیت روش‌های رنگ‌آمیزی و مشکل بودن تجزیه و تحلیل داده‌ها اشاره نمود (فرگوسن[2]، ۱۹۹۵).

۱-٦-٦- نشانگرهای DNA

این نشانگرها تفاوت‌های موجود در سطح DNA که نه صفت خاصی را کنترل می‌کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینه رشته‌های پلی‌پلوئیدی تأثیر به جای می‌گذارند، تشخیص می‌دهند. در واقع نشانگرهای DNA چندشکلی را در سطح DNA تعیین می‌کنند (قره‌یاضی، ۱۳۷۵). این نشانگرها را می‌توان به دو دسته مبتنی بر واکنش زنجیری پلیمراز و نشانگرهای غیر مبتنی بر واکنش زنجیری پلیمراز دسته‌بندی کرد. به جهت مزایای قابل توجه ریزماهواره‌ها و انتخاب آن‌ها در این تحقیق به توضیح بیشتری پرداخته می‌شود.

۱-٦-۷- نشانگرهای ریزماهواره

واژه ریزماهواره در سال ۱۹۸۵ توسط جفری[3] مطرح گردید و مفهوم آن توالی کوتاه تکرارشونده در ژنوم موجودات است. علت اصلی کاربرد این نشانگرها قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه و تحلیل‌های جمعیتی و همچنین مطالعات اکولوژیکی است. در واقع ریزماهواره‌ها توالی‌هایی از یک قطعه اصلی (٦-۱ جفت باز) می‌باشند که چندین بار در کنار هم تکرار شده‌اند. اگر این تکرارها به اندازه کافی بلند و پشت سر هم باشند، به علت چندشکلی بالا نشانگرهای ژنتیکی خوبی خواهند بود.

---

[1] Carvalho
[2] Fergusen
[3] Jeffrey