دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم دریایی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته مهندسی شیلات

امکان سنجی تفکیک آزاد ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

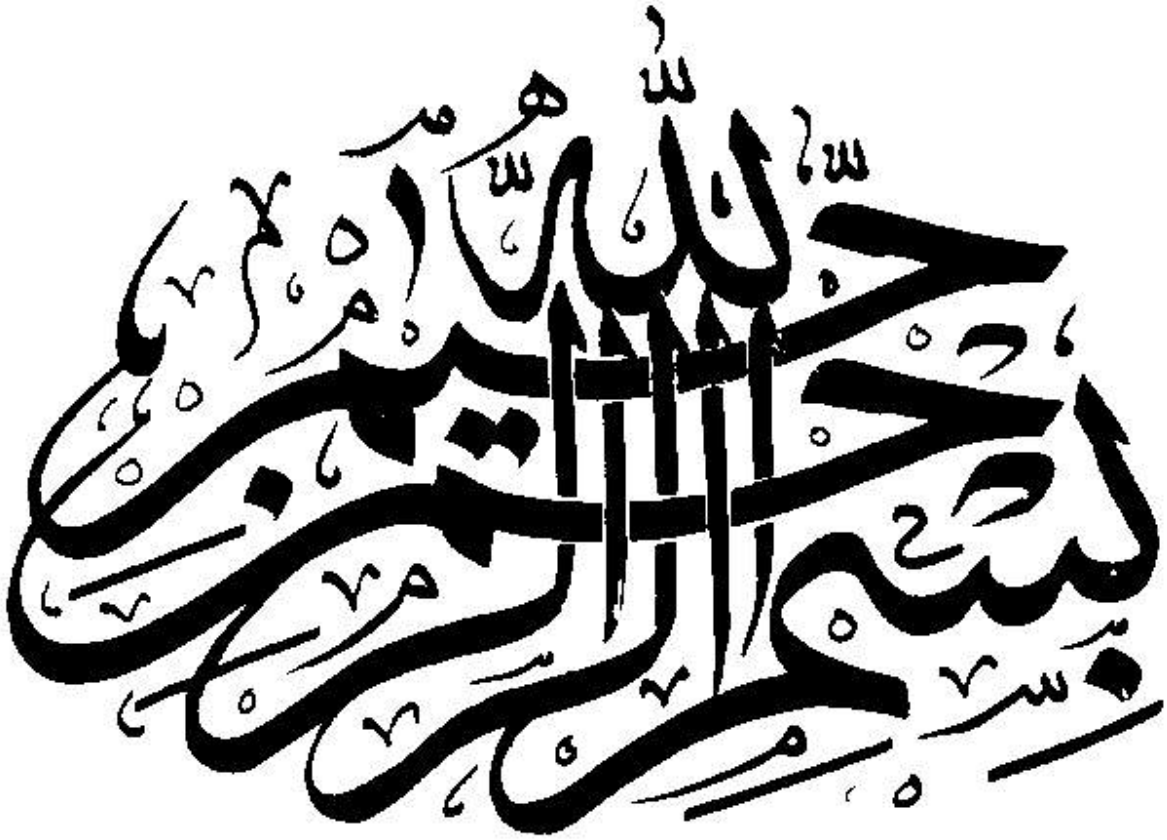
نگارنده:

انسیه حبیبی

استاد راهنما:

دکتر محمد رضا کلباسی

بهمن ۱۳۸۸


بسم الله الرحمن الرحيم

باسمه تعالی

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

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه(رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: درصورت اقدام به چاپ پایان‌نامه(رساله)ی خود، مراتب را قبلا" به طور کتبی به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهید.

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

« کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **مهندسی شیلات** است که در سال ۱۳۸۸ در دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکتر محمدرضا کلباسی مسجدشاهی** و مشاوره جناب آقایان دکتر **سید جواد حسینی** و **مهندس سید احمد قاسمی** از آن دفاع شده است. »

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به « دفتر نشر آثار علمی » دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند 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 می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **انسیه حبیبی** دانشجوی رشته **مهندسی شیلات** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی : انسیه حبیبی

تاریخ و امضاء :

آیین‌نامه 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 پایان نامه/ 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 دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه 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 و یا نرم افزار و یا آثار ویژه 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 آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱٥ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم دریایی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته مهندسی شیلات

امکان سنجی تفکیک آزاد ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

نگارنده:

انسیه حبیبی

استاد راهنما:

دکتر محمد رضا کلباسی

استاد مشاور:

دکتر سید جواد حسینی

مهندس سید احمد قاسمی

بهمن ۱۳۸۸

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی،

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است،

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید،

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند،

این مجموعه را به **پدر و مادر** عزیزم تقدیم می نمایم.

تشکر و قدردانی:

سپاس خدایی که اول و آخر وجود است.

پس از حمد و سپاس خداوند متعال بر خود لازم می‌دانم از زحمات تمام کسانی کـه در مراحـل مختلـف انجـام این تحقیق مرا یاری رساندند مراتب قدردانی را به عمل آورم.

از استاد راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر **محمدرضا کلباسی** که راهنمایی این پایان نامه را به عهده گرفتنـد و در تمام مراحل تحقیق مرا یاری نمودند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید مشاور آقایان دکتر **سید جواد حسینی** و مهندس **سید احمد قاسمی** تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر **عابدیان** و جناب آقای دکتر **بهمنش** که زحمت داوری این پایان نامه را به عهـده گرفتنـد، سپاسگزارم.

از مرکز مطالعات خلیج فارس و مرکز تحقیقات و زیست فن آوری دانشگاه تربیت مدرس که امکـان بـه انجـام رسیدن این پایان نامه را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می نمایم.

از **پدر** و **مادر و خانواده** عزیز و مهربانم که همواره نشان دهنده راه درست زندگیم بـوده و در تمـام مراحـل این تحقیق مرا یاری و راهنمایی نموده و پشتیبانم بوده‌اند کمال تشکر را داشته و بوسه بر دستان پر محبـت‌شـان می زنم.

در آخر از تمام دوستان عزیزم که در مراحل انجام پایان نامه مرا یاری نمودند، تقدیر و تشکر می نمایم.

چکیده فارسی

ماهی آزاد دریای خزر گونه بومی ارزشمند دریای خزر است که در معرض خطر انقراض می باشد. دارای دو فرم مهاجر بهاره و پاییزه است که از نظر خصوصیات ظاهری نیز تفاوت هایی در آنها وجود دارد. شناخت دقیق و تفکیک ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه در امر بازسازی ذخائر و حفظ تنوع ژنتیکی این گونه ارزشمند ضروری است. در این تحقیق به منظور بررسی امکان تفکیک انواع مهاجر بهاره و پاییزه ماهی آزاد دریای خزر از نشانگر مولکولی AFLP استفاده گردید. ۱۲ ترکیب پرایمر *MseI/ EcoRI* ، در مجموع ۸۰۷ باند قابل امتیاز دهی ایجاد کردند که ۲۲۷ عدد ازآنها چند شکل بودند. درصد لوکوس های پلی مورفیسم در ماهیان مهاجر بهاره (۸۵/۰۲ ٪) نسبت به ماهیان مهاجر پاییزه (۷۶/۲۱ ٪) بیشتر بود. در سطح هتروزیگوسیتی تفاوت معنی داری بین انواع مهاجر پاییزه (۰/۲۰۷) و بهاره (۰/۲۲۷) وجود نداشت. اما این میزان در مهاجرین بهاره بیشتر از پاییزه ها بود که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بیشتر در ماهیان مهاجر بهاره نسبت به مهاجر پاییزه است. میانگین پلی مورفیسم ۸۰/۶۲ در صد بیان شد. فاصله ژنتیکی بر مبنای ضریب Nei، ۰/۰۳۴ و اختلاف بین دو جمعیت ۶ در صد و درون جمعیت ۹۴ در صد محاسبه شد. اختلاف ژنتیکی درون جمعیت بیشتر از اختلاف بین جمعیت بوده است. این امر را می توان با تفاوت بین افراد درون جمعیت ها و تأثیر عوامل محیطی توجیه کرد. نتایج نشان داد که اختلاف ژنتیکی معنی داری بین ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه وجود ندارد احتمالاً انواع بهاره جزئی از جمعیت پاییزه می باشند که در این فصل سال اقدام به مهاجرت می کنند و تفاوت موجود را می توان به عوامل فیزیولوژیک و محیطی نسبت داد. به نظر می رسد این دو گروه ماهیان از یک جمعیت منشأ گرفته باشند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، AFLP، ماهی آزاد دریای خزر, مهاجر پاییزه, مهاجر بهاره.

فهرست مطالب	صفحه
فصل اول- مقدمه و کلیات	
۱-۱-مقدمه	۱
۱-۱-۱- ضرورت تحقیق	۴
۱-۱-۲- هدف تحقیق	۵
۱-۱-۳-فرضیه تحقیق	۵
۱-۲- کلیات	۶
۱-۲-۱- ژنتیک جمعیت	۶
۱-۲-۲- جمعیت	۷
۱-۲-۳- ساختار جمعیت	۷
۱-۲-۴- تنوع ژنتیکی	۷
۱-۲-۵- تفاوت ژنتیکی	۸
۱-۲-۶- فاصله ژنتیکی	۹
۱-۲-۷- روش‌های حفظ تنوع ژنتیکی	۹
۱-۲-۸- نشانگرهای مولکولی	۱۰
۱-۲-۹- نشانگر مولکولی AFLP	۱۳
۱-۲-۹-۱- مراحل روش AFLP	۱۴
۱-۲-۹-۱-۱- هضم با آنزیم های برشی	۱۴
۱-۲-۹-۱-۲- اتصال آداپتورهای الیگونوکلئوتیدی	۱۵
۱-۲-۹-۱-۳- تکثیر پیش از مرحله انتخاب	۱۶
۱-۲-۹-۱-۳- تکثیر انتخابی	۱۷
۱-۲-۹-۲- مزایای AFLP	۱۷
۱-۲-۹-۳- معایب AFLP	۱۹
۱-۲-۹-۴- کاربرد AFLP	۲۰
فصل دوم- مروری مطالعات انجام شده	
۲- مروری بر مطالعات انجام شده	۲۲
فصل سوم- مواد و روش ها	۲۸
۳-۱- مواد	۲۸
۳-۱-۱- مواد مصرفی	۲۸
۳-۱-۱-۱- استخراج DNA و بررسی کیفت و کمیت آن	۲۸
۳-۱-۱-۲- آزمایشات PCR	۲۸

۳-۱-۱-۳- ساخت آداپتورهای *EcoR1* و *MseI* ۲۹
۳-۱-۱-۴- هضم آنزیمی ۲۹
۳-۱-۱-۵- اتصال آداپتور به DNA هضم شده ۲۹
۳-۱-۱-۶- الکتروفورز محصول PCR و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با استفاده از نیترات نقره ۳۰
۳-۱-۲- وسایل و تجهیزات مورد نیاز ۳۰
۳-۲- روش ها ۳۱
۳-۲-۱- نمونه برداری ۳۱
۳-۲-۲- تهیه و آماده سازی بافر ها و محلول ها ۳۱
۳-۲-۲-۱- تهیه بافر STE (Sodium Cloride, Tris, EDTA) ۳۱
۳-۲-۲-۲- ساخت بافر TAE (۱۰x) ۳۱
۳-۲-۲-۳- TBE ۱۰X ۳۱
۳-۲-۲-۴- لودینگ بافر ۳۲
۳-۲-۲-۵- SDS ۱۰ درصد (سدیم دو دسیل سولفات) ۳۲
۳-۲-۲-۶- آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد (APS) ۳۲
۳-۲-۲-۷- استات آمونیوم NH_4OAc ۳۲
۳-۲-۲-۸- آماده سازی محلول بایند (Bind) ۳۲
۳-۲-۲-۹- آماده سازی مارکر Lader ۳۲
۳-۲-۲-۱۰- محلول اکریل آمید ۴۰٪ ۳۳
۳-۲-۲-۱۱- محلول اکریل آمید ۶٪ ۳۳
۳-۲-۳- استخراج DNA ژنومی (کل) ۳۳
۳-۲-۳-۱- مراحل استخراج DNA ۳۳
۳-۲-۴- ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده ۳۴
۳-۲-۴-۱- روش اسپکتروفتومتری ۳۴
۳-۲-۴-۲- روش الکتروفورزی ۳۵
۳-۲-۵- رقیق سازی نمونه ها ۳۶
۳-۲-۶- اجرای مراحل AFLP ۳۷
۳-۲-۶-۱- واکنش هضم آنزیمی ۳۷
۳-۲-۶-۲- واکنش ساخت آداپتورها ۳۷
۳-۲-۶-۳- واکنش اتصال آداپتور به قطعات حاصل از هضم ۳۸
۳-۲-۶-۴- واکنش PCR پیش انتخابی ۳۸

۳-۲-۶-۵- واکنش PCR انتخابی ۴۰
۳-۲-۷- الکتروفورز محصول بدست آمده از PCR انتخابی ۴۱
۳-۲-۷-۱- آماده سازی دستگاه الکتروفورز جهت تزریق ژل ۴۱
۳-۲-۷-۲- طرز ساخت ژل اکریل آمید ۶٪ ۴۱
۳-۲-۷-۳- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل امید با نیترات نقره ۴۲
۳-۲-۸- آنالیز داده ها ۴۳
فصل چهارم- نتایج
۴-۱- نتایج بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده ۴۴
۴-۱-۱- روش الکتروفورز ۴۴
۴-۱-۱- اسپکتروفتومتری DNA ۴۵
۴-۲- بررسی کیفی محصول PCR پیش انتخابی ۴۶
۴-۳- نتایج PCR انتخابی ۴۷
۴-۴- تجزیه و تحلیل مولکولی ۵۲
فصل پنجم- بحث و نتیجه گیری
۵-۱- بحث ۵۶
۵-۲- نتیجه گیری کلی ۶۵
۵-۳- پیشنهادات پژوهشی ۶۶
فهرست منابع ۶۷
چکیده انگلیسی ۷۷

فهرست جداول | صفحه

جدول ۳-۱ توالی پرایمر های استفاده شده در واکنش PCR انتخابی ۲۹

جدول ۳-۲ مقادیر مورد نیاز واکنشگرهای هضم آنزیمی ۳۷

جدول ۳-۳ مقادیر مورد نیاز واکنشگرهای اتصال آداپتور به قطعات حاصل از هضم ۳۸

جدول ۳-۴ مقادیر واکنشگرهای PCR پیش انتخابی ۳۹

جدول ۳-۵ چرخه حرارتی PCR پیش انتخابی ۳۹

جدول ۳-۶ مقادیر واکنشگرهای PCR انتخابی ۴۰

جدول ۳-۷ چرخه حرارتی PCR انتخابی ۴۱

جدول۴-۱ اعداد حاصل از اسپکتروفتومتری DNA استخراج شده توسط روش استات آمونیوم، نمونه-های پاییزه ماهی آزاد دریای خزر ۴۵

جدول ۴-۲ اعداد حاصل از اسپکتروفتومتری DNA استخراج شده توسط روش استات آمونیوم، نمونه‌های بهاره ماهی آزاد دریای خزر ۴۶

جدول ۴-۳ نمونه ای از امتیاز دهی باندهای پلی مورف (هر باند پلی مورف یک لوکوس) در نرم افزار Excel ۴۷

جدول ۴-۴ ۱۲ ترکیب پرایمر مورد استفاده در واکنش PCR انتخابی ۴۸

جدول ۴-۵ تعداد باندهای کل و باندهای چند شکل امتیازدهی شده حاصل از ۱۲ ترکیب AFLP پرایمر ۴۸

جدول ۴-۶ نتایج حاصل از الگوی آللی(Allelic Pattern (APT ۵۳

فهرست اشکال و نمودارها | صفحه

شکل ۱-۱ خلا صه ای از مراحل روش AFLP ۱۳

شکل۱- ۲ ساختار آداپتورها, حایگاه نوکلئوتیدهای انتخابی و جایگاه اتصال پرایمر به آداپتور ۱۶

شکل ۳-۱ دستگاه الکتروفورز افقی ۳۶

شکل ۳-۲ دستگاه DNA sequencing gel (38×30) ۴۲

شکل ۴-۱ نمونه ای از ژل آگارز بررسی کیفیت DNA استخراج شده به روش استات آمونیوم ۴۴

شکل ۴-۲ الکتروفورز نمونه ای از محصول PCR پیش انتخابی بر روی ژل آگارز ۴۷

شکل ۴-۳ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر J (3E/8M) ۴۹

شکل ۴-۴ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر G (2E/6M) ۵۰

شکل ۴-۵ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر D (2E/1M) ۵۰

شکل ۴-۶ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر H (4E/6M) ۵۱

شکل ۴-۷ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر I (5E/7M) ۵۱

شکل ۴-۸ ژل تولید شده توسط ترکیب پرایمر M (4E/3M) ۵۲

نمودار۴-۱ نمودار حاصل از Allelic pattern (APT) ۵۳

نمودار۴-۲ نمودار حاصل از PCA برای آزادماهیان مهاجر پاییزه و بهاره دریای خزر ۵۴

نمودار۴-۳ نمودار خوشه ای بر اساس روش UPMGA در نرم افزار TFPGA برای آزادماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر ۵۵

فصل اول

مقدمه و کلیات

فصل ۱

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

ماهی قزل آلای قهوه ای (*Salmo trutta*) یکی از مهمترین گونه‌های آزاد ماهیان می‌باشد. پراکنش اصلی آن به اروپا محدود می‌شود. این ماهی دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیاد در بین جمعیت‌های بومی می‌باشد (Lerceteau وWeiss، ۲۰۰۶). زمانی که این ماهیان در رودخانه‌ها و دریاچه‌های مختلف زندگی می‌کنند به صورت جمعیت‌های جدا از هم قرار می‌گیرند. ریزش‌های جوی و انشعابات رودخانه‌ها ممکن است اختلافات ژنتیکی را در بین این ماهیان تسهیل کنند. بازگشت ماهیان به رودخانه‌های محل تولد خود جهت تخم ریزی (فرآیند Homing) نیز ممکن است بر تنوع ژنتیکی آنها موثر باشد (Was و Wenne، ۲۰۰۲). بخشی از تنوع درون گونه‌ای این ماهیان به دلیل فشارهای ناشی از فعالیت‌های انسانی مثل آلودگی های کشاورزی و صنعتی، تخریب زیستگاهها، تنزل و تغییر شرایط محیطی، برداشت شن و ماسه و تخریب دهانه رودخانه‌ها، صید بی رویه (ماهیگیری تجارتی و ماهیگیری با قلاب)، انتقال غیر قانونی ماهیان به مکان‌های دیگر، ذخیره سازی ماهیان در برنامه‌های افزایش ذخایر (به‌طوری که ذخیره سازی ماهیان وحشی و پرورشی باعث درون آمیزی بین آنها خواهد شد) از بین رفته است (Jug و همکاران، ۲۰۰۵؛ Sonstebo و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین تقسیم شدن زیستگاه اولیه به واحدهای کوچکتر، کاهش تنوع ژنتیکی را تسریع می کند که احداث سدها یکی از مهمترین خطرات در این زمینه است و باعث یکپارچگی جمعیت ماهیان می‌شود (Ayllon و همکاران، ۲۰۰۶).

محدوده اصلی زیستگاه ماهی آزاد دریای خزر در سواحل غربی و جنوبی می‌باشد و پراکنش آن در سواحل شمالی و همچنین سواحل شرقی این دریا بسیار محدود است. بر اساس دوره مهاجرت تولید مثلی،

این ماهی جزو ماهیان رود کوچ می‌باشد. این ماهی عمده عمر خود را در محیط‌های دریایی سپری کرده و پس از بلوغ (در سن ۴ الی ۵ سالگی) به رودخانه مادری جهت تخم ریزی مهاجرت می‌کند و دارای دو فرم مهاجر بهاره (ماهی آزاد) و پاییزه (تیان) می‌باشد. فرم بهاره نسبت به فرم پاییزه از بدن دوکی شکل تری برخوردار بوده و نقره‌ای فام می باشد (کازانچف، ۱۳۷۱).

مطابق آمار موجود در گذشته، بخش اعظم را (۷۰٪) فرم پاییزه و حدود ۳۰٪ را فرم بهاره تشکیل می‌داد، اما در سالیان اخیر به دلیل آن که فعالیت‌های مراکز باز سازی ذخایر تنها محدود به انواع پاییزه بوده است، نسبت اشکال پاییزه در جمعیت‌های مهاجر به شدت افزایش یافته است؛ به‌طوری که در سال ۸۵-۱۳۸۴ کمتر از ۵۰ قطعه مولد آزاد بهاره در سواحل غربی استان مازندران صید شده است. متاسفانه تلاش‌های صورت گرفته به‌منظور نگهداری مولدین بهاره در مراکز تکثیر و تولید بچه ماهی از اشکال بهاره تا کنون با موفقیت همراه نبوده است. از طرف دیگر این احتمال نیز مطرح است که انواع بهاره در واقع خود بخشی از جمعیت پاییزه باشند که تحت تاثیر برخی پارامترهای درونی (فیزیولوژیک- هورمونی) یا بیرونی (آب و هوایی) اقدام به مهاجرت در فصل بهار می‌کنند. این گمانه زمانی بیشتر تقویت می‌شود که بدانیم در طی سالیان متمادی تکثیر مصنوعی و رها سازی ماهی آزاد، هرگز موفقیتی در جهت تکثیر و رها سازی انواع بهاره حاصل نشده است و از طرف دیگر با توجه به کاهش شاخص های اکولوژیک رودخانه ها خصوصا برای دوره طولانی بهار تا پاییز (زمان مهاجرت تا تولید مثل) حداقل در حاشیه جنوبی دریای خزر، امکان تکثیر طبیعی آنها نیز میسر نمی باشد و لازم است بدانیم ماهی آزاد دریای خزر در لیست قرمز IUCN redlist (ماهیان در حال انقراض) قرار گرفته است (Kiabi و همکاران، ۱۹۹۹).

در گذشته ارزیابی ذخایر، تشخیص گونه‌ها و جمعیت‌ها با استفاده از صفات مورفومتریک و مریستیک صورت می‌گرفت اما با توجه به حساسیت بالای این صفات و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت ماهیان و همچنین محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها، علم استفاده از نشانگرهای مولکولی همچون Microsatellite، RAPD، RFLP، AFLP وAllozym جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر توسعه یافت. این نشانگرها به طور گسترده ای در بسیاری زمینه ها از قبیل نقشه

یابی و ردیابی ژن ها، تعیین جنسیت، بررسی تنوع ژنتیکی یا روابط ژنتیکی به کار می روند (Adams و Hutchings، ۲۰۰۳). روشهای مبتنی بر DNA امروزه بهترین روش هایی هستند که برای تمایز بین موجودات بسیار نزدیک به هم انتخاب می شوند. یک نشانگر مولکولی مناسب باید خصوصیاتی از قبیل: توارث مندلی، پلی مورفیک بودن، هم بارزی، خنثی بودن، مستقل بودن از محیط، نداشتن اپیستازی و تکرارپذیری بالا در طول ژنوم را دارا باشد. AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) نشانگر جدیدی است که تمام ویژگیهای یک نشانگر مولکولی مناسب، غیر از همبارز بودن را دارا می باشد؛ اما به علت پلی مورفیسم بالایی که تشخیص می دهد، خصوصا در مواقعی که روابط نزدیکی وجود دارد، کارآمدترین نشانگر ها می باشند (Bonin و همکاران، ۲۰۰۵). این نشانگر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده و تلفیقی از روشهای RFLP و RAPD می باشد که بر مشکلات آنها فائق آمده است (Liu و Cordes، ۲۰۰۴). در مقایسه با RFLP که فقط جایگاه برش جهت تفاوت در توالی DNA استفاده می شود؛ نوکلئوتید انتخابی در AFLP، امکان شناسایی پلی مورفیسم پشت جایگاه برش را فراهم می کند. همچنین این روش ظرفیت شناسایی جهش های نقطه ای بیشتری را نسبت به RFLP داراست (Vos و همکاران، ۱۹۹۵). در روش RAPD، به دلیل حساسیت بالای این نشانگر به مسائلی از قبیل: شرایط واکنش، غلظت DNA الگو و خلوص آن و پروفیل دمایی PCR، کاربرد آن محدود شده است. AFLP در شرایط اتصال (Annaeling) شدیدترکه قابلیت تکثیر بهتر را تضمین می کند، انجام می شود (Folkertsma، ۱۹۹۶). قابلیت اعتماد بالای نشانگر AFLP می تواند منجر به جایگزین شدن آن با نشانگر RAPD شود. همچنین در مطالعه مقایسه ای که توسط Campbell و همکاران (۲۰۰۳) بین روش AFLP و میکروستلایت، انجام شد، بیان شد که AFLP ممکن است در مطالعات ارزیابی جمعیتی به خصوص زمانی که تفاوت جمعیت ها اندک بوده و در مقیاس های بزرگ به دلیل نشان دادن تعداد لوکوس های زیاد، نسبت به میکروستلایت ارجح تر است (Muller و Wolfenbarger، ۱۹۹۹) و قطعات با ارزشی را برای موجوداتی که نشانگرهای میکروساتلایت آنها مشکل به دست می آید، فراهم می کند (Bonin و همکاران، ۲۰۰۵). سهولت استفاده از این نشانگر ممکن است منجر به جایگزین شدن آن با نشانگرهای خوب دیگری چون RFLP و

میکروستلایت حداقل در پاره ای مسائل از قبیل QTL و تفاوت جمعیتی شود (Muller و Wolfenbarger، ۱۹۹۹) شود.

از جمله مزایای این روش این است که به پروب یا اطلاعات اولیه از ژنوم که برای RFLP و دیگر روش ها ضرورت دارد، نیاز ندارد (Okumus و Ciftci، ۲۰۰۳). این امر به خصوص برای آبزیان پرورشی که اغلب اطلاعات مولکولی قابل دسترس برای آنها وجود ندارد، مفید است. AFLP به دلیل این که هر ترکیب پرایمر آن می تواند نشانگرهای پلی مورفیسم زیادی را در یک ژل تولید کند، نسبتا اقتصادی است و تنها مقدار کمی DNA برای آن لازم است. استفاده از این نشانگر در تحقیقات ژنومی در کنار نشانگرهایی چون میکروساتلایت، روش سریع تری برای ارزیابی نشانگرهای مرتبط با رفتار های خاص، فراهم می کند (Liu، ۲۰۰۷).

نشانگرAFLP در بسیاری از آنالیز های ژنتیکی از قبیل: سیستماتیک مولکولی، آنالیز ساختار جمعیت، مهاجرت، شناسایی هیبریدها، نژادها، آنالیز منابع ژنتیکی، تنوع ژنتیکی، اکولوژی مولکولی، نقشه ژنومی، انتخاب نشانگرهای پیوسته، شناسایی گونه های در معرض خطر کاربرد دارد. به کارگیری این روش در مطالعات ژنتیک جمعیت ماهی در حال افزایش است و در آینده احتمالا وسیع تر خواهد شد (Liu، ۲۰۰۷).

۱-۱-۱ ضرورت تحقیق

ماهی آزاد در سالهای اخیر موج مناسبی از تحقیقات را به خود معطوف کرده است که بخشی از آن تحقیقات مرتبط با ژنتیک مولکولی است (Jug وهمکاران، ۲۰۰۵؛ Ayllon و همکاران، ۲۰۰۶؛ Campos و همکاران، ۲۰۰۶؛Sonstebo و همکاران، ۲۰۰۷؛ Apostolidis و همکاران، ۲۰۰۸). با توجه به اهمیت شناخت دقیق و تفکیک ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه در امر بازسازی ذخائر این گونه ارزشمند و با عنایت به نتایج تحقیقات اخیر با استفاده از روش های میکروساتلایت (شیرنگی، ۱۳۸۷) و همچنین روش توالی یابی و RFLP بخش cytb و DNA D-loop میتوکندری (جمشیدی، ۱۳۸۷) که قادر به تفکیک و جداسازی دقیق ماهیان مورد مطالعه به عنوان جمعیتهای مستقل نبوده است، ضرورت استفاده از سایر تکنیک های مولکولی و نشانگرهای تخصصی تر برای این امر تبیین می گردد. لذا در این تحقیق با انتخاب نشانگر

AFLP و تمرکز مطالعات بر روی موضوع فوق الذکر تلاش می گردد تا پاسخ مناسبی برای این سؤال که آیا تشخیص تنوع ژنتیکی آزاد ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر با استفاده از نشانگر AFLP امکان پذیر است، یافت شود.

۱-۱-۲ هدف تحقیق:

تشخیص تنوع ژنتیکی آزاد ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP.

۱-۱-۳ فرضیه تحقیق:

تنوع ژنتیکی آزاد ماهیان مهاجر بهاره و پاییزه دریای خزر به عنوان جمعیتهای مستقل با استفاده از نشانگر AFLP قابل تشخیص می باشد.

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱ ژنتیک جمعیت[1]

ژنتیک جمعیت را می توان به عنوان علمی که چگونگی تغییرات ژنتیکی توزیع شده بین گونه ها، جمعیت ها و افراد را بیان می کند، تعریف کرد و اساساً در آن به روند تکاملی جهش، انتخاب، دریفت (Drift) ژنتیکی تصادفی و مهاجرت که بر قابلیت تغییرپذیری ژنتیکی موثر هستند، پرداخته می شود (Hansen، ۲۰۰۴). الگوی تنوع و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت ها می تواند راهنمایی برای تاریخچه درجه جدایی تکاملی جمعیت ها فراهم آورد. تفاوت ژنتیکی به عنوان تفاوت در کیفیت و کمیت آلل ها ژن ها و کروموزوم ها و ترتیب ژن ها روی کروموزوم ها که درون و بین جمعیت های انتخاب شده حضور دارند، بیان می شوند (Garza و Williamson، ۲۰۰۱؛ Okumus و Ciftci، ۲۰۰۳). اهداف کلی تحقیقات ژنتیک جمعیت، تشخیص وسعت تنوع ژنتیکی داخل گونه‌ها و محاسبه این تنوع می‌باشد. میزان تنوع ژنتیکی داخل و بین جمعیت‌ها را می‌توان توسط فراوانی‌های ژن‌ها و عواملی که بر فراوانی آن ها تاثیرگذار است، مثل مهاجرت، جهش، به‌گزینی و رانش ژنتیکی تعیین کرد. در طی دو دهه گذشته، مقدار زیادی از اطلاعات ژنتیکی ژنوتیپ و فراوانی آللی بسیاری از گونه‌ها به‌دست آمده که از جمله بسیاری از گونه‌های ماهیان که به‌طور اولیه از طریق روش‌های ژنتیک مولکولی پروتئینی و DNA حاصل شده‌اند. این مطالعات نشان داده‌اند که اکثر گونه‌ها به واحدهای متمایزتر و یا تمایز یافته کم‌تری تقسیم می‌شوند که از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوتند. در این مرحله برای جلوگیری از اشتباه با عباراتی مثل جمعیت، زیرجمعیت، گونه و زیر گونه باید گروه‌های بین گونه‌ای ماهیان تفسیر شوند (Ciftci و Okumus، ۲۰۰۳).

[1] Genetic population