http://www.SmartPDFCreator.com

دانشکده منابع طبیعی
گروه شیلات

پایان نامه کارشناسی ارشد

کاربرد مارکرهای مولکولی (**mtDNA** و میکروستلایت) در تفکیک تاسماهی ایرانی (***Acipenser persicus***) از تاسماهی روسی (***A.gueldenstaedtii***)

از
کامبیز باقری

استاد راهنما
دکتر محمد پورکاظمی

بهمن 1388

http://www.SmartPDFCreator.com

دانشکده منابع طبیعی
گروه شیلات

عنوان:

کاربرد مارکرهای مولکولی (**mtDNA** و میکروستلایت) در تفکیک تاسماهی ایرانی (***Acipenser persicus***) از تاسماهی روسی (***A.gueldenstaedtii***)

از:
کامبیز باقری

استاد راهنما:
دکتر محمد پورکاظمی

اساتید مشاور:
دکتر مجیدرضا خوش خلق
مهندس محمد حسن زاده صابر

بهمن88

http://www.SmartPDFCreator.com

تقدیم به:

پدر و مادرم ، اسطوره هاي صبر ، محبت ، گذشت و شمع هاي فروزان زندگیم.

و به همسر مهربان و عزیزم

برای همه وقت هایی که به من اعتماد کردی

http://www.SmartPDFCreator.com

تقدیر و تشکر

اکنون که به یاری خداوند نگارش این پایان‌نامه به اتمام رسید، وظیفه خود می‌دانم که از زحمات تمام افرادی که مرا راهنمایی و یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی نمایم. در ابتدا از جناب آقای دکتر پورکاظمی که کار با ایشان برای من افتخاری بزرگ بود، کمال قدردانی و تشکر را دارم. همچنین مراتب سپاسگزاری خود را از استادان گرانقدر آقایان دکتر خوش خلق و مهندس حسن زاده که از تجربیات ارزشمند و راهنمایی‌های آموزنده‌اشان نهایت استفاده را برده‌ام، اعلام می‌دارم. از کلیه اساتید گرانقدر که در طی این سال‌ها به من آموختند و از مصاحبتهای صادقانه-اشان بهره‌مند شده‌ام، کمال سپاس و امتنان را دارم. از مدیریت و کارکنان انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را با اینجانب داشته‌اند، تشکر می‌نمایم. از همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم ، از سرکارخانم مهندس نرگز زاده به خاطر کمک های بی دریغشان و کارشناسان بخش ژنتیک انستیتو ماهیان خاویاری و سایر عزیزانی که در این مدت یار و همراهم بوده‌اند، نهایت قدردانی را دارم. در نهایت از خانواده و پدر و مادر عزیزم که در طول این سال‌ها همواره مشوق و پشتیبانم بوده‌اند و همسر مهربان که مایه دلگرمی و امیدم بود تشکر می-نمایم. امیدوارم که نتایج این تحقیق توانسته باشد ذره‌ای از زحمات این بزرگواران را پاسخگو بوده باشد.

کامبیز باقری

بهمن 88

http://www.SmartPDFCreator.com

فهرست مطالب

چکیده فارسی ..... ش
چکیده انگلیسی ..... ص

فصل اول: مقدمه و کلیات
1-1-مقدمه 2
1-1-1-اهمیت و ضرورت تحقیق 2
1-2 -کلیات 5
1-2-1- سیستماتیک تاسماهیان 5
1-2-2- تاسماهي روسی 5
1-2-3 - بیولوژي ماهي تاسماهی روسی 6
1-2-4 - تاسماهی ایرانی 6
1-2-5- بیولوژي ماهي تاسماهی ایرانی 7
1-3- نشانگرها (markers) 7
1-3-1- نشانگرهای مورفولوژیک 8
1-3-2- نشانگرهای بیو شیمیایی 8
1-3-3- نشانگرهای DNA وmtDNA 9
1- 4-میکروستلایت (Microsatellite) 10
1-5- نشانگرهای DNA میتوکندریایی (mtDNA) 11
1-6- تاریخچه مطالعه مارکرهای مولکولی در علوم شیلاتی 13
1-7- کاربرد هاي میکروستلایت 15
1-7-1- مطالعات ساختار جمعیت و محافظت 15
1-7-2- شناساییDNA گونه و والدین و روابط والدینی 16
1-7-3- همه گیری و آسیب شناسی مولکولی 17
1-7-4- نقشه های ژنتیکی و نقشه های لینکاژی 17
1-7-5- نقشه لوسای صفات کمی 17
1-7-6- انتخاب به کمک مارکر MAS 18
1-7-7- Cell line 18
1-7-8- کاربرد میکروستلایت در مطالعات فیلوژني 18
1-8- انشقاق گونه ها 19
1-8-1- حالتهاي ممکن منشاء گونه ها 21
1-8-2- عوامل موثر بر گونه زایي 22
1-9- مطالعات انجام شده براي تفکیک دو گونه تاسماهي ایراني و روسي .. 23

فصل دوم: مواد و روش ها
2-1- روش کار 28
2-1-1- نحوه آوری نمونه 28
2-1-2- استخراج DNA کل 28
2-2- ارزیابي کمیت و کیفیت DNA استخراج شده 29
2-2-1- ارزیابي کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتري 29

http://www.SmartPDFCreator.com

2-2-2- ارزیابی کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 29
2-3- تهیه پرایمرهای میکرو ستلایت 31
2-4- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) 31
2-4-1- انجام PCR 32
2-4-2- تهیه ژل پلی‌اکریلامید 33
2-5- تهیه پرایمر سیتوکروم b 34
2-6- ثبت تصاویر 35
2-7-تجزیه و تحلیل آماری داده ها 35

فصل سوم: نتایج
3-1- نتایج حاصل از استخراج DNA 37
3-2- نتایج حاصل از PCR آغازگرهای میکروستلایت 38
3-2-1-فاصله ژنتیکی با استفاده از مارکر میکروستلایت 55
3-2-2- رابطه خویشاوندی با استفاده از روش UPGMA 56
3-2-3-تست AMOVA 57
3-3-نتایج حاصل از PCR ژن سیتوکروم b 58
3-3-1-توالی یابی ژن Cyt b 59
3-4- ثبت ژن تاسماهی ایرانی 59
3-4-1- تعداد و درصد فراوانی نوکلئوتید های ژن سیتوکروم b در تاسماهی ایرانی 62
3-5-ثبت ژن تاسماهی روسی 63
3-5-1-تعداد و درصد فراوانی نوکلئوتید های ژن سیتوکروم b در تاسماهی روسی 65
3-6- مقایسه الگوی نوکلئوتیدي ژن سیتوکروم b در تاسماهی ایرانی و روسی 66
3-6-1- تخمین الگوی جانشینی نوکلئوتید 69
3-6-2- اختلاف ژنتیکی 70
3-7- نتایج آنالیز فیلوژني 71
3-7-1-محاسبه درجه خویشاوندي 71
3-7-2- مقایسه فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Parsimony 72
3-7-3- بررسی رابطه خویشاوندی با استفاده از روش UPGMA 73
3-7-4- بررسی رابطه خویشاوندی (Neighbor-Joining) 75
3-7-5- مقایسه 3 روش فیلوژنی 76
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
4-1- بحث 80
4-2- استخراج DNA 82
4-3- انتخاب مارکر مناسب 82
4-3-1- انتخاب مارکر سیتوکروم b 84
4-3-2- انتخاب مارکر میکروستلایت 85
4-4- توالی یابی 87
4-5- آنالیز میکرو ستلایت 88
4-6- آنالیز سیتوکروم b 89

http://www.SmartPDFCreator.com

4-6- 1- اختلاف تکاملی 89
4-6-2- درجه خویشاوندي 90
4-6-3- مطالعات فیلوژني 90
4-7- جمع بندی نهایی 96
4-8- نتیجه گیری 97
پیشنهادات 99
منابع 100

http://www.SmartPDFCreator.com

فهرست جدولها

جدول 2-1- لوکوس، شماره دستیابی بانک ژن، موتیف تکراری توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه توالی 31
جدول 2-2- نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز 33
جدول2-3- برنامه های داده شده به دستگاه PCR 33
جدول2-4- توالی پرایمر ژن سیتوکروم b طراحی شده 34
جدول 3-1- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی 41
جدول 3-2- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی..... 43
جدول 3-3- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی..... 46
جدول 3-4- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی..... 49
جدول 3-5- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی..... 51
جدول 3-6- اندازه آللی (جفت باز) محصول PCR گونه های تاسماهی ایرانی و روسی 53
جدول 3-7- تعداد الل واقعی و موثر تاسماهی ایرانی و روسی در 27 جایگاه پلی مورفیک بررسی شده..... 54
جدول 3-8- فاصله ژنتیکی درون گونه ای و بین گونه ای با استفاده از مارکر میکروستلایت 55
جدول 3-9-تعداد و درصد فراوانی نوکلئوتید های ژن سیتوکروم b تاسماهی ایرانی..... 62
جدول 3-10-تعداد و درصد فراوانی نوکلئوتید های ژن سیتوکروم b تاسماهی ایرانی..... 66
جدول 3-11- تفاوت آرایش نوکلئوتیدی در جایگاه های مختلف ژن سیتوکروم b در تاسماهی ایرانی وروسی..... 69
جدول 3-12- نسبت جانشینی transition به transversion در توالی ژن تاسماهی ایرانی و روسی..... 70
جدول 3-13- اختلاف ژنتیکی درون و بین گونه ای تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی 71
جدول3-14 - درجه خویشاوندی بین تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی و فیل ماهی 72

http://www.SmartPDFCreator.com

جدول 4-1- روشهای مختلف استفاده شده در استخراج DNA 82
جدول 4-2- تعداد گونه های به کار گرفته شده در مطالعات فیلوژنی ماهیان 86
جدول 4-3- مقایسه اختلاف ژنتیکی بدست آمده در تاسماهی ایرانی و روسی 89
جدول 4-4- گونه های به کار گرفته شده در آنالیز فیلوژنی 91

فهرست شکل‌ها

تصویر 1-1 تاسماهي روسي 5
تصویر 1-2 تاسماهي ايراني 7
تصویر 1-3- نقشه ژنی mtDNA 13
تصویر 3-1- DNA استخراج شده از تاسماهي ايراني و تاسماهی روسی 37
تصویر 3-2-الگوی پرایمر AfuG **9** 38
تصویر 3-3- الگوی پرایمر AfuG 56 39
تصویر 3-4-الگوی پرایمر AfuG 63 39
تصویر 3-5-الگوی پرایمر AfuG 66 40
تصویر 3-6-الگوی پرایمر AfuG 67 40
تصویر 3-7-الگوی پرایمر AfuG 68 41
تصویر 3-8-الگوی پرایمر AfuG 74 42
تصویر 3-9-الگوی پرایمر AfuG 95 42
تصویر 3-10-الگوی پرایمر AfuG 112 43
تصویر 3-11-الگوی پرایمر AfuG 119 43
تصویر 3-12-الگوی پرایمر AfuG 122 44
تصویر 3-13-الگوی پرایمر AfuG 160 44
تصویر 3-14-الگوی پرایمر AfuG 195 45
تصویر 3-15-الگوی پرایمر AfuG 204 45
تصویر 3-16-الگوی پرایمر AfuG 229 46
تصویر 3-17-الگوی پرایمر AfuG 241 47
تصویر 3-18-الگوی پرایمر AoX 27 47
تصویر 3-19-الگوی پرایمر LS 62 48
تصویر 3-20-الگوی پرایمر LS 68 48
تصویر 3-21-الگوی پرایمر Spl 104 49

http://www.SmartPDFCreator.com

تصویر 3-22- الگوی پرایمر Spl 105 50
تصویر 3-23- الگوی پرایمر Spl 113 50
تصویر 3-24- الگوی باند پرایمر Spl 120 51
تصویر 3-25- الگوی پرایمر Spl 163 51
تصویر 3-26- الگوی پرایمرSpl 168 52
تصویر 3-27- الگوی پرایمر Spl 170 52
تصویر 3-28- الگوی پرایمر Spl 173 53
تصویر 3-29- محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز cyt b بر روی ژل آگارز... 58
تصویر 3-30- محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز cyt b بر روی ژل پلی اکریلامید 6% 58

http://www.SmartPDFCreator.com

فهرست نمودارها

نمودار3-1-دندروگرام UPGMA بین تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از مارکر میکروسیلایت..... 56
نمودار3-2-دندروگرام Maximmum Parsimony بین تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از ژن Cyt b 73
نمودار3-3- دندروگرام UPGMA با استفاده از ژن Cyt b بدون outgroup 74
نمودار3-4- دندروگرام UPGMA با استفاده از ژن Cyt b با outgroup.. 74
نمودار3-5-دندروگرام Neighbor-Joining با استفاده از ژن Cyt b بدون outgroup 75
نمودار3-6-دندروگرام Neighbor-Joining با استفاده از ژن Cyt b با outgroup 76
نمودار3-7- دندروگرام ستاره ای Neighbor-Joining با استفاده از ژن Cyt b 78
نمودار4-1- دندروگرام Maximmum Parsimony بین تاسماهی ایرانی و روسی و گروه های خارجی 93
نمودار4-2- دندروگرام Neighbor-Joining بین تاسماهی ایرانی و روسی و گروه های خارجی 94

http://www.SmartPDFCreator.com

چکیده :

کاربرد مارکرهای مولکولی (mtDNA و میکروستلایت) در تفکیک تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از تاسماهی روسی (*A gueldenstaedtii*)
کامبیز باقری

به‌منظور بررسی امکان تمایز ژنتیکی بین تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) با استفاده از روشهای تعیین توالی ژن سیتوکروم b و میکروستلایت (Microsatellite) تعداد 5 عدد تاسماهی ایرانی و 5 عدد تاسماهی روسی نمونه‌برداری گردید. DNA ژنومی نمونه ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج شد، کمیت و کیفیت آنها با استفاده از ژل آگارز 1 درصد و دستگاه نانودراپ (مدل ND1000) تعیین گردید. یک جفت پرایمر (Forward و Reverse) ژن سیتوکروم b میتوکندریایی تاسماهی روسی به شماره ثبتAJ563385 در بانک ژن ncbi با استفاده از نرم افزار GeneRuner طراحی و سنتز شد. چهار نمونه از DNA تاسماهی ایرانی و چهار نمونه از DNA تاسماهی روسی PCR شد و تعین توالی شدند. داده‌هاي حاصل از PCR تولید باندهایی در محدوده 1100 – 1000 جفت باز نمودند. توالی دو نمونه از تاسماهی ایرانی به شماره های EU910272 و EU910273 و دو نمونه از تاسماهی روسی به شماره های EU910274 وEU910934 در بانک ژن ncbi ثبت گردید. با مرتب کردن و مقایسه توالی های نمونه ها مشاهده شده که در یک ناحیه از ژن سیتوکروم b دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی با یکدیگر متفاوتند و در چند موقعیت دیگر تفاوتهای درون گونه‌ای مشاهده شد. آنالیزهای فیلوژنی از قبیل اختلاف تکاملی، درجه خویشاوندی و درخت فیلوژنی بر اساس روشهای Maximum parsimony، UPGMA و Neighbor-Joining با استفاده از نرم افزار MEGA4 ترسیم گردید. جهت بررسی تمایز بین تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از 30 جفت پرایمر مایکروستلایت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گردید. محصول تکثیر شده روي ژل پلی‌آکریل آمید 6% الکتروفورز و با محلول نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار GenAlex محاسبه شد.

نتایج حاصله از ژن Cyt b نشان داد که نمونه‌های تاسماهی ایرانی و روسی بین 0/1-0/5% با یکدیگر اختلاف تکاملی دارند. در استقرار گونه-ها در درخت های فیلوژنی رسم شده همخوانی مشاهده شد. موقعیت قرار گیری نمونه‌های تاسماهی ایرانی و روسی در درخت های فیلوژنی کلاسترهای جدا و بدون هیچ همپوشانی با یکدیگر با شاخص اطمینان (bootstrap> 98%) قرار می-گرفتند و بر اساس تست Tajima دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی در سطح اطمینان 0/05 مشاهده شد که نرخ مساوي بین تکامل شجره ها وجود دارد (P=0/65).

در تمام جایگاه‌های میکروستلایت پلی مورفیسم دیده شد و در 11 جایگاه باند دیسومیک مشاهده شد. بر اساس تست AMOVA میزان Fst با احتمال 95% بین تاسماهی ایرانی و روسی 0/045محاسبه گردید که نشان دهنده تمایز و رفکیك ژنتیکي متوسط بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی است. با استفاده از نرم افزارTFPGA دندروگرام UPGMA براساس فواصل ژنتیکی ترسیم شد و با استفاده از معیار فاصله ژنتیکي(Nei,1972) فاصله ژنتیکي بین دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی 0/322 و شباهت ژنتیکي 0/724 بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده از مارکر میکروستلایت، هیچ باند

اختصاصی جهت تمایز این دو گونه مشاهده نشد ولی این مارکر برای تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی کارایی پایینی داشت. ولی ژنCyt b نتایجی قابل اطمینان و دقیقتری ارائه داد. وجود اختلاف نوکلئوتیدی، میزان اختلاف ژنتیکی بدست آمده و قرار گرفتن تاسماهی ایرانی در شاخه‌ای جدا روی درختهای فیلوژنی ژن سیتوکروم b را به عنوان یک مارکرشاخص جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی معرفی می‌کند و مشخص شد که روش mtDNA قابلیت تمایز گونه‌ای بالاتری نسبت به روش مایکروستلایت دارد.

کلمات کلیدي: تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، سیتوکروم b، میکروستلایت

Abstract

Application of molecular markers (mt DNA and microsatellite) on differentiation of Persian sturgeon (Acipenser persicus) from Russian sturgeon (Acipenser gueldenstadtii)
Kambiz Bgaheri

For study of possibility on genetic differentiation between Persian sturgeon and Russian sturgeon using Cytb direct sequencing and microsatellite, 5 specimens from each species were collected. Genomic DNA was extracted using phenol-chloroform method. The quality and quantity of DNA was determined using (1%) agarose gel electrophoresis and Nanodrap spectroscopy. One pair mtDNA- Cytb gene primers from Russian sturgeon designed and synthesized using sequence GeneRuner. In this study 4 DNA samples from each species were amplified by PCR and sequenced. The PCR amplification produced a 1000-1100 bp bands. Phylogenetic analysis composed on base maximum Parsimony, UPGMA and Neighbor-Joining using MEGA 4, such as development different, sibling degree and phylogeny tree.

For differentiation between Persian and Russian sturgeon microsatellite analysis was conducted using 30 pairs of primers. PCR amplified fragments were runned on 6% PAGE-Electrophoresis followed by silver-nitrate staining. Data analysis was conducted using Gene Alex, program.

Sequencing of 2 samples from Persian sturgeon (EU 910272 & EU 910273) and 2 samples from Russian sturgeon (EU 910274 & EU910934) submitted in Gene Bank (NCBI). With sequence comparison some differences was observed in different Cytb gene of 2 species and in several other position showed intraspecific differences Results obtained from Cytb gene studies shown that Persian and Russian sturgeon samples had between 0.1- 0.5 % phylogenetic differences. The position of Persian and Russian sturgeon samples in phylogeny trees emphasized isolation clusters and no overlap together by confidence limit (98% < Bootstrap) and on based Tajima test it observed that Persian and Russian sturgeon lied in 0.05 confidence level that there are equal rate between pedigree development (p=0.65).

In all microsatellite loci, polymorphism were observed and 11 loci were represent a disomic banding pattern. On the bases AMOVA test, Fst value between Persian and Russian sturgeon was 0.045 (P=95%), which demonstrate a moderate genetic distance between 2 species. Using TFPGA software, a UPGMA dendrogram was drawn. On the bases of genetic distance index (Nei, 1972), it revealed a genetic distance of 0.322 and genetic similarity 0.724 between Persian and Russian sturgeon. Microsatellite studies detect no specific band for differentiation between 2 species and this marker had low performance on species specific marker in Persian and Russian

sturgeon, However, Cytb. gene revealed more reliable and confident results. Existence of nucleotide difference, genetic difference rate and located Persian sturgeon on other part on phylogeny trees, introduce Cytb as a important marker for distinction between Persian and Russian sturgeon. Therefore it can be concluded that mtDNA molecule has better ability for species diffrentiation than microsatellite markers.

Key words: Persian sturgeon, Russian sturgeon, Cytb, Microsatellite.

http://www.SmartPDFCreator.com

این تحقیق با مساعدت مالی
انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری
دکتر دادمان انجام شده است

http://www.SmartPDFCreator.com

فصل اول: مقدمه و کلیات

http://www.SmartPDFCreator.com

1-1-مقدمه

ماهيان با حدود 25 هزار گونه گروه بزرگي از مهره داران را تشكيل مي دهند (Nelson ,1994). براي چندين قرن سيستماتيك آنها با اندازه گيري خصوصيات مورفولوژيك و مريستيك انجام مي شد. توسعه روشهاي مولكولي به تقويت مطالعات سيستماتيك ماهيان كمك فراواني كرده است. روشهاي جديد براي سيستماتيك ماهيان صفات مناسب جديدي را براي آناليز روابط مابين گونه ها پيشنهاد كرد. روشهاي مولكولي بسياري از تقسيم بندي هاي مورفولوژيك را تاييد مي كند و در برخي موارد گروه بندي نادرست آن را نيز آشكار مي كند. در كل هماهنگي بين روشهاي مولكولي و مورفولوژيك بالا است. اگرچه روشهاي مورفولوژيك در شناسايي جنس (genera) عملكرد خوبي دارد ولي شناسايي در حد گونه و روابط مابين آنها با مشكل روبه رو است.

در گذشته تعين دقيق زمان گونه زايي به دليل نبود امكانات ژنتيكي فقط به صورت مستقرا انجام مي شد و فقط فنوتيپ ها را مطالعه ميكردند. از اين رو مشخص نبود كه تا چه حد اختلافات مورفولوژيك مي تواند مكانيسم جدايي ژنتيكي را نشان دهد. نمي توان تنوع ژنتيكي يك گونه را بطور مستقيم از داده هاي فنوتيپي بدست آورد زيرا تأثير عوامل محيطي مانع تفسير صحيح و دقيق آنها مي شود. بنابراين به روشهاي علمي كه بر پايه طرحهاي آزمايشگاهي باشند نياز است.

بيشترين كاربرد ماركرهاي مولكولي، آناليز فيلوژني سطوح پاين گونه ها است كه در گذشته ميسر نبود، خصوصا آناليز تمايز جغرافيايي مابين جمعيت ها و درون گونه ها بود. براى مديريت اصولي ذخاير ابتدا بايد از تنوع ژنتيكى بين و درون جمعيتها آگاهى داشته باشيم. از اين رو حفظ تنوع زيستى يكى از مؤلفه هاى ضرورى در برنامه هاى مديريتى است.

1-1-1-اهميت و ضرورت تحقيق:

تاسماهيان Acipenseridae يكي از قديميترين و ابتدائي ترين ماهيان غضروفي - استخواني مي باشد، كه حدود 250 ميليون سال پيش تكوين يافته اند (Ludwig et al. 2001). از بين 27 گونه تاسماهيان و پاروپوزه ماهيان 6 گونه دردرياي خزر و رودخانه هاي منتهي به آن زندگي مي كنند، شامل گونه استرلياد (*Acipenser ruthenus*)، اوزون برون (*Acipenser stellatus*) تاسماهي

ايراني (*Acipenser persicus*)، تاسماهي روسي (*Acipenser gueldenstaedti*)، فيلماهي (*Huso huso*) ، شيپ (*Acipenser nudiventris*) كه حدود90% خاويارجهان را توليد مي‌كردند گوشت و خاويار اين ماهيان از گذشته به عنوان منابع باارزش غذايي به شمار مي آيد. ذخاير ماهيان خاوياري درياي خزر به علت فشار صيد بي رويه، صيد غير قانوني، آلودگي و تخريب زيستگاه‌ها شديدا كاهش يافته و به اين دليل در ليست ماهيان درمعرض خطر اتحاديه بين المللي حفاظت از طبيعت IUCN (IUCN,1996) قرار گرفته و از سال 1997 به بعد تمام اين ماهيان درفهرست كنوانسيون نظارت برتجارت گونه هاي درخطرانقراض(CITES)[1] قرار گرفته اند(Pourkazemi et al., 2000) .

حدود 80% صادرات خاويار ايران به گونه تاس ماهي ايراني (*Acipenser persicus*) تعلق دارد، و فقط كشور جمهوري اسلامي ايران سهميه صيد تجاري و صادرات اين نوع خاويار را در بين 5 كشور ساحلي دارد. از آنجا كه از لحاظ سيستماتيك و فيلوژنی اين گونه بيشترين شباهت را با گونه تاسماهی روسی(*Acipenser guldenstaedti*) دارد، و تاكنون از لحاظ مولكولی كسی موفق به يافتن ماركر مولكولی جهت تمايز اين دو گونه نشده است. بعضی از محققين روسی اين ادعا را دارند كه گونه تاسماهي ايراني كه بيشترين فراواني را در آبهاي سواحل جنوبي خزر را دارد، همانند گذشته يكي از زير گونه هاي تاسماهي روسي است (*Acipenser gueldenstaedtii persicus*)؛ به بيان ديگر از لحاظ سيستماتيك تاسماهي ايراني را گونه اي مستقل تلقي نمي كند(Birstein at al., 1998).

از طرفي تجارت خاويار در بازارهای جهانی توسط كنوانسيون cites كنترل می‌گردد. و تاكنون ماركر مولكولی مبتنی بر DNA برای تمايز اين دو گونه معرفی نشده است. و در صورت عدم تفاوت بين اين دو گونه امكان دارد كه مجامع بين المللي سهميه صادرات خاويار تاسماهي ايراني را نپذيرند و تجارت جهانی خاويار تاسماهی ايرانی با محدوديت جدی مواجه شود. با توجه به نقش گونه تاسماهي ايراني در تجارت بين المللي، شناسايي و تفكيك ژنتيكي و معرفي ماركر DNA در جهت اثبات گونه تاسماهي ايراني به عنوان گونه‌اي مستقل و بومي ايران بسيار مهم مي باشد، چرا كه تجارت

[1] . Convention On International Trade In Endangered Species,Founa and Flora

http://www.SmartPDFCreator.com

خاویار تاسماهی ایرانی سالانه حدود 25 میلیون دلار برای کشور درآمدزایی دارد.

مطالعات زیادی توسط محققین به روش مورفولوژیک(Vasil'eva, 2009)، بیو شیمیایی (Keyvanfar et al., 1988) و روش مولکولی (Ruban et al., 2008) برای تمایز گونه‌های تاسماهیان و معرفی مارکر مولکولی خاویار در دنیا انجام شده است. ولی تاکنون موفق به معرفی مارکر مولکولی جهت تمایز دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی نشدند.

اهداف و فرضیه های تحقیق:

اهداف:

1_تفکیک وتمایز مولکولی دو گونه تاسماهی ایرانی از روسی

2_ امکان معرفی مارکر مولکولی جهت تمایز دو گونه

فرضیات :

1 _ روش مایکروستلایت قادر است دوگونه تاسماهی ایرانی و روسی را از یکدیگر تفکیک نماید.

2 _ روش mtDNA قابلیت تمایز گونه ای بالاتری نسبت به روش مایکروستلایت دارد.

3 _ شباهت ژنتیکی بسیار بالایی بین دو گونه مزبور وجود دارد.

http://www.SmartPDFCreator.com