

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان:

بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) و  
کفال طلایی (*Chelon aurata*) در حوضه جنوبی  
دریای خزر (استان گیلان) با استفاده  
از توالی یابی DNA میتوکندریایی

مجری:

محمد حسن زاده صابر

شماره ثبت

۶۵۸۳۹

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان طرح/پروژه: بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) و کفال طلایی (*Chelon aurata*) در حوضه جنوبی دریای خزر (استان گیلان) با استفاده از توالی یابی DNA میتوکندریایی  
کد مصوب: ۹۹۰۹۷۷-۹۹۰۴۴-۰۳۵-۱۲-۳۲-۱۲۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: محمد حسن زاده صابر

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: محمد حسن زاده صابر

نام و نام خانوادگی همکار(ان): امید جعفری، اسماعیل عبدالله زاده، شیرین جمشیدی، مهتاب یارمحمدی، محمود محسنی، علیرضا شناورماسوله، محمد صیاد بورانی، سیامک باقری جونقانی، کیوان عباسی رنجبر، مریم فرزد، مرتضی نیک پورمحمودآباد، یعقوب علی زحمت کش میاندهی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سعید کیوان شکوه، حامد پاک نژاد

محل اجرا: استان گیلان

تاریخ شروع: ۱۳۹۹/۴/۱

مدت اجرا: ۱ سال و ۱۰ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۳

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

## «سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر ماهی سفید ( *Rutilus kutum* ) و کفال طلایی ( *Chelon aurata* ) در حوضه جنوبی دریای خزر (استان گیلان) با استفاده از توالی یابی DNA میتوکندریایی  
کد مصوب: ۹۹۰۹۷۷-۹۹۰۴۴-۰۳۵-۱۲-۳۲-۱۲۴

شماره ثبت (فروست): ۶۵۸۳۹ تاریخ: ۱۴۰۳/۵/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد حسن زاده صابر دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته زیست‌شناسی دریا می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فراوری آبزیان در

تاریخ ۱۴۰۳/۴/۲۴ مورد ارزیابی و با رتبه متوسط تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان

خاویاری مشغول بوده است.

صفحه	«فهرست مندرجات»	عنوان
۱	.....	چکیده
۲	.....	۱- مقدمه
۳	.....	۱-۱- اهداف پروژه
۳	.....	۱-۲- ماهی سفید دریای خزر ( <i>Rutilus kutum, kamenski</i> , 1901)
۴	.....	۱-۲-۱- بیولوژی
۴	.....	۱-۲-۱-۲- رده بندی و مشخصات ظاهری
۵	.....	۱-۲-۱-۳- پراکنش
۶	.....	۱-۲-۱-۴- تغذیه
۶	.....	۱-۲-۱-۵- رفتار
۶	.....	۱-۲-۱-۶- مهاجرت
۷	.....	۱-۲-۱-۷- جمعیت ها
۷	.....	۱-۲-۱-۸- میزان صید و بهره برداری
۸	.....	۱-۲-۱-۹- بازسازی ذخایر
۹	.....	۱-۲-۱-۱۰- رودخانه های مهم تکثیر
۹	.....	۱-۳- کفال طلائی ( <i>Mugil auratus</i> (Risso, 1810)
۹	.....	۱-۳-۱- رده بندی و مشخصات ظاهری
۱۱	.....	۱-۴- نشانگرهای ژنتیکی (Genetic Markers)
۱۲	.....	۱-۵- تخمین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرها
۱۲	.....	۱-۶- انواع نشانگرها
۱۲	.....	۱-۶-۱- نشانگرهای مورفولوژیک
۱۳	.....	۱-۶-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی
۱۳	.....	۱-۶-۳- نشانگرهای سیتوژنتیک
۱۴	.....	۱-۶-۴- نشانگرهای مولکولی
۱۴	.....	۱-۶-۴-۱- نشانگر DNA ژنومی
۱۶	.....	۱-۶-۴-۲- نشانگرهای DNA میتوکندریایی (mtDNA)
۱۸	.....	۱-۷- مطالعات ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از تعیین توالی DNA (DNA sequencing)
۲۲	.....	۱-۸- مطالعات ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از روش میکروساتلایت (Microsatellite):

۹-۱	مطالعات انجام شده در خصوص ماهی سفید و کفال طلایی دریای خزر	۲۶
۲-۲	مواد و روش کار	۲۸
۲-۲-۱	نمونه برداری	۲۸
۲-۲-۲	استخراج DNA	۲۸
۲-۲-۲-۱	مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA ، نحوه تهیه بافرها	۲۸
۲-۲-۲-۲	ارزیابی کمی و کیفی DNA های استخراجی	۲۹
۲-۲-۲-۲-۱	ارزیابی کمی	۲۹
۲-۲-۲-۲-۲	ارزیابی کیفی	۳۰
۲-۳	آغازگرها (Primers)	۳۱
۲-۳-۱	آغازگر (Primer) ژن 16SrRNA میتوکندری	۳۲
۲-۳-۴	واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR)	۳۲
۲-۳-۵	مواد چرخه های حرارتی PCR	۳۲
۲-۳-۶	الکتروفورز ژل آگارز	۳۳
۲-۳-۷	تجزیه و تحلیل آماری داده ها	۳۴
۳-۳	نتایج	۳۵
۳-۳-۱	نتایج حاصل از استخراج DNA	۳۵
۳-۳-۱-۱	روش کیفی	۳۵
۳-۳-۱-۲	روش کمی	۳۵
۳-۳-۲	نتایج حاصل از PCR ژن 16SrRNA	۳۶
۳-۳-۲-۱	بررسی ساختار ژنتیکی ماهی سفید در سواحل سه گانه استان گیلان	۳۷
۳-۳-۲-۱-۱	ردیف کردن (Align) توالی ها	۳۷
۳-۳-۲-۱-۲	محاسبه اختلاف تکاملی	۳۷
۳-۳-۲-۱-۳	محاسبه درجه خویشاوندی	۳۸
۳-۳-۲-۱-۴	نرخ حداکثر درست نمایی سوگیری به جایگاههای انتقالی / متقاطع	۳۹
۳-۳-۲-۱-۵	شاخص توزیع شکل گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان های مورد بررسی	۳۹
۳-۳-۲-۱-۶	فاصله ژنتیکی (Pairwise distance) بین توالی ها در ماهی سفید:	۳۹
۳-۳-۲-۱-۷	روابط فیلوژنی	۴۰

۴۳.....	۳-۲-۱-۸- تنوع هاپلوتیپی ژن 16SrRNA در نمونه های ماهی سفید مناطق ساحلی استان گیلان .....
۴۵.....	۳-۲-۲- بررسی ساختار ژنتیکی ماهی کفال طلایی در سواحل سه گانه استان گیلان .....
۴۵.....	۳-۲-۱- ردیف کردن (Align) توالی ها .....
۴۵.....	۳-۲-۲- محاسبه اختلاف تکاملی .....
۴۶.....	۳-۲-۳- محاسبه درجه خویشاوندی .....
۴۶.....	۳-۲-۴- نرخ حداکثر درست نمایی سوگیری به جایگاههای انتقالی /مقاطع .....
۴۷.....	۳-۲-۵- شاخص توزیع شکل گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان های مورد بررسی .....
۴۸.....	۳-۲-۶- فاصله ژنتیکی (Pairwise distance) بین توالی ها در ماهی کفال طلایی .....
۴۹.....	۳-۲-۷- روابط فیلوژنی .....
۵۱.....	۳-۲-۸-تنوع هاپلوتیپی ژن 16SrRNA در نمونه های ماهی کفال طلایی مناطق ساحلی استان گیلان ..
۵۴.....	۴-بحث .....
۵۴.....	۴-۱- استخراج DNA .....
۵۵.....	۴-۲- ردیف کردن (Align) توالی های نوکلئوتیدی .....
۵۶.....	۴-۳- اختلاف تکاملی .....
۵۷.....	۴-۴- درجه خویشاوندی .....
۵۸.....	۴-۵- روابط فیلوژنی .....
۶۰.....	۴-۶- تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی .....
۶۱.....	۴-۷- تمایز ژنتیکی (Fst) و جریان ژنی .....
۶۴.....	۵- نتیجه گیری .....
۶۵.....	پیشنهادها .....
۶۶.....	منابع .....
۷۳.....	چکیده انگلیسی .....

## چکیده

بمنظور بررسی امکان تمایز ژنتیکی و مقایسه ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید و کفال طلایی با استفاده از روشهای تعیین توالی DNA (DNA sequencing)، تعداد ۳۰ عدد ماهی سفید از مناطق شرقی، مرکزی و غربی دریای خزر (سواحل استان گیلان) و ۲۴ عدد ماهی کفال طلایی از مناطق مذکور صید گردید. DNA سه نمونه از هر منطقه و هر گونه با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج شد و کمیت و کیفیت آنها با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ (مدل ND1000) تعیین گردید. دو جفت پرایمر (Forward و Reverse) ژن 16SrRNA با استفاده از نرم افزار GeneRuner طراحی و سنتز شد. جهت تعیین توالی ژن 16SrRNA، پس از استخراج DNA و PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد ران گردید و باندهایی در محدوده ۵۰۰ - ۶۰۰ جفت باز برای ژن 16SrRNA تولید نمود. اختلاف تکاملی، درجه خویشاوندی و روابط فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA11 بدست آمد. نتایج حاصله نشان می دهد که نمونه های ماهی سفید در سه منطقه صید شده دارای ۹۵-۹۷ درصد شباهت بوده و ۵-۳ درصد با یکدیگر اختلاف تکاملی دارند. همچنین نمونه های کفال طلایی در مناطق صید شده دارای ۹۶ درصد شباهت بوده و ۴ درصد با یکدیگر اختلاف تکاملی دارند. درخت فیلوژنی نمونه های ماهی سفید و کفال با استفاده از روشهای Maximum parsimony، Maximum Likelihood و Neighbor-Joining ترسیم گردید. در مقایسه بین سه روش بررسی روابط فیلوژنی ماهی سفید از سه منطقه نمونه برداری شده در هر سه حالت (Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbor-Joining)، نمونه های مناطق غربی و شرقی هر کدام بر روی یک کلاستر مجزا قرار دارند ولی نمونه های منطقه مرکزی بر روی کلاسترهای مجزا و شاخه های متفاوت می باشند که این می تواند نشانه تمایز جمعیتها بر اساس ژن 16SrRNA باشد. در مقایسه بین سه روش بررسی روابط فیلوژنی ماهی کفال طلایی از سه منطقه نمونه برداری شده، در هر سه حالت (Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbor-Joining)، نمونه های مناطق غربی و مرکزی بصورت مشترک در یک کلاستر و روی یک شاخه قرار دارند که نشان دهنده تمایز اندک این دو جمعیت بر اساس ژن 16SrRNA می باشد.

**کلمات کلیدی:** ساختار ژنتیکی، ماهی سفید، ماهی کفال طلایی، دریای خزر، DNA میتوکندری