Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٠
صفحه ٦٠-٥٥

بررسی صحت آمیخته‌گری بین قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* با استفاده از روش مولکولی PCR-RAPD

سالار درافشان[1]، محمدرضا کلباسی*[2]، محمد پورکاظمی[3]، باقر مجازی امیری[4]

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران

۳- دانشیار انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، گیلان

٤- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Kalbassi_m@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

آمیخته‌گری یکی از روش‌های سنتی اصلاح نژاد در فعالیت‌های مرتبط با بخش کشاورزی خصوصاً آبزی‌پروری است. نکته کلیدی در این روش اصلاح نژادی، اثبات ماهیت آمیخته نتاج است. در شناسایی افراد آمیخته می‌توان از روش‌های مختلفی بهره جست که یکی از معتبرترین و پیشرفته-ترین این روش‌ها، روش مولکولی است. در این تحقیق امکان استفاده از آغازگرهای RAPD برای بررسی صحت آمیخته‌گری در نتاج حاصل از تلاقی مصنوعی جنس ماده قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و جنس‌نر ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* مورد ارزیابی قرار گرفت. به این‌منظور ۳۰ رشته آغازگر RAPD به‌طور تصادفی انتخاب شده و الگوی ژنوتیپی والدین در آمیزش‌های تک والدی (Single Pair Mating) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR بررسی گردید. از ۳۰ آغازگر تنها دو آغازگر H-09 و P-12 به‌ترتیب با توالی های TGT 5′AGC TGG G 3′ و5′AAG GGC GAG T 3′ پلی مورفیسم مناسب همراه با تکرارپذیری بالا را حداقل بین یک جفت از مولدین نشان دادند. نحوه توارث باندهای اختصاصی والدین در فرزندان حاصل از آمیخته‌گری مصنوعی نشان داد که آمیخته‌های مذکور (به‌جز یک مورد) توارث کاملی از باندهای اختصاصی والدین را دارا بودند. لذا ماهیت آمیخته بچه ماهیان تایید گردید. این تحقیق کارایی روش RAPD را برای سنجش صحت آمیخته‌گری در دو گونه مهم از آزاد ماهیان تجاری ایران به اثبات رساند.

واژه‌های کلیدی

آمیخته‌گری، قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*، RAPD.

مقدمه

آمیخته‌گری یکی از روش‌های مرسوم اصلاح نژاد در فعالیت‌های مرتبط با بخش کشاورزی از جمله شیلات و آبزی‌پروری است. این روش اصلاح‌نژادی را می‌توان به تلاقی افراد متفاوت از لحاظ ژنتیکی اطلاق کرد که معمولاً به‌صورت آمیزش درون گونه‌ای و یا بین گونه‌ای اجرا می-گردد (٤). تاکنون آمیخته‌های متعددی از آبزیان خصوصاً ماهیان تولید شده‌اند (۸ و ۹). به‌طور کلی هدف از آمیخته‌گری در صنعت آبزی‌پروری و شیلات بهبود عمکرد آبزیان آمیخته در مقایسه با والدین تحت شرایط خاص محیطی است. بهبود عملکرد تولید در صفات مختلف، حالتی کاملاً تصادفی است که به دلیل بروز همکاری آللی در آمیخته‌ها ممکن است به‌صورت برتری آمیخته یا (هتروزیس) بروز نماید (۸ و ۱۰).

Archive of SID

آمیخته‌گری در آزاد ماهیان از سابقه بسیار طولانی برخوردار است، اگرچه آمیخته‌های بین گونه‌ای در آزاد ماهیان معمولاً برتری خاصی را در صفات مرتبط با رشد و بازماندگی در مقایسه با والدین نشان نمی‌دهند، اما قابلیت بهره‌برداری از توان آمیخته در خصوص برخی دیگر از صفات مهم تولیدی نظیر مقاومت به بیماری‌های ویروسی، پ-هاش اسیدی، تطابق زود هنگام با شوری آب‌دریا و حتی عقیمی در برخی از انواع آمیخته‌های بین گونه‌ای آزاد ماهیان به اثبات رسیده است (۵، ۸ و ۹) و لذا تولید آمیخته‌های جدید بین گونه‌ها یا زیرگونه‌های مختلف همچنان یکی از فعالیت‌های تحقیقاتی مهم در زمینه آبزی‌پروری است (۹). در این‌بین، بررسی صحت آمیخته‌گری از اهمیت بسیار برخوردار است. این مهم در ماهیان به‌دلیل احتمال بروز فرایندهایی نظیر ماده زایی[1] و یا حتی نرزایی[2] که در اثر اختلاط مصنوعی گامت-های نر و ماده خصوصاً در دو گونه متفاوت ممکن است پدید آید، اهمیتی دوچندان دارد (۲۱)، خصوصاً زمانی که تعداد بچه ماهیان بازمانده حاصل از آمیزش مصنوعی اندک باشد، صحت آمیخته‌گری باید با دقت و حساسیت بیشتری مورد بررسی قرار گیرد (۱۰). به‌منظور بررسی ماهیت واقعی نتاج حاصل از آمیخته-گری می‌توان از روش‌ها یا ویژگی‌های متعددی نظیر ویژگی‌های مورفومتریک و مریستیک، فیزیولوژیک، کاریولوژیک و مولکولی استفاده نمود (۲، ۵ و ۷)، اما امروزه روش‌های مولکولی مبتنی بر دی.ان.ا DNA به دلایلی نظیر امکان بررسی صحت آمیخته‌گری در مراحل آغازین لاروی و یا حتی پیش از خروج لارو از تخم، دقت و صحت بسیار بالا و سرعت نسبتاً مناسب به یکی از ابزارهای بسیار کارآمد در این زمینه بدل شده است (۳ و ۱۶). تاکنون نشانگرهای مولکولی مختلفی برای شناسایی انواع آمیخته‌ها در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن جمله می توان به نشانگر RFLP[3] برای شناسایی انواع آمیخته‌های بین گونه-ای کپورماهیان هندی (۱۸)، نشانگر AFLP[4] برای شناسایی آمیخته‌های بین گونه‌ای تاس ماهی ایتالیایی *Acipenser naccari* و تاس ماهی‌سفید *A.transmontanus* (۱۲)، نشانگر ریزماهواره[5] جهت شناسایی ماهیان آمیخته در انواع مختلف آزادماهیان (۲ و ۶) و نشانگر RAPD[6] برای شناسایی آمیخته آزادماهی اطلس *Salmo salar* و قزل آلای قهوه‌ای *Salmo trutta* (۱۳)، آمیخته کپور علف‌خوار *Ctenopharyngodon idella* و کپور سرگنده *Hyphophtalmichthys nobilis* (۱) اشاره نمود. در این بین نشانگر RAPD به دلایلی نظیر عدم نیاز به شناخت ماهیت ژنوتیپی نمونه‌ها، بررسی چندین جایگاه ژنی به‌صورت همزمان و سهولت و ارزانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۳، ۱۶). ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* دو گونه مهم از آزاد ماهیان تجاری ایران هستند. ماهی آزاد دریای خزر از جمله ماهیان بسیار با ارزش شیلاتی در دریای خزر است که بیشترین پراکنش را در آب‌های ساحلی ایران دارد (۱۵). این گونه اگرچه از پتانسیل رشد بسیار بالایی در محیط‌های دریایی برخوردار است اما به سبب رشد کند و بعضاً بلوغ جنسی زود هنگام در شرایط پرورشی، پرورش آن در سامانه‌های آبزی پروری چندان موفقیت آمیز نیست (۲). از دگرسو ماهی قزل آلای رنگین کمان از جمله گونه‌های اهلی شده آزادماهیان بوده که اگرچه در ایران گونه‌ای غیر بومی محسوب می‌شود، اما به سبب مزایای بیشماری که از خود در سامانه های پرورشی نشان داده است، امروزه مهم‌ترین گونه ماهی سردآبی در کشور است. آمیخته‌گری بین دو گونه مذکور به صورت مستقیم و معکوس، به‌منظور دستیابی به نوع جدیدی از ماهیان سردآبی جهت تنوع بخشی در سامانه‌های پرورش ماهی در کشور اجرا گردید (۲). نتایج حاصل نشان داد که در آمیزش مستقیم (ماهی آزاد دریای خزر ماده و ماهی قزل آلای رنگین‌کمان نر) نتاجی حاصل نمی‌گردد و تمامی جنین‌ها در طی مرحله انکوباسیون از بین می‌روند، در مقابل آمیزش معکوس بین دو گونه مذکور (قزل آلای رنگین کمان ماده و ماهی آزاد دریای خزر نر) بازماندگی اندکی (کمتر از ۱۰ درصد تا آغاز تغذیه خارجی) را نشان داد. محدودیت بازماندگی نتاج این گمان را تقویت نمود که ماهیان حاصل از آمیزش مصنوعی ماهیت آمیخته نداشته و در

[1] Gynogenesis
[2] Androgenesis
[3] Restriction Fragment Length Polymorphism
[4] Amplified Fragment Length Polymorphism
[5] Microsatellite
[6] Random Amplified Polymorphic DNA

www.SID.ir

Archive of SID

حقیقت ماهیان ماده زاد یا نرزادی هستند که از آمیزش مصنوعی بین دو گونه حاصل شده‌اند (۲ و ۲۱). در این تحقیق سعی بر آن بود که با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA (نشانگر RAPD) صحت آمیخته‌گری بین قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر در مراحل اولیه لاروی مورد ارزیابی قرار گیرد، تا به این طریق ضمن افزایش دقت، امکان بررسی ماهیت نتاج حاصل از آمیخته‌گری در فاصله زمانی کوتاه پس تفریخ فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی صحت آمیخته‌گری، تلاقی‌ها به‌صورت تک والدی[1] اجرا شد (۲۲)، به این‌منظور سه قطعه مولد نر ماهی آزاد دریای خزر (۵۸/۶±۶/۸cm و ۲۰۲۵±۶۴۴g) و سه قطعه مولد ماده قزل آلای رنگین‌کمان (۴۶/۵۷±۴/۲۷cm و ۱۵۳۵±۵۳۱g)، از بین مولدین موجود در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان دکتر باهنر کلاردشت انتخاب شدند. استحصال مواد تناسلی از مولدین، پس از بیهوشی آن‌ها در محلول گل میخک به روش مرسوم در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی اجرا شد و از اسپرم هر مولد نر پس از بررسی کیفیت بارورکنندگی آن به منظور تلقیح تخمک‌های یک والد ماده استفاده شد (۲۰). به‌منظور اجرای مطالعات مولکولی بررسی صحت آمیخته‌گری، نمونه‌گیری از بافت باله دمی مولدین و از لاروهای تازه تفریخ شده (حداقل ۱۰ قطعه برای هر آمیزش به همراه کیسه زرده) برای هر سه جفت مولد استفاده شده در فرایند آمیخته‌گری صورت گرفت و بلافاصله پس از نمونه-گیری در الکل اتانول ۹۶ درجه تثبیت و به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. این نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای ۴°C نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی به روش فنل- کلروفورم اجرا شد (۱۴). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش‌های الکتروفورز آگارز و اسپکتروفتومتری مطابق روش‌های استاندارد اجرا گردید (۱۹). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[2] PCR با استفاده از ۳۰ رشته آغازگر RAPD (جدول۱) در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler EP Gradiant, Eppendorf, Germany) اجرا و آشکارسازی محصول با استفاده از الکتروفورز عمودی ژل اکریلامید ۶ درصد مطابق روش‌های استاندارد در بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در شهرستان رشت انجام شد (۱۹). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در سه مرحله واسرشته‌سازی اولیه (یک سیکل) در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، الحاق (۳۰ تا ۳۵ چرخه) شامل واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، الحاق در ۳۶°C-۳۴ به مدت یک دقیقه و بسط در ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه بهینه سازی و اجرا شد. بسط نهایی (یک سیکل) در ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه اجرا گردید. هر واکنش PCR در حجم کل ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از DNA (۱۵ ng/µl)، آنزیم تک پلی مراز ۰/۲ µl (۵ U/µl)، ۰/۵ µl dNTPs (۱۰mM)، ۱-۲ µl از $MgCl_2$ ۵۰mM، بافر X۱۰ PCR به میزان ۲/۵ µl و آغازگر ۲۰pM به میزان یک میکرولیتر و آب‌مقطر تا رسیدن به حجم کل بهینه گردید. تمامی مواد واکنش از شرکت سیناژن-ایران تهیه شد. به‌منظور تعیین آغازگرهایی که توانایی ایجاد باندهای چند شکل را در بین مولدین داشته باشند، واکنش PCR برای تمامی آغازگرها با استفاده از یک جفت مولد اجرا و آغازگرهای نهایی به منظور بررسی صحت آمیخته گری انتخاب شدند.

نتایج و بحث

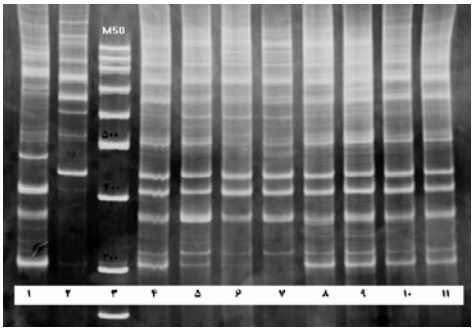
به‌منظور شناسایی آغازگرهایی که قادر به تفکیک مناسب دو گونه باشند، یک جفت از مولدین دخیل در فرآیند آمیخته‌گری از بین جفت‌های مختلف به‌طور تصادفی انتخاب شده و PCR با تمامی آغازگرها بر روی آن اجرا شد. به دلیل تولید باندهای کاملاً واضح با قابلیت تکرار و پلی‌مورف مناسب بین دو گونه، آغازگرهای H-09 و P-12 انتخاب گردیدند (جدول ۱)، آغازگرهای P-12 و H-09 به‌ترتیب ۵ و ۷ باند در قزل‌آلای رنگین‌کمان و ۶ و ۶ باند در ماهی آزاد دریای خزر تولید نمودند که در محدوده ۷۰۰bp-۲۰۰ قرار داشتند. الگوی باندی ایجاد شده توسط هر یک از آغازگرهای P-12 و H-09، در جفت مولدین مورد استفاده در آمیخته‌گری تا حد زیادی یکسان بود لذا، در بررسی صحت آمیخته‌گری تنها یک جفت از مولدین ($R_2 \times S_5$) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که آغازگر P-12 توانایی تکثیر یک قطعه کاملاً اختصاصی (۴۴۰ bp) در والد نر و سه قطعه اختصاصی کاملاً واضح (۳۱۰ bp، ۳۸۰، ۴۱۰) در والد ماده را از

[1] Single pair mating
[2] Polymerase chain reaction

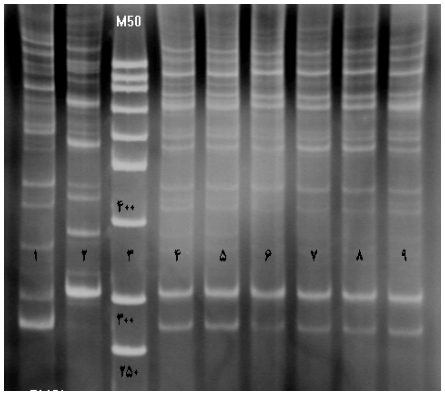
www.SID.ir

Archive of SID

خود نشان داد (شکل۱)، لاروهای حاصل از آمیزش مصنوعی دو والد مذکور (۱۰/۱۰) توارث کاملی از قطعات (bp ۳۸۰، ٤۱۰ و ٤٤۰) را نشان دادند به طوری‌که تماماً واجد قطعه خاص والد پدری (٤٤۰bp) به همراه قطعات خاص والد مادری (bp ۳۸۰ و ٤۱۰) بودند؛ در برخی موارد (۱/۱۰) آمیخته‌ها فاقد قطعه خاص (۳۱۰bp) والدی مادری بودند درحالی که دو قطعه دیگر را به‌طور کامل به ارث برده بودند (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی ژنوتیپی ایجاد شده توسط آغازگر P-12 در والد ماده (ستون ۱) و والد نر (ستون ۲) و آمیخته‌ها (ستون‌های ۱۱-٤) بر روی ژل اکریلامید ٦ درصد. ستون ۳ مارکر ۵۰bp. به توارث کامل قطعات خاص والد مادری و پدری در فرزندان توجه شود با این وجود برخی لاروها (ستون ۷) فاقد یکی از قطعات خاص والد مادری (۳۱۰bp) بودند.



شکل ۲- الگوی ژنوتیپی آمیخته‌ها در مقایسه با مولدین توسط آغازگر H-09 بر ژل اکریلامید ٦ درصد. ستون ۱ مولد ماده، ستون ۲ مولد نر، ستون ۳ مارکر 50bp، ستون‌های ۹-٤، نتاج حاصل از آمیخته‌گری. به توارث کامل قطعات خاص والد پدری و مادری در فرزندان توجه شود.

آغازگر H-09 نیز توانایی تکثیر یک قطعه اختصاصی ۲۷۵ bp در والد ماده (R_2) و ۳۱۰ bp را در والد نر (S_5) نشان داد، DNA استخراجی از تمامی بچه ماهیان آمیخته (۱۰/۱۰)، پس از اجرای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر H_9 و انجام الکتروفورز دارای هر دو قطعه اختصاصی ۲۷۵/۳۱۰bp بود که نشان دهنده ماهیت آمیخته لاروهای تولیدی بود (شکل۲)، نتایج حاصل از PCR ایجاد هیچ قطعه جدیدی را در فرزندان نشان نداد (شکل ۱ و ۲). از بین ۳۰ رشته آغازگر RAPD مورد استفاده جهت بررسی صحت آمیخته‌گری تنها دو آغازگر P-12 و H-09 قادر به ایجاد الگوی پلی‌مورف بین جفت مولدین مورد استفاده در برنامه آمیخته‌گری بودند و سایر آغازگرها یا به طورکلی ناتوان از ایجاد الگوی باندی و یا تنها قادر به ایجاد الگوی باندی مشابه بین جفت مولد مورد نظر بودند و لذا امکان استفاده از آن‌ها در بررسی صحت آمیخته‌گری وجود نداشت. ناتوانی آغازگرهای RAPD در ایجاد الگوی باندی می‌تواند متاثر از نبود جایگاه‌های اتصال آغازگر بر روی دی.ان.ا و یا فاصله نامناسب جایگاه‌های اتصال باشد. به نظر می‌رسد که دو گونه قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر از نظر ژنتیکی با یکدیگر کاملا متفاوت هستند. این امر با توجه به موقعیت فیلوژنتیکی آنها در رده بندی، تفاوت آشکار در عدد و فرمول کروموزومی و نیز بازماندگی اندک نتاج آمیخته بین آن‌ها قابل درک است. با این وجود اغلب آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از ایجاد الگوی باندی پلی مورف بین جفت مولدین مورد استفاده در آزمایش ناتوان بودند. شاید تعداد نسبتا اندک آغازگرها و نیز تعداد محدود جفت مولد (تنها ۳ جفت) منجر به افزایش احتمال مشابهت الگوی باندی شده است. از این رو پیشنهاد می‌شود که پیش از آغاز برنامه‌های آمیخته‌گری، ابتدا الگوی ژنوتیپی والدین مورد بررسی قرار گرفته و تنها از جفت مولدینی که دارای الگوی ژنوتیپی متفاوت هستند، جهت اجرای آزمایش استفاده شود تا کارایی نشانگر برای بررسی صحت آمیخته‌گری به نحو موثری افزایش یابد. در این مطالعه اگرچه اکثر باندهای خاص والدین در فرزندان به‌طور کامل بیان شده بودند، اما حداقل در یک مورد یکی از باندهای اختصاصی والد مادری (bp ۳۱۰) حاصل از آغازگر P-12 در یکی از فرزندان مشاهده نشد (شکل۱). این حالت می تواند بیانگر ماهیت هتروزایگوتی قطعه مذکور در والد ماده ویا بروز جهش در قطعه مورد نظر در نتاج حاصل از آمیخته‌گری باشد که امکان تکثیر آن قطعه خاص را در طی PCR محدود می سازد (۲۳). همان‌گونه که بیان شد، در هیچ‌کدام از نمونه‌های مربوط به فرزندان، نشانی از باندهایی با منشاء غیروالدی مشاهده نشد. با این وجود همواره احتمال ظهور باندهای غیروالدینی در فرزندان وجود دارد، در این خصوص Elo

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که اگرچه احتمال تشکیل باندهای غیروالدی حاصل از واکنش RAPD در فرزندان به دلیل بروز برخی جهش‌ها در ساختار DNA وجود دارد اما این احتمال عموماً بسیار اندک (کمتر از ۱۰ درصد) است (۱۳).

علیرغم معایبی نظیر تکرارپذیری محدود و دشواری تفسیر باندها، روش RAPD تاکنون به منظور شناسایی آمیخته‌های بین گونه‌ای متعددی نظیر آمیخته‌های آزادماهی اطلس و قزل آلای قهوه‌ای (۱۳)، گربه‌ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus* و گربه‌ماهی آبی *I. furcatus* (۱۷)، ماهی‌سیم *Abramis brama* و کلمه *Rutilus rutilus* (۱۱) و کپور علف‌خوار و کپور سرگنده (۱) مورد استفاده قرار گرفته است. به طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که نتاج حاصل از آمیخته‌گری مصنوعی بین قزل آلای رنگین‌کمان ماده و ماهی آزاد دریای خزر جنس نر علیرغم بازماندگی بسیار اندک ماهیت آمیخته دارند و وقایعی نظیر ماده‌زایی یا نرزایی در فرایند آمیخته‌گری رخ نداده است. کاربرد روش مولکولی RAPD همچنین ما را قادر می‌سازد تا در مراحل ابتدایی و حتی قبل از خروج لارو از تخم نسبت به تشخیص ماهیت آمیخته آن اقدام نماییم. علاوه بر مزیت تشخیص زودهنگام، قطعیت این روش در مقایسه با سایر روش‌های شناسایی آمیخته‌ها نظیر ویژگی‌های مورفومتریک و مریستیک و یا کاریولوژیک از دیگر مزایای آن است. نتایج این تحقیق قابلیت کاربرد روش مولکولی RAPD را به منظور شناسایی آمیخته‌ها در آزادماهیان مورد تاکید قرار داد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان تشکر ویژه خود را از همکاری و مساعدت‌های مدیریت و کارکنان مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان دکتر باهنر کلاردشت وابسته به شیلات ایران، بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان گیلان و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به سبب حمایت‌های مالی ابراز می دارند. همچنین لازم است تا از مساعدت جناب آقای مهندس سید احمد قاسمی عضو هیات علمی پژوهشگاه خلیج فارس قدردانی ویژه به عمل آید.

جدول ۱- ترادف آغازگرهای RAPD مورد استفاده جهت شناسایی ماهیان آمیخته.

نام اختصاری	توالی آغازگر (′3→′5)
P-01	GTA GCA CTC C
P-02	TCG GCA CGC A
P-03	CTG ATA CGC C
P-04	GTG TCT CAG G
P-05	CCC CGG TAA C
P-06	GTG GGC TGA C
P-07	GTC CAT GCC A
P-08	ACA TCG CCC A
P-09	GTG GTC CGC A
P-10	TCC CGC CTA C
P-11	AAC GCG TCG G
P-12	AAG GGC GAG T
P-13	GGA GTG CCT C
P-14	CCA GCC GAA C
P-15	GGA AGC CAA C
P-16	CCA AGC TGC C
P-17	TGA CCC GCC T
P-18	GGC TTG GCC T
P-19	GGG AAG GAC A
P-20	GAC CCT AGT C
D-01	ACC GCG AAG C
D-02	GGA CCC AAC C
D-03	GTC GCC GTC A
K-01	CAT TCG AGC C
K-02	GTC TCC GCA A
K-03	CCA GCT TAG G
K-04	CCG CCC AAA C
H-09	TGT AGC TGG G
H-10	CCT ACG TCA G
H-11	CTT CCG CAG T

منابع

۱. جمشیدی، ش. (۱۳۸۱). بررسی کارایی روش PCR-RAPD در تشخیص تنوع ژنتیکی ماهیان کپور علفخوار ماده *Ctenopharyngodon idella* و کپور سرگنده نر *Hyphophtalmichthys nobilis* و نسل دورگه حاصل F_1 آن‌ها پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۵۷ ص.

۲. درافشان، س. (۱۳۸۵). دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر Salmo trutta caspius و قزل‌آلای رنگین کمان Oncorhynchus mykiss جهت پرورش نسل F1. رساله دکتری تخصصی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ١٤٤ ص.

3. Ali, B.A. Huang, T.H. Qin, D.N. and Wang, X.M., (2004) A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. Review in Fish Biology and Fisheries, 14: 443-453.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Allendorf, F.W. Laery R.F. Spruell, P. and Wenburg, J.K., (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends in Ecology and Evolution, 16: 613-622.
5. Arai, K., (1984) Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos. Memories of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 31: 1-94.
6. Babiak, I. Dobosz, S. Kuzminski, H. Goryczko, K. Cieselski, S. Brzuzan, P. Urbanyi, B. Horvath, A. Lahnsteiner, F. and Piironen, J., (2002). Failure of interspecies androgenesis in salmonids. Journal of Fish Biology, 61: 432-447.
7. Barker, C.J. Beck, M.L. and Biggers, C.J., (1983) Hematologic and enzymatic analysis of *Ctenopharyngodon idella* × *Hypophthamichthys nobilis* F1 hybrids. Comparative Physiology and Biochemistry, 74: 915-918.
8. Bartley, D.M. Rana, K. and Immink. A.J., (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10: 325-337.
9. Blanc, J.M. and Chevassus, B., (1979) Interspecific hybridization of salmonid fish.1. Hatching and survival up to the 15th day after hatching in F1 generation hybrids. Aquaculture, 18: 21-34.
10. Chevassus B, (1983) Hybridization in fish. Aquaculture, 33: 245-262.
11. Chrisanfova, G.G. Ludanny, R.I. Slynko, Y.V. Yakovlev, V.N. and Semyenova, S.K. (2004) RAPD fingerprinting of Common bream *Abramis brama* L., roach *Rutilus rutilus* L, and their F1 hybrides (*A.brama* × *R.rutilus* and *R.rutilus* × *A.brama*). Russian Journal of Genetics, 40: 1182-1185.
12. Congiu, L. Dupanloup, I. Patarnello, T. Fontana, F. Rossi, R. Arlati, G. and Zane L, (2001) Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. Molecular Ecology, 10: 2355-2359.
13. Elo, K. Ivanoff, S. Vuorinen, J.A. and Piironen, J., (1997) Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. Aquaculture, 152: 55-65.
14. Hillis, D. Moritz, C. and Barbara, M.K., (1996) Molecular systematic, 2nd. Sinauer Associate Inc. 655 pp.
15. Kiabi, B.H. Abdoli, A. and Naderi, M., (1999) Status of fish fauna in the south Caspian basin of Iran. Zoology in the Middle East, 18: 57-65.
16- Liu, Z.J. and Cordes, J.F., (2004) DNA marker technologies and their application in aquaculture genetics. Aquaculture, 238: 1-37.
17. Liu, Z. Li, P. Argue, B.J. and Dunham, R.A., (1998) Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F_1, F_2 and backcross hybrids. Animal Genetics, 29: 58-62.
18. Padhi, B.K. and Mandal, R.K., (1997) Inadvertent hybridization in a carp hatchery as detected by nuclear DNA RFLP. Journal of Fish Biology, 50: 906-909.
19. Pourkazemi, M., (1996) Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D thesis. School of biological sciences, University of Wales, Swan Sea. 260 pp.
20. Scheerer, P.D. and Thorgaard, G.H., (1983) Increased survival in salmonid hybrids by induced triploidy. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 40: 2040-2044.
21. Scribner, K.T. Page, K.S. and Barton, M.L., (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10: 293-323.
22. Suzuki, R. and Fukuda, Y., (1973) Appearance and numerical characters of F1 hybrids among salmonid fishes. Bulletin of Freshwater Fish Research Laboratory, 23: 5-24.
23. Van Eenennaam, A.L. Eenennaam, J.P.V. Medrano, J.F. and Doroshov, S.I., (1996) Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Aquaculture, 147: 177-189.

www.SID.ir