

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

سالار درافشان^۱، محمدرضا کلباسی^{۲*}، محمد پورکاظمی^۳، باقر مجازی امیری^۴

۱ و ۲- به ترتیب 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

۴- 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 آبی‌پروری 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 پیشرفته‌ترین 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 آلابی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و جنس نر ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۳۰ رشته آغازگر RAPD به‌طور تصادفی انتخاب شده و الگوی ژنوتیپی والدین در آمیزش‌های تک والدی (Single Pair Mating) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR بررسی گردید. از ۳۰ آغازگر تنها دو آغازگر H-09 و P-12 به ترتیب با توالی‌های TGT 3' و 5'AGC TGG G 3' و 5'AAG GGC GAG T 3' پلی مورفسم 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 (به جز یک مورد) توارث کاملی از باندهای اختصاصی والدین را دارا بودند. لذا ماهیت آمیخته بچه ماهیان تایید گردید. این تحقیق کاربردی روش RAPD را برای سنجش صحت آمیخته‌گری در دو گونه مهم از آزاد ماهیان تجاری ایران به اثبات رساند.

مقدمه

آمیخته‌گری یکی از روش‌های مرسوم اصلاح نژاد در فعالیتهای مرتبط با بخش کشاورزی از جمله شیلات و آبی‌پروری است. این روش اصلاح نژادی را می‌توان به تلاقی افراد متفاوت از لحاظ ژنتیکی اطلاق کرد که معمولاً به صورت آمیزش درون گونه‌ای و یا بین گونه‌ای اجرا می‌گردد (۴). تاکنون آمیخته‌های متعددی از آبزیان خصوصاً ماهیان تولید شده‌اند (۸ و ۹). به‌طور کلی هدف از آمیخته‌گری در صنعت آبی‌پروری و شیلات بهبود عملکرد 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 آلی در آمیخته‌ها ممکن است به صورت برتری آمیخته یا (هتروزیس) بروز نماید (۸ و ۱۰).

واژه‌های کلیدی

آمیخته‌گری،

قزل آلابی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*،
ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*
RAPD

و تاس ماهی سفید *A. transmontanus* (۱۲)، نشانگر ریزوماهواره^۵ جهت شناسایی ماهیان آمیخته در انواع مختلف آزاد ماهیان (۲ و ۶) و نشانگر^۱ RAPD برای شناسایی آمیخته آزاد ماهی اطلس *Salmo salar* و قزل آلاهی قهوه‌ای *Salmo trutta* (۱۳)، آمیخته کپور علف‌خوار *Ctenopharyngodon idella* و کپور سرگنده *Hyphophthalmichthys nobilis* (۱) اشاره نمود. در این بین نشانگر RAPD به دلایلی نظیر عدم نیاز به شناخت ماهیت ژنوتیپی نمونه‌ها، بررسی چندین جایگاه ژنی به صورت همزمان و سهولت و ارزانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۳، ۱۶). ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلاهی رنگین کمان *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 آبی پروری چندان موفقیت آمیز نیست (۲). از دگرسو ماهی قزل آلاهی رنگین کمان از جمله گونه‌های اهلی شده آزاد ماهیان بوده که اگرچه در ایران گونه‌ای غیر بومی محسوب می‌شود، اما به سبب مزایای بیشماری که از خود در سامانه‌های پرورشی نشان داده است، امروزه مهم‌ترین گونه ماهی سردآبی در کشور است. آمیخته‌گری بین دو گونه مذکور به صورت مستقیم و معکوس، به منظور 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 آلاهی رنگین کمان نر) نتایج حاصل نمی‌گردد و تمامی جنین‌ها در طی مرحله انکوباسیون از بین می‌روند، در مقابل آمیزش معکوس بین دو گونه مذکور (قزل آلاهی رنگین کمان ماده و ماهی آزاد دریای خزر نر) بازماندگی اندکی (کمتر از ۱۰ درصد تا آغاز تغذیه خارجی) را نشان داد. محدودیت بازماندگی نتایج این گمان را تقویت نمود که ماهیان حاصل از آمیزش مصنوعی ماهیت آمیخته نداشته و در

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 آب دریا 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 آبی‌پروری است (۹). در این بین، بررسی صحت آمیخته‌گری از اهمیت بسیار برخوردار است. این مهم در ماهیان به دلیل احتمال بروز فرایندهایی نظیر ماده زایی^۱ و یا حتی نر زایی^۲ 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). به منظور بررسی ماهیت واقعی نتایج حاصل از آمیخته-گری می‌توان از روش‌ها یا ویژگی‌های متعددی نظیر ویژگی‌های مورفومتریک و مریستیک، فیزیولوژیک، کاربولوژیک 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 آبی‌پروری مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به نشانگر^۳ RFLP برای شناسایی انواع آمیخته‌های بین گونه-ای کپور ماهیان هندی (۱۸)، نشانگر^۴ AFLP برای شناسایی آمیخته‌های بین گونه‌ای تاس ماهی ایتالیایی *Acipenser naccari*

^۱ Gynogenesis

^۲ Androgenesis

^۳ Restriction Fragment Length Polymorphism

^۴ Amplified Fragment Length Polymorphism

^۵ Microsatellite

^۶ Random Amplified Polymorphic DNA

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 مرز در سه مرحله واسرشته‌سازی اولیه (یک سیکل) در 94°C به مدت ۵ دقیقه، الحاق (۳۰ تا ۳۵ چرخه) شامل واسرشته سازی در 94°C به مدت ۳ دقیقه، الحاق در $36-34^{\circ}\text{C}$ به مدت یک دقیقه و بسط در 72°C به مدت ۳ دقیقه بهینه سازی و اجرا شد. بسط نهایی (یک سیکل) در 72°C به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید. هر واکنش PCR در حجم کل ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از DNA ($15\text{ ng}/\mu\text{l}$)، آنزیم تک پلی مرز $0.2\ \mu\text{l}$ ($5\text{ U}/\mu\text{l}$)، $0.5\ \mu\text{l}$ (0.5 mM) dNTPs، $1-2\ \mu\text{l}$ از 50 mM MgCl_2 ، بافر PCR $10\times$ به میزان $2/5\ \mu\text{l}$ و آغازگر 20 pM به میزان یک میکرولیتر و آب مقطر تا رسیدن به حجم کل بهینه گردید. تمامی مواد واکنش از شرکت سیناژن-ایران تهیه شد. به منظور 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

به منظور 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 پلی مورف مناسب بین دو گونه، آغازگرهای H-09 و P-12 انتخاب گردیدند (جدول ۱)، آغازگرهای H-09 به ترتیب ۵ و ۷ باند در قزل‌آلابی رنگین‌کمان و ۶ و ۶ باند در ماهی آزاد دریای خزر تولید نمودند که در محدوده $700-200\text{ bp}$ قرار داشتند. الگوی باندهای 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 (440 bp) در والد نر و سه قطعه اختصاصی کاملاً واضح (310 ، 380 ، 410) در والد ماده را از

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 آلابی 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 تفریح فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

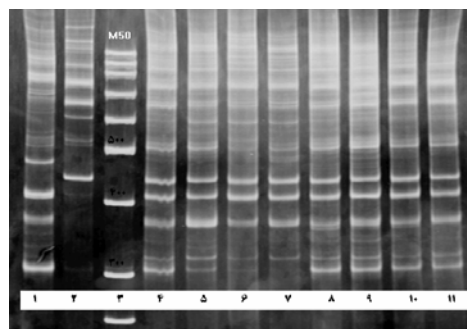
جهت بررسی صحت آمیخته‌گری، تلاقی‌ها به صورت تک والدی^۱ اجرا شد (۲۲)، به این منظور سه قطعه مولد نر ماهی آزاد دریای خزر ($58/6 \pm 6/8\text{ cm}$ و $2025 \pm 64\text{ g}$) و سه قطعه مولد ماده قزل آلابی رنگین‌کمان ($67/57 \pm 4/27\text{ cm}$ و $1535 \pm 531\text{ g}$)، از بین مولدین موجود در مرکز تکثیر و 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). به منظور اجرای مطالعات مولکولی بررسی صحت آمیخته‌گری، نمونه‌گیری از بافت باله دمی مولدین و از لاروهای تازه تفریح شده (حداقل ۱۰ قطعه برای هر آمیزش به همراه کیسه زرده) برای هر سه جفت مولد استفاده شده در فرآیند آمیخته‌گری صورت گرفت و بلافاصله پس از نمونه‌گیری در الکل اتانول ۹۶ درجه تثبیت و به آزمایشگاه ژنتیک بیوتکنولوژی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. این نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای 4°C نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی به روش فنل-کلروفرم اجرا شد (۱۴). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش‌های الکتروفورز آگارز و اسپکتروفتومتری مطابق روش‌های استاندارد اجرا گردید (۱۹). واکنش زنجیره‌ای پلی مرز^۲ PCR با استفاده از ۳۰ رشته آغازگر RAPD (جدول ۱) در دستگاه ترموسایکلر (Mastecycler EP Gradient, Eppendorf, Germany) اجرا و آشکارسازی

¹ Single pair mating

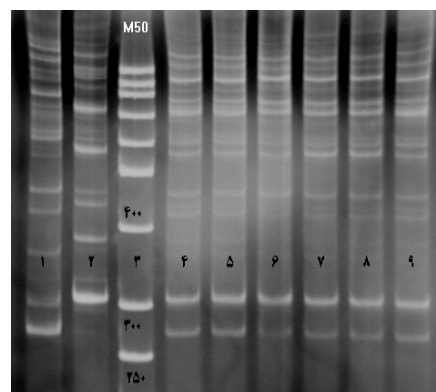
² Polymerase chain reaction

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 طور کلی ناتوان از ایجاد الگوی بانندی و یا تنها قادر به ایجاد الگوی بانندی 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 بانندی می‌تواند متأثر از نبود جایگاه‌های اتصال آغازگر بر روی دی.ان.ا و یا فاصله نامناسب جایگاه‌های اتصال باشد. به نظر می‌رسد که دو گونه قزل آلائی رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر از نظر ژنتیکی با یکدیگر کاملاً متفاوت هستند. این امر با توجه به موقعیت فیلوژنتیکی آنها در رده بندی، تفاوت آشکار در عدد و فرمول کروموزومی و نیز بازماندگی اندک نتایج آمیخته بین آنها قابل درک است. با این وجود اغلب آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از ایجاد الگوی بانندی پلی‌مورف بین جفت مولدین مورد استفاده در آزمایش ناتوان بودند. شاید تعداد نسبتاً اندک آغازگرها و نیز تعداد محدود جفت مولد (تنها ۳ جفت) منجر به افزایش احتمال مشابهت الگوی بانندی 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 (۳۱۰ bp) حاصل از آغازگر P-12 در یکی از فرزندان مشاهده نشد (شکل ۱). این حالت می‌تواند بیانگر ماهیت هتروزیگوتی قطعه مذکور در والد ماده و یا بروز جهش در قطعه مورد نظر در نتایج حاصل از آمیخته‌گری باشد که امکان تکثیر آن قطعه خاص را در طی PCR محدود می‌سازد (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

خود نشان داد (شکل ۱)، لاروهای حاصل از آمیزش مصنوعی دو والد مذکور (۱۰/۱۰) توارث کاملی از قطعات (۳۸۰، ۴۱۰ و ۴۴۰) را نشان دادند به طوری که تماماً واجد قطعه خاص والد پدری (۴۴۰bp) به همراه قطعات خاص والد مادری (۳۸۰ و ۴۱۰) 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 ۳-۱۱) بر روی ژل اکریلامید ۶ 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 ۶ درصد. ستون ۱ مولد ماده، ستون ۲ مولد نر، ستون ۳ مارکر 50bp، ستون‌های ۴-۹، نتایج 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 (R₂) و ۳۱۰ bp را در والد نر (S₅) نشان داد، استخراجی از تمامی بچه ماهیان آمیخته (۱۰/۱۰)، پس از اجرای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر H₉ و انجام الکتروفورز دارای هر دو قطعه اختصاصی ۲۷۵/۳۱۰bp بود که نشان دهنده ماهیت آمیخته لاروهای تولیدی بود (شکل ۲)، نتایج حاصل از PCR

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 می‌دارند. 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

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 آلابی قهوه‌ای (۱۳)، گربه‌ماهی روگامی *Ictalurus punctatus* و گربه‌ماهی آبی *I. furcatus* (۱۷)، ماهی سیم *Abramis brama* و کلمه *Rutilus rutilus* (۱۱) و کپور علف‌خوار و کپور سرگنده (۱) مورد استفاده قرار گرفته است. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که نتایج حاصل از آمیخته‌گری مصنوعی بین قزل آلابی رنگین کمان 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 مرستیک و یا کاربولوژیک 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

منابع

۱. جمشیدی، ش. (۱۳۸۱). بررسی کارایی روش PCR-RAPD در تشخیص تنوع ژنتیکی ماهیان کپور علف‌خوار ماده *Ctenopharyngodon idella* و کپور سرگنده نر *Hyphophthalmichthys nobilis* و نسل دورگه حاصل F₁ آن‌ها پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۵۷ ص.

۲. درافشان، س. (۱۳۸۵). دستکاری‌های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل‌آلابی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* جهت پرورش نسل F₁ رساله دکتری تخصصی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۴۴ 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.

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* × *Hypophthalmichthys 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 hybrid (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 F₁, F₂ 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.