

مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی آزاد (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) در رودخانه‌های چشمه کیله و کرگانرود با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

- سلطنت نجارلشگری*: گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
- سهراب رضوانی گیل‌کلائی: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
- ابوالقاسم کمالی: گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
- مهدی سلطانی: گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) یکی از ۹ زیر گونه قزل‌آلای قهوه‌ای در جهان و از گونه‌های مهم اقتصادی و در معرض خطر انقراض دریای خزر می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش ریزماهوره مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۲۲۵ عدد مولد ماهی آزاد از رودخانه‌های چشمه کیله و کرگانرود جمع‌آوری و DNA ژنومی با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج شد. کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از روش‌های الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۱۶ جفت آغازگر ریزماهوره انجام و محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ الکتروفورز و با روش نترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. باندهای DNA با نرم افزار Photo-Capt امتیازدهی شدند و پنج جایگاه چندشکلی تولید شد. میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب 0.09 ± 0.047 و 0.10 ± 0.061 محاسبه شد و بیش‌تر جایگاه‌ها خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند ($P < 0.001$). نتایج آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که اختلاف تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها معنی‌دار است ($P < 0.01$). بنابراین بیش از یک جمعیت در رودخانه‌های مورد مطالعه وجود دارد که باید در بازسازی ذخایر مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Salmo trutta caspius*، تنوع ژنتیکی، ریزماهوره



مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر یکی از ماهیان با ارزش دریای خزر و دنیا محسوب شده و در سال‌های اخیر عوامل متعددی از جمله صید بی‌رویه و غیرمجاز، آلودگی دریاها و منابع آبی، از بین رفتن زیستگاه‌ها و مناطق طبیعی تخم‌ریزی و... باعث تهدید جمعیت و در مواردی کاهش موفقیت در بازسازی ذخایر این گونه ارزشمند از طریق تکثیر مصنوعی شده است. این ماهی براساس معیارهای IUCN در لیست سرخ و در طبقه در معرض خطر انقراض قرار دارد (۸). بنابراین بررسی گوناگونی و تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر به‌عنوان یک گونه به‌شدت در معرض خطر انقراض در حوضه جنوبی دریای خزر ضروری می‌باشد (۲۱). سازمان شیلات ایران با احداث مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید دکتر کلاردشت در سال ۱۳۶۰ و تولید سالانه صدها هزار بچه‌ماهی و رهاسازی آن‌ها به رودخانه‌های چشمه کیله، سردآبرود و چالوس با هدف حفظ و افزایش ذخایر ماهی آزاد دریای خزر نقش مهمی در این راستا ایفا می‌کند (۱). شناسایی گونه‌ها، زیر گونه‌ها و جمعیت‌های آبیان از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا علاوه بر مدیریت صحیح و بهره‌برداری مناسب، موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها یا جمعیت‌های پرارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در تکثیر و پرورش خواهد شد. با توجه به حساسیت بالای صفات مورفومتریک و مریستیک به تغییرات محیطی و اثرات منفی دستکاری در نشانه‌گذاری بر سلامت و بقای ماهیان و از طرفی محدود بودن تفسیر داده‌های نشانه‌گذاری به زمان جمع‌آوری آن‌ها (۴)، پیشرفت علم استفاده از نشانگرهای مولکولی مانند RAPD, RFLP, AFLP, Allozyme و mtDNA و Microsatellite را که متأثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشند جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان‌پذیر کرده است (۲۸). بی‌توجهی به اصول صحیح ژنتیکی، تکاملی و اکولوژیک در مخلوط نمودن هدمند ماهیان مراکز تکثیر و ماهیانی که به‌طور طبیعی تولیدمثل می‌کنند می‌تواند پیامدهای معکوسی را برای ماهیان دارای تولیدمثل طبیعی به‌همراه آورده و در نهایت برنامه‌های بازسازی ذخایر را مختل و استفاده پایدار از منابع مذکور را در بلندمدت با اشکال روبرو سازد (۲۶). در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه بچه‌ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، دامنه هتروزیگوسیتی در هر جایگاه بین ۰/۷۷-۰/۴۱ به‌دست آمد (۳). در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ نمونه بچه‌ماهی آزاد دریای خزر از جمعیت غرب استان مازندران با استفاده از روش PCR-RFLP، دامنه هتروزیگوسیتی بین ۰/۰۹-۰/۸ و دامنه تعداد آلل بین ۳-۶ عدد در هر جایگاه به‌دست آمد (۲). در بررسی ساختار جمعیتی قزل‌آلای جویباری (*Salvelinus*)

fontinalis) دریاچه‌های حوضه آبریز خلیج هند با استفاده از روش ریزماهوره، سطح بالایی از هتروزیگوسیتی (۰/۲۷-۰/۱۶) مشاهده گردید و اعلام شد که علی‌رغم عدم وجود موانع فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه‌ها، هر دریاچه جمعیت تولیدمثلی مجزایی دارد (۴). در بررسی ساختار جمعیت دو نوع دریاچه‌ای و رودخانه‌ای *Oncorhynchus nerka* در رودخانه‌های شمال بریتیش کلمبیا با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر ریزماهوره، میانگین آلل‌های مشاهده شده و ۱۲/۷ و ۰/۷۲ و در دریاچه به‌ترتیب ۱۰/۵ و ۰/۶۵ محاسبه شد (۷). در بررسی توزیع جمعیت‌های غیربومی قزل‌آلا در اسلوونی و سایر رودی‌ها با جمعیت‌های بومی قزل‌آلا در دریاچه آدریاتیک و دریاچه دانوب با استفاده از ۵ جفت آغازگر ریزماهوره، دامنه آللی ۸/۲-۱/۲، دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۱۲-۰/۶۵ و دامنه هتروزیگوسیتی قابل انتظار ۰/۷۲-۰/۰۶ محاسبه گردید (۱۹). از آنجایی که تفکیک جمعیت‌ها و شناسایی ذخایر ژنتیکی براساس داده‌های ریخت‌شناسی از ضریب اطمینان کم‌تری نسبت به داده‌های مولکولی برخوردار است و از طرف دیگر چون تفاوت‌های مورفولوژی و فیزیولوژی از ذخایر ژنومی هر موجود ناشی می‌شود، به‌همین دلیل بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و نیز افراد داخل جمعیت به دلیل تغییرات شرایط محیطی ضروری است (۳۰). بنابراین با توجه به لزوم شناخت دقیق ذخایر ماهی آزاد دریای خزر به منظور اعمال مدیریت صحیح آبی‌پروری و نبود اطلاعات کافی درباره وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های موجود سعی شده که با انجام این مطالعه تنوع ژنتیکی این ماهی در رودخانه‌های چشمه کیله و کرگانرود با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی، حدود ۵-۳ گرم از بافت نرم و تازه انتهای باله ۲۲۵ عدد مولد ماده و نر ماهی آزاد دریای خزر صید شده با استفاده از سد شیل (کلهم)، تورهای پره و سالیک و دام از رودخانه چشمه کیله (۱۷۸ نمونه) در استان مازندران و رودخانه کرگانرود (۴۷ نمونه) در استان گیلان در فصول پاییز و زمستان سال ۱۳۹۰ توسط قیچی جدا و بعد از تثبیت در الکل اتانول ۹۶° به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده اکولوژی آبیان دریای خزر شهرستان ساری منتقل گردید. DNA ژنومی به روش استات آمونیوم استخراج (۲۴) و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱٪ (۳۷) تعیین شد. برنامه دستگاه



ترمال سایکلر پس از به دست آمدن غلظت بهینه مواد (جدول ۱) و بهترین دمای اتصال به نحوی تنظیم گردید تا حداقل باند اضافی را دارا بوده و باند اصلی دارای وضوح کامل باشد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ۱۶ جفت آغازگر ریزماهواره (جدول ۲) استفاده گردید.

جدول ۱: نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA	۵-۱۰ نانوگرم	۰/۴
Taq DNA Polymerase	۱ u	۰/۲۵
dNTPs	۱ میلی‌مول	۰/۲۵
MgCl ₂	۱/۵ میلی‌مول	۰/۷۵
PCR Buffer	۱ X	۲/۵
Forward Primer	۱/۲ نانومتر	۱
Reverse Primer	۱/۲ نانومتر	۱
آب مقطر	*	۱۸/۷۵

* مواد فوق به وسیله آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی رسانده شد.

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

ردیف	جایگاه	توالی آغازگر	منبع
۱	OtsG 3	F: 5'-GGACAGGAGCGTCTGCTAAATGACTG-3' R: 5'-GGATGGATTGATGAATGGGTGGG-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۲	OtsG 13	F: 5'-GGTTCCTCTCACATAGAA-3' R: 5'-GCCTAGTTAAATAAAGGTA-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۳	OtsG 68	F: 5'-TATGAACTGCAGCTTGTATTAGT-3' R: 5'-CATGTCGGCTGCTCAATGTA-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۴	OtsG 83	F: 5'-GGACAGGAGCGTCTGCTAAATGACTG-3' R: 5'-GGATGGATTGATGAATGGGTGGG-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۵	OtsG 100	F: 5'-TGAACATGAGCTGTGTGAG-3' R: 5'-ACGGACGTGCCAGTGAG-3'	Nelson و همکاران, ۱۹۹۸
۶	OtsG 103	F: 5'-AGGCTCTGGGCTCGTG-3' R: 5'-TGATATGGTGTGATAGCTGG-3'	Beacham و همکاران, ۱۹۹۸
۷	OtsG 107	F: 5'-ACAGACCAGACCTCAACA-3' R: 5'-ATAGAGACCTGAATCGGTA-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۸	OtsG 108	F: 5'-TCTGTTTATCTTTCTATTA-3' R: 5'-AAGGAGAGACAGAGGG-3'	Nelson و همکاران, ۱۹۹۹
۹	OtsG 249	F: 5'-TCTCAGAGGGTAAAATCTCAGTAAG-3' R: 5'-GTACAACCCCTCTCACCTACCC-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۱۰	OtsG 409	F: 5'-GATGCCATTTGTGTCAACCATCATT-3' R: 5'-CATTCTCCTGCCTCACAGAGTTTA-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۱۱	OtsG 432	F: 5'-TGAAAAGTAGGGGAAACACATACG-3' R: 5'-TAAAGCCATTGAATTGAATAGAA-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۱۲	OtsG 474	F: 5'-TTAGCTTTGGACATTTTATCACAC-3' R: 5'-CCAGAGCAGGGACCGAAG-3'	Ohno, ۱۹۷۰
۱۳	Strutta 12	F: 5'-AATCTCAAATCGATCAGAAG-3' R: 5'-AGCTATTTACAGACATCACC-3'	Poteaux و همکاران, ۱۹۹۹
۱۴	Strutta 58	F: 5'-AACAAATGACTTTCTCTGAC-3' R: 5'-AAGGACTTGAAGGACGAC-3'	Poteaux و همکاران, ۱۹۹۹
۱۵	Ssa 171	F: 5'-TTATTATCCAAAGGGTCAAAA-3' R: 5'-GAGGTCGCTGGGGTTTACTAT-3'	O'Reilly و همکاران, ۱۹۹۶
۱۶	OmyFgt1TUF	F: 5'-AGATTTACCCAGCCAGGTAG-3' R: 5'-CATAGTCTGAACAGGGACAG-3'	Nelson و همکاران, ۱۹۹۸



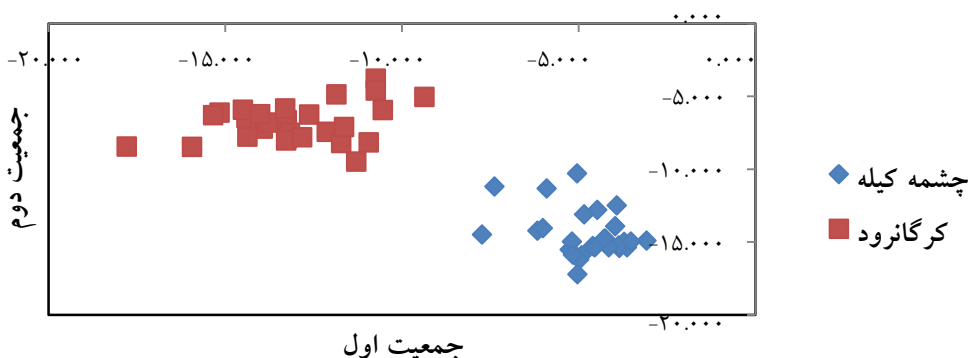
کیفیت محصولات تکثیر شده PCR با استفاده از الکتروفورز افقی ژل آگارز ۲٪ ارزیابی و برای مشاهده آلل‌ها و تعیین اندازه آن‌ها از الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ (۲۹) و روش رنگ‌آمیزی نترات نقره (۶) استفاده شد. ثبت تصاویر ژل توسط دستگاه مستندساز ژل (مدل Doc- Print- 1000/26MX، ساخت شرکت Vilber Lourmat فرانسه) انجام و باندهای حاصل با استفاده از نرم‌افزار Photo-Capt Ver.15.0 امتیازدهی شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Alex Ver.6.41 (۲۵) و Pop Gene Ver.1.3 (۳۹) انجام پذیرفت.

نتایج آزمون مربع کای نشان داد که در جایگاه‌های Otsg 100، Otsg 107، Otsg 83 و Ssa 171، رودخانه چشمه کیله و Otsg 249 و Ssa 171 رودخانه کرگانرود انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شد ($P < 0.001$). میزان F_{ST} (شاخص تمایز ژنتیکی) و N_M (شاخص جریان ژنی) به ترتیب (۰/۳۲) و (۰/۵۳) و میزان فاصله و شباهت ژنتیکی به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۲۲ به دست آمد. براساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۵۸٪) و بین جمعیت‌ها (۴۲٪) بود و اختلاف تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها در رودخانه‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود ($P < 0.001$). نمودار سنجش ژنتیکی جفت جمعیت‌ها توانست جمعیت‌های رودخانه‌های چشمه کیله و کرگانرود را به‌طور کامل از یکدیگر تفکیک نماید (شکل ۱).

غلظت DNA در تمام نمونه‌ها ۱۰۰-۵۰ نانوگرم به دست آمد و پنج جفت از آغازگرها (Otsg 83، Otsg 100، Otsg 107، Ssa 171 و Otsg 249) الگوهای باندهای چندشکلی با دامنه ۲۴۴-۱۰۸ جفت باز و ۵۱ آلل تولید نمودند و بهترین درجه حرارت برای پهلویی آغازگرها بین ۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. در مجموع ۳۶ آلل اختصاصی به دست آمد و بیش‌ترین تعداد آلل اختصاصی (۲۳) در رودخانه کرگانرود مشاهده شد. میانگین تعداد آلل‌های واقعی و مؤثر به ترتیب

نتایج

شکل ۱: سنجش ژنتیکی جفت جمعیت‌های ماهی آزاد دریای خزر



شکل ۱: سنجش ژنتیکی جفت جمعیت‌های ماهی آزاد دریای خزر

بحث

به‌ویژه به‌حداقل رسیدن مولدینی که برای تخم‌ریزی به‌رودخانه‌ها مهاجرت می‌کنند، آمیزش‌های خویشاوندی و ... باشد که موجب محدودشدن جریان ژنی و کاهش تنوع آلی شده است.

Jamshidi و Kalbassi (۲۰۱۱) با بررسی ارتباط بین شکل‌های مهاجر بهاره و پاییزه ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش RAPD، متوسط تعداد آلل مشاهده شده را ۱۰/۱۲ به‌دست آوردند که از مقدار یاد شده برای ماهیان رودکوچ کم‌تر محاسبه شد.

معمول‌ترین معیار تنوع ژنی در یک جمعیت تعیین میزان هتروزیگوسیتی است (۱۲). در این مطالعه بالا بودن مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده رودخانه کرگانرود بیانگر بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر آن نسبت به رودخانه چشمه کیله است. میانگین تنوع ژنتیکی مشاهده شده در این مطالعه کم‌تر از مقدار اعلام شده توسط Dewoody و Avise (۲۰۰۰) برای ماهیان رودکوچ (۰/۶۸) بود و پایین بودن آن را می‌توان به عوامل مختلفی چون صید بی‌رویه، از بین رفتن مکان‌های طبیعی تخم‌ریزی، تکثیر مصنوعی و ... نسبت داد. Sourinejad و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی انتساب نسب فرزندان مولدین ماده و نر ماهی آزاد دریای خزر موجود در مرکز کلاردشت از جمعیت رودخانه تنکابن با استفاده از روش ریزماهوره، متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در والدین و فرزندان را به‌ترتیب ۰/۱۹±۰/۸۳ و ۰/۰۱±۰/۷۲ محاسبه نمودند که بیش‌تر از مقدار یاد شده برای ماهیان رودکوچ می‌باشد.

شاخص شانون معیار مناسبی برای ارزیابی چندشکلی و میزان تغییرپذیری جایگاه‌های مورد مطالعه در سطح جمعیت می‌باشد. بالا بودن مقدار شاخص شانون رودخانه کرگانرود در این مطالعه بیانگر تنوع بالاتر این رودخانه می‌باشد. یوسفیان و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی ژنتیکی مولدین نر، ماده و بچه ماهیان آزاد دریای خزر حاصل از به‌گزینی مرکز کلاردشت با استفاده از روش ریزماهوره، متوسط شاخص شانون در مولدین ماده، نر و بچه‌ماهیان را به‌ترتیب ۲/۰۱، ۱/۹۱ و ۲/۰۵ به‌دست آوردند.

F_{ST} روش برآورد مرسوم تمایز ژنتیکی در مطالعات ژنتیکی است که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با میزان جریان ژنی (N_M) یا تعداد مهاجرت مؤثر میان جمعیت‌ها ارتباط دارد (۲۷). میزان F_{ST} در این مطالعه بزرگ‌تر از ۰/۲۵ به‌دست آمد که براساس نظریه Dorak (۲۰۰۵) بیانگر تمایز ژنتیکی خیلی زیاد جمعیت‌های مورد مطالعه و جدایی کامل آن‌ها از یکدیگر می‌باشد. Vera و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه ساختار ژنتیکی مولدین و

تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط اتحادیه بین‌المللی حفاظت از گونه‌ها و طبیعت برای برنامه‌های حفاظت از ذخایر است (۲۳) و ریزماهوره‌ها شاخص حساسی در اندازه‌گیری هموزایگوسیتی در جفت‌گیری‌های هم‌خون هستند بنابراین برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب می‌باشند (۵). حالت چندشکلی در ژنوم هسته موجودات به‌عنوان شاخص ژنتیکی ارزشمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی به‌منظور حفاظت از ذخایر ژنی گونه‌ها محسوب می‌شود (۳۴) و در این مطالعه نیز در پنج جایگاه حالت چندشکلی مشاهده شد. در این راستا می‌توان به مطالعات Dionne و همکاران (۲۰۰۸) که از ۱۳ جفت نشانگر ریزماهوره چندشکلی برای بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد اقیانوس اطلس بهره بردند اشاره نمود.

فراوانی آلی ساده‌ترین راه بررسی تنوع ژنی جوامع زیستی بوده و جهت بیان و آشکارسازی روابط تکاملی جمعیت‌های نزدیک به هم ابزار مناسبی است (۳۳) و بالا بودن ارتباطات ژنتیکی (۱۶) و تبادلات ژنتیکی سبب کاهش (۱۷) و در مقابل پویایی ژنتیکی سبب افزایش تعداد آلل‌های اختصاصی می‌شود (۱۵). بنابراین بالا بودن تعداد آلل‌های اختصاصی رودخانه کرگانرود بیانگر پویایی ژنتیکی جمعیت آن می‌باشد. یوسفیان و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی ژنتیکی مولدین نر، ماده و بچه ماهیان آزاد دریای خزر حاصل از به‌گزینی مرکز کلاردشت با استفاده از روش ریزماهوره، بیش‌ترین تعداد آلل اختصاصی (۱۲) را در جایگاه Otsu 100 و محدود بانندی ۲۶۰-۱۱۲ و کم‌ترین تعداد آن (۸) را در جایگاه Otsu 474 و محدود بانندی ۱۷۲-۱۴۰ مشاهده نمودند.

در مطالعات تنوع ژنتیکی، غنای آلی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است زیرا بالا بودن آن بیانگر بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر بوده و استفاده از آن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است (۱۰). بالا بودن تعداد آلل‌های واقعی و مؤثر رودخانه کرگانرود بیانگر بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر آن است و میانگین تعداد آلل مشاهده شده در این مطالعه کم‌تر از مقدار اعلام شده توسط Dewoody و Avise (۲۰۰۰) برای ماهیان رودکوچ (۱۱/۳) بود که می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی چون تفاوت درجه حرارت، شوری، مواد مغذی و جریان‌های دریایی بین زیستگاه‌های مختلف دریای خزر، کاهش شدید جمعیت



بالا بودن سلامت افراد آن‌ها می‌باشد (۱۹). Vera و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه ساختار ژنتیکی مولدین و بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر ایران جمع‌آوری شده از چهار رودخانه با استفاده از روش ریزماهوره، اعلام کردند که براساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۹۱/۱۱٪ ($P < 0/001$)، بین جمعیت‌ها ۷/۲۰٪ ($P = 0/066$) و بین جمعیت‌های داخل گروه ۱/۶۹٪ ($P < 0/001$) می‌باشد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که دو گروه ژنتیکی متفاوت از ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه‌های مورد مطالعه وجود دارد و علی‌رغم فشار صید و کاهش شدید ذخایر، این ماهی توانسته تنوع ژنتیکی خود را به‌میزان قابل توجهی حفظ نماید که بایستی در برنامه‌های بازسازی ذخایر سازمان شیلات ایران مد نظر قرار گیرد. هم‌چنین نتایج نشان‌دهنده توانایی بالای روش ریزماهوره در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه‌های مورد مطالعه است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور- تنکابن، مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید دکتر باهنر- کلاردشت، پژوهشکده اکولوژی آبریان دریای خزر- ساری و تمام کسانی که در مراحل مختلف انجام این مطالعه همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. بهرامیان، ب.، ۱۳۷۴. گزارش عملکرد و تولید مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید دکتر باهنر کلاردشت ۷۵-۱۳۷۴. سازمان شیلات ایران. ۱۹ صفحه.
۲. رفیعی، ا.، ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیولوژی دریا. دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان. ۵۸ صفحه.
۳. نویدی مقدم فومنی، ر.، ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره (Microsatellite markers). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیولوژی دریا. دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان. ۱۱۲ صفحه.

4. Adams, B.K. and Hutchings, A., 2003. Micro geographic population structure of

بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر ایران جمع‌آوری شده از چهار رودخانه با استفاده از روش ریزماهوره، میزان تمایز ژنتیکی را (۰/۰۵) به‌دست آوردند که بیانگر تمایز ژنتیکی پایین جمعیت‌های مطالعه شده می‌باشد.

جریان ژنی یکی از مهم‌ترین معیارها در تکوین ساختار جمعیتی گونه‌های مورد مطالعه است به‌طوری‌که اگر جریان ژنی بین جمعیت‌ها زیاد باشد بیانگر تکامل گروهی آن‌ها بوده و در صورتی که کم باشد نشانگر این است که هر یک از جمعیت‌ها تقریباً به‌طور مستقل از یکدیگر تکامل یافته‌اند (۳۱). میزان جریان ژنی در این مطالعه کوچک‌تر از یک به‌دست آمد بنابراین براساس نظریه Li و همکاران (۲۰۰۷) عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، رانش ژنتیکی بوده است و تفاوت‌های بالای ژنتیکی بین جمعیت‌ها زمانی رخ می‌دهد که میزان جریان ژنی کم‌تر از یک باشد (۳۴).

قانون هاردی-واینبرگ رابطه پیش‌بینی‌های ژنوتیپی اختلاف را برحسب فراوانی‌های آللی خزانه ژن والدینی بیان می‌کند. وجود جمعیت بزرگ با آمیزش اتفاقی، عدم انتخاب، عدم مهاجرت، فقدان فشار جهش و میوز معمولی در برقراری حالت تعادل مؤثر می‌باشند (۱۴). مشاهده انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در این مطالعه می‌تواند به‌علت حضور آلل‌های نول، وجود آمیزش‌های خویشاوندی، جفت‌گیری‌های غیر تصادفی و مخلوط شدن باشد. Beacham و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی ریزماهوره‌ای Sokeye salmon، انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را در بعضی جایگاه‌ها برای بعضی جمعیت‌ها مشاهده نمودند ($P < 0/05$).

ماتریس شباهت و فاصله ژنتیکی برای توصیف تمایز ژنتیکی ساختارهای جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. براساس نظریه Thorpe و همکاران (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی به‌دست آمده در این مطالعه در محدوده جنس‌های هم‌خانواده (۰/۵۸-۱/۲۱) قرار می‌گیرد که خود دلیلی بر انشقاق ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. Jamshidi و Kalbassi (۲۰۱۱) با بررسی ارتباط بین شکل‌های مهاجر بهاره و پاییزه ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش RAPD، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی را به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۰۱ به‌دست آوردند.

آنالیز واریانس مولکولی آزمون مناسبی برای مشخص کردن ساختار جمعیت و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها است (۱۳) و نتایج حاصل از آن نشان داد که بیش‌ترین میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت هر رودخانه وجود دارد که بیانگر توانایی بالای جمعیت‌های مورد مطالعه در پاسخ به انتخاب طبیعی و



- Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes of Teleostei) to a population genetic study Arabian Peninsula stocks. Fisheries Research. Vol. 79, pp: 258-266.
17. **Hoolihan, J.P.; Anandh, P.J. and Herwerden, L.V., 2006.** Mitochondrial analysis of narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) suggests a single genetic stock in the ROPME sea area. ICES Journal of Marine Science. Vol. 63, pp: 1066-1074.
 18. **Jamshidi, S.H. and Kalbasi, M.R., 2011.** Conspecific relation between two seasonal migratory forms of endangered Caspian trout, *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877, revealed by RAPD markers. Iranian Journal of Fisheries Science. Vol. 10, No. 3, pp:437-446.
 19. **Jug, T.; Berrebi, P. and Snoj, A., 2005.** Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout population as observed through microsatellite DNA analysis. Biological Conservation. Vol. 123, pp: 381-388.
 20. **Kalinowski, S.T., 2005.** Polymorphic loci require large sample size or estimate genetic distance. Heredity. Vol. 94, pp: 33-36.
 21. **Kiabi, B.H.; Abdoli, A. and Naderi, M., 1999.** Status of fish fauna in south Caspian basin of Iran, Zoology in the Middle East. Vol. 16, pp: 57-65.
 22. **Li, D.; Kang, D.; Yin, Q.; Sun, Z. and Liang, L., 2007.** Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. Genetics and Genomics. Vol. 34, pp: 984-993.
 23. **Lucentini, L.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Gliarelli, L.; Natali, M. and Panara, F., 2006.** Microsatellite Polymorphism in Italian population of northern pike (*Esox Lucius* L.). Fisheries Research. Vol. 80, pp: 251-262.
 24. **Mc Quown, E.C.; Sloss, B.L.; Sheehan, R.J.; Rodzen, J.; Tranah, G. and May, B., 2000.** Microsatellite and analysis of genetic variation in sturgeon: new sturgeon primer sequences for scaphirhynchus and Acipenser. Tran's actions of the American fisheries society. Vol. 139, pp: 1380-1388.
 25. **Peakall, R. and Smouse, P.E., 2005.** Gene Alex 6. 41: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Bioinformatics. Vol. 28, No. 19, pp: 2537-2539.
 26. **Reisenbichler, R.R. and Rubin, S.P., 1999.** Genetic changes from artificial propagation of Pacific salmon affect the productivity and Brook charr: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. Journal of Fish Biology. Vol. 62, pp: 517-533.
 5. **Alarcon, J.A.; Magoulas, A. and Alvarez, M.C., 2004.** Genetic comparison of wild and cultivated European population of the Gill head sea bream. Aquaculture. Vol. 230, pp: 65-80.
 6. **Bassam, B.J.; Caetano- Anolles, G. and Gresshoff, G.M., 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Annual Biochemistry. Vol. 84, pp: 680-683.
 7. **Beacham, T.D.; Mcintosh, B. and Macconnachie, C., 2004.** Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. Journal of Fish Biology. Vol. 61, pp: 1021-1032.
 8. **Coad, B.W., 1980.** Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological Conservation. Vol. 19, No. 1, pp: 51-80.
 9. **Dewoody, J.A. and Avise, J.C., 2000.** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology. Vol. 56, pp: 461-473.
 10. **Diz, P.A. and Persa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). Aquaculture. Vol. 287, pp: 278-285.
 11. **Dorak, T., 2005.** Basic population genetics. WWW. Dorak. Info/ genetics/popgen. Html.
 12. **Fei, C.; Wei, Y. and Fu-Ling, Y., 2007.** Isolation of DNA microsatellites and preliminary genomic analysis of Mud crab (*Cirrhina molitorolla*). Zoological research. Vol. 28, No. 2, pp: 119-125.
 13. **Grassi, F.; Imazio, S.; Gomasca, S.; Citterio, S.; Aina, R.; Sgorbati, S.; Skaala, F.; Patrignani, G. and Labra, M., 2004.** Populationstructure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science. Vol. 166, pp: 1437-1441.
 14. **Hallerman, E.M., 2003.** Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. Bethesda, Maryland, American Fisheries Society. pp: 239-259.
 15. **Hassanien, H.A.; Einady, M.; Obeida, A. and Itriby, H., 2004.** Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Aquaculture Research. Vol. 35, pp: 597-593.
 16. **Herwerden, L.V.; Mc Llwin, J.; Al-Quf, H.; Al-Amry, W. and Reyes, A., 2006.**



- Martinez, O., 2011.** Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*. pp: 664: 51–67.
- 39. Yeh, F.C.; Yang, R.C. and Boyle, T., 1999.** PopGene. Version. 1.31, Microsoft, Window based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide University of Alberta and the Centre for International Forestry Research, Canada. 29 p.
- viability of supplemented populations. *ICES Journal of Marine Sciences*. Vol. 56, pp: 459-466.
- 27. Rousset, F., 2004.** Genetic structure and selection in subdivided populations Princeton: Princeton University Press. 288 p.
- 28. Ryman, N., 1991.** Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*. Vol. 39 (Supplement A), pp: 211-224.
- 29. Sambrook, J. and Russell, D.W., 2006.** The condensed protocols from Molecular cloning. Cold Spring Harbor laboratory press, pp: 705-762.
- 30. Sivasundar, A. and Biemann, C.H., 2005.** Genetic evidence of postglacial population expansion in Puget Sound rock fish (*Sebaste emphaeus*). *Marine Biotechnology*. Vol. 7, pp: 223-230.
- 31. Slatkin, M., 1993.** Isolation by distance in equilibrium and non- equilibrium population. *Evolution*. Vol. 47, pp: 264-279.
- 32. Sourinejad, I.; Kalbassi, M.R.; Pino-Querido, A.; Vera, M.; Bouza, C. and Martinez, P., 2011.** Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10, No. 26, pp: 5084-5090.
- 33. Takezaki, N. and Nei, M., 1996.** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. Vol. 144, pp: 389-399.
- 34. Thai, B.T.; Pham, T.A. and Austin, G.M., 2006.** Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*. Vol. 258, pp: 228-240.
- 35. Thorpe, J.P. and Sol-Cave, A.M., 1994.** The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta*. Vol. 23, pp: 8-18.
- 36. Tremblay, R.L. and Ackerman, J.D., 2001.** Gene flow and effective population size in *Leopantes* (Orchidaceas): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 72, pp: 47-62.
- 37. Tsoi, K.H.; Wang, Z.Y. and Chu, K.H., 2005.** Genetic divergence between two morphological similar varieties of the kurma shrimp *Penaeus japonicas*. *Marine Biology*. Vol. 147, pp: 367-379.
- 38. Vera, M.; Sourinejad, I.; Bouza, C.; Vilas, R.; Pino-Querido, A.; Kalbassi, M.R. and**



Genetic diversity of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) in the Cheshmeh Kileh and Kargan Rud Rivers using microsatellite markers

- **Saltanat Najjar Lashgari***: Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran
- **Sohrab Rezvani Gilkolaei**: Iranian Fisheries Research Organization (IFRO), P.O.Box: 14155-6116, Tehran, Iran
- **Abolghasem Kamali**: Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran
- **Mahdi Soltani**: Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 775-14515, Tehran, Iran

Received: July 2013

Accepted: August 2013

Key words: *Salmo trutta caspius*, Genetic diversity, Microsatellite

Abstract

Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) is one of the nine subspecies of brown trout (*Salmo trutta*) in the world and is one of the economically important species and endangered in the Caspian Sea. In this study, the genetic diversity of the Caspian brown trout was investigated using microsatellite method. For this purpose, 225 specimens of adult Caspian brown trout were collected from Cheshmeh Killed and Kargan Rud rivers and genomic DNA was extracted using Ammonium Acetate method. The quality and quantity of the extracted DNA was assessed using a horizontal electrophoresis in 1% agarose gel and spectrophotometry methods. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using 16 pairs SSR primers and the amplified products were vertical electrophoresis using 6% polyacrylamide gel and were stained using silver nitrate method. DNA bands were scored using Photo- Capt software and produced five polymorphic loci. The mean observed and expected heterozygosity was calculated 0.47 ± 0.09 and 0.61 ± 0.10 respectively and more loci were out of Hardy- Weinberg equilibrium ($P<0.001$). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed significant differences in genetic diversity between and within populations ($P<0.01$). So there is more than one population in studied rivers that should be considered in restructuring reserves.

