گزینش مولدین خاویاری مناسب تکثیر بر اساس شناسنامه ژنتیکی

مهتاب یارمحمدی[۱]*، رضوان‌اله کاظمی[۱]، علی حلاجیان[۱]، ایوب یوسفی جوردهی[۱]، محمد علی یزدانی ساداتی[۱]، محمد حسن زاده صابر[۱]، علی حسین‌پور زلتی[۱]

۱- مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران، ص.پ: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

چکیده

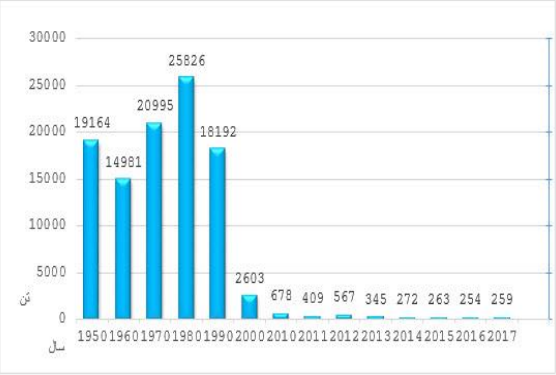
طولانی‌بودن زمان رسیدگی جنسی در تاسماهیان مهم‌ترین مانع در پرورش آنها می‌باشد. با توجه به کاهش زیاد جمعیت‌های طبیعی این ماهیان در دریای خزر، استمرار تولید و آبزی‌پروری ماهیان خاویاری نیازمند مدیریت مؤثر و کارآمد تولید بر اساس پرورش آنها می‌باشد. آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مولد به منظور برقراری و حفظ تنوع ژنتیکی مولدین پرورشی بسیار با اهمیت می‌باشد. در سال‌های اخیر، در کنار مدیریت تکثیر، مدیریت ژنتیکی گله‌های موجود در کارگاه‌های تکثیر و بازسازی ذخایر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بنابراین، لازم است قبل از هر گونه عمل جهت تکثیر مولدین پرورشی، اقدام به تهیه شناسنامه ژنتیکی و در ادامه بررسی تنوع ژنتیکی آنها شود. استفاده از نشانگر ژنتیکی میکروستلایت یکی از کارآمدترین روش‌ها جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در گونه‌های آبزی‌پروری است. پس از نمونه‌برداری از باله دمی در جمعیت مولدین پرورشی ماهیان خاویاری و قرار دادن آنها در الکل ۹۶ درصد، اقدام به استخراج DNA می‌گردد. نمونه‌های DNA با استفاده حداقل ۴ پرایمر میکروستلایت در گونه‌هایی که دارای چندشکلی بالا و الگوی توارث دیسومیک هستند، تکثیر می‌شوند. الگوی باندی به دست آمده با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده به همراه دیگر مشخصات ریخت‌شناسی برای هر مولد در بانک اطلاعاتی ثبت می‌شود. با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از آلل‌های تکثیر شده و نرم‌افزار GenAlex، مؤلفه‌های ژنتیکی جهت تعیین تنوع ژنتیکی در گله مورد مطالعه شامل هتروزیگوسیتی، تعداد آلل، تعادل هاردی-واینبرگ و شاخص تمایز جمعیتی (F_{st}) مورد بررسی قرار می‌گیرد. در صورت مناسب‌بودن تنوع ژنتیکی در گله مورد نظر و بررسی آلل‌های مولدین مناسب، می‌توان اقدام به تکثیر مولدین نمود. استفاده از این روش در توسعه پایدار آبزی‌پروری ماهیان خاویاری و کنترل آمیزش خویشاوندی، خصوصاً در برنامه‌های اصلاح‌نژادی اقتصادی آبزی‌پروری تاسماهیان بسیار مهم و حیاتی می‌باشد.

واژگان کلیدی: تاسماهیان، آبزی‌پروری، میکروستلایت، شناسنامه ژنتیکی

[۱] نویسنده مسئول: *mahtabyarmohammadi@gmail.com

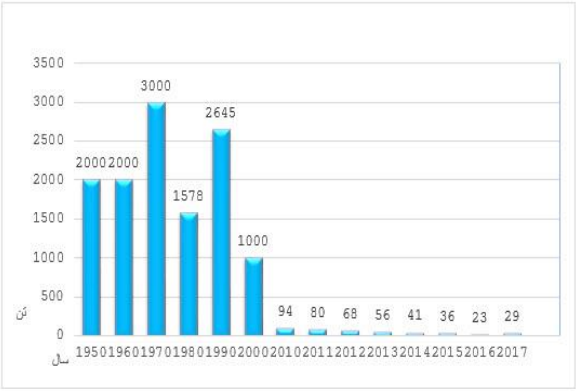
مقدمه

ماهیان خاویاری از خانواده Acipeseridae در زمره قدیمی‌ترین گروه‌های ماهیان زنده بوده که قدمت آن‌ها به بیش از ۲۵۰ میلیون سال پیش باز می‌گردد (Bemis *et al.*, 1997). شش گونه از ماهیان خاویاری به دو جنس (*Huso* و *Acipenser*) تعلق دارند که در دریای خزر و حوضه‌های آبریز آن زیست کرده، هر ساله بخش عمده‌ای از تولید خاویار طبیعی جهان را به خود اختصاص می‌دهند (Pourkazemi, 2006; Nasrollahzadeh 2010). میزان صید ماهیان خاویاری در طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰ در دریای خزر و سیاه به صورت چشمگیری کاهش پیدا کرد (Bronzi *et al.*, 2019). با استناد به آخرین آمار منتشر شده توسط سازمان خاروبار کشاورزی ملل متحد (FAO)[2] در سال ۲۰۱۹، میزان صید خانواده تاس-ماهیان در جهان از ۱۹۱۶۴ تن در سال ۱۹۵۰ به ۲۵۹ تن در سال ۲۰۱۷ کاهش یافت (تصویر ۱). بر طبق آمار همین سازمان، میزان صید ماهیان خاویاری در ایران از ۲۰۰۰ تن در سال ۱۹۵۰ به ۲۹ تن در سال ۲۰۱۷ کاهش پیدا کرد (تصویر ۲). این امر در نتیجه اثرات فعالیت‌های انسانی از جمله صید بیش از حد مولدین، وجود آلودگی-های مختلف، تخریب بستر رودخانه‌های محل تخم‌ریزی و از همه مهم‌تر طولانی بودن زمان بلوغ جنسی ماهیان خاویاری تشدید شده است (Bilard and Lecointre 1993; Birstein, 2000; Alavi *et al.*, 2012). بنابراین، تمامی تاس‌ماهیان موجود در دریایی خزر و حوضه‌های آبریز آن در فهرست گونه‌های در معرض خطر انقراض سازمان بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN)[3] قرار گرفته است (Bronzi and Rosenthal, 2014; IUCN, 2018). یکی از اقدامات مؤثر صورت پذیرفته به منظور حفظ ذخایر طبیعی در چند دهه گذشته استفاده از رویکردهای بازسازی ذخایر و تکثیر مصنوعی مولدین وحشی در کارگاه‌های تکثیر بوده است. به همین منظور، حدود ۱۳ مرکز تکثیر مصنوعی و پرورش انواع تاس‌ماهیان در کشورهای حاشیه‌ای دریای خزر، هر ساله ده میلیون قطعه انواع بچه‌ماهی از مولدین تولید و به دریا رهاسازی می‌کردند (Pourkazemi,1996). این وضع با توجه به کاهش تعداد مولدین و همچنین نرخ بقاء پایین لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی قابلیت خود را تا حدود زیادی از دست داده است. در دهه گذشته استفاده از برنامه‌های تکثیر حمایتی و در شرایط اسارت به منظور حفظ و بهبود جمعیت‌های در معرض خطر توسعه زیادی پیدا کرده است. در برنامه‌های تکثیر حمایتی، مولدین وحشی در شرایط اسارت تکثیر و نتاج حاصل از آن‌ها در شرایط بسته، پرورش می‌یابند و سپس به جمعیت‌های مورد نیاز تزریق می‌شوند. اما در برنامه‌های تکثیر در اسارت، ذخیره مولدین در نتیجه پرورش ماهیان وحشی در شرایط اسارت ایجاد شده و نتاج حاصل از آن‌ها نیز در صورت نیاز به طبیعت رهاسازی می‌گردند (McLean *et al.*, 2007).



تصویر۱: میزان صید ماهیان خاویاری در جهان در طی سال‌های ۱۹۵۰-۲۰۱۷ (FAO, 2019).

[2] Food and Agriculture Organization (FAO)
[3] International Union for Conservation of Nature (IUCN)



تصویر ۲: میزان صید ماهیان خاویاری ایران در طی سال‌های ۱۹۵۰-۲۰۱۹ (FAO, 2019)

با توجه به مسائل ذکر شده، تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری در شرایط اسارت به‌عنوان یکی از قوی‌ترین روش‌های بالقوه به‌منظور حفظ آن‌ها از معرض خطر انقراض و همچنین روشی برای کاهش فشار صیادی بر ذخایر طبیعی آن‌ها محسوب می‌شود (Kotenev et al., 2001). از اولین زمان شروع پرورش ماهیان خاویاری در مزارع (۱۹۸۴ در شوروی سابق) تاکنون بیش از ۳۲ کشور در زمینه تولید تاس‌ماهیان پرورشی در جهان فعالیت کرده که کشورهای روسیه، چین و ایتالیا به ترتیب با ۳۵۰، ۱۳۵ و ۵۰ مزرعه فعال در رتبه‌های نخست جهان قرار دارند (Bronzi and Resenthal., 2014). در ایران نیز پرورش ماهیان خاویاری سابقه کوتاهی دارد و از سال ۱۳۸۶ خورشیدی فعالیت خود را با تولید ۲۰ تن ماهی آغاز کرد (علیزاده، ۱۳۸۶). تعداد مزارع خاویاری تا پایان سال ۱۳۹۱ در حدود ۲۰ مزرعه بود که بیشتر آنها در مقیاس کوچک و تعداد اندکی نیز حداکثر ۳۰ تا ۵۰ تن ظرفیت تولید داشتند. از سال ۱۳۹۲ تاکنون تعداد مزارع به ۱۱۶ مزرعه در نقاط مختلف کشور رسیده است که بزرگترین آن مزرعه شرکت قره‌برون ساری می‌باشد که ظرفیت تولید ۲۰۰۰ تن گوشت و ۳۰ تن خاویار را در سال داراست (عبدالحی و کرمی‌راد، ۱۳۹۷). در حال حاضر به دلیل کاهش شدید مولدین وحشی که تکافوی تکثیر مصنوعی و حفظ نسل این ماهیان را نمی‌کند، شیلات ایران و دستگاه‌های متولی این امر به استفاده از تاسماهیان پرورشی جهت تکثیر و ازدیاد نسل این ماهیان روی آورده‌اند. تداوم صنعت پرورش ماهیان خاویاری در ایران مستلزم تولید و تحویل بچه‌تاسماهی سالم از نظر ژنتیکی و دارای رشد مناسب و ضریب بازماندگی بالا از مولدین پرورشی است که توسط دستگاه‌های ذیربط در سال‌های آینده تکثیر و تولید خواهند شد. طولانی‌بودن زمان رسیدگی جنسی در تاسماهیان دریای خزر، مهمترین مانع در پرورش آنهاست. با توجه به افزایش تمایل مولدسازی ماهیان خاویاری در کشور، علی‌رغم کاهش جمعیت‌های طبیعی، موقعیت خوبی برای افزایش تولید محصولات این گروه از ماهیان وجود دارد.

اطلاعات موجود از تکثیر مصنوعی تاسماهیان در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری ایران در سال‌های اخیر حاکی از آن است که در طی این سال‌ها تعداد بسیار کمی از مولدین صید شده از دریا برای تکثیر مصنوعی مناسب بودند. در نتیجه به نظر می‌رسد نسل تاسماهیان موجود در مزارع پرورش ماهیان خاویاری، خصوصاً گونه فیل‌ماهی از تعداد معدودی مولد تولید شده باشد. از طرفی، احتمالا فیل‌ماهیانی که جهت پرورش در یک مزرعه در حال پرورش هستند، همگی بچه‌ماهیان حاصل از یک مرحله تکثیر و فرزندان والدین مشترک بوده، با هم خویشاوند تنی هستند (Anderson *et al.*, 1982). بر اساس گزارش‌های ارائه شده در سال‌های اخیر، در مزارع پرورشی تاسماهیان خصوصاً استان گیلان، اختلالات ریختی از جمله نداشتن چشم، عدم تشکیل کامل پوزه و ناهنجاری‌های دیگر بسیار شایع می‌باشد (مشاهدات شخصی، شکل ۱). از آن جایی که در شرایط پرورشی عوامل اصلی تاثیرگذار بر بهگزینی طبیعی (Natural selection) در جمعیت‌های وحشی (به عنوان مثال: رقابت غذایی، فشار صیادان، شرایط زیست محیطی و ...) وجود ندارد، بنابراین در بعضی از مولدین پرورشی ضمن مشاهده ناهنجاری‌های تکاملی، بروز پدیده آمیزش خویشاوندی نیز سبب افزایش درصد ناهنجاری در بچه-

ماهیان تولیدی و در نتیجه کاهش بازده تولید خواهد شد (Alavi et al., 2008).

شکل ۱: بچه‌ماهیان فاقد چشم و عدم تشکیل کامل پوزه

با توجه به گزارش بروز ناهنجاری‌های ریختی در بچه تاس‌ماهیان تولید شده در بعضی از مزارع تولیدی و نیز اهمیت موضوع، لزوم برنامه‌ریزی علمی و همه جانبه برای تولید بچه‌ماهی پرورشی با کیفیت دارای اهمیت زیادی است. برای نیل به این مهم، گام اول انتخاب مولدین مناسب جهت تکثیر مصنوعی می‌باشد. بنابراین، ضرورت دارد که نسبت به شناسایی مولدین موجود در کارگاه‌های تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری در بخش‌های دولتی و خصوصی اقدامات لازم به عمل آید. با توجه به جمعیت موجود مولدین پرورشی و احتمال خویشاوندی نزدیک آن‌ها و در نتیجه تقویت احتمال بروز درون-آمیزی (Inbreeding) و آمیزش خویشاوندی که همیشه به شکل بالقوه خودنمایی می‌کند (Angers *et al.*, 1995)، ضرورت دارد در برنامه‌های تکثیر مصنوعی تاسماهیان پرورشی به آن توجه و دقت بیشتری شود تا از کاهش تنوع ژنتیکی و بروز مشکلات ناشی از آن در نسل‌های بعد جلوگیری گردد (Billard and Lecointre, 2000). برای شناخت ویژگی‌های ژنتیکی گونه‌های آبزی-پروری در برنامه‌های مرتبط با حفظ و بازسازی ذخایر و همچنین حفظ خزانه‌های ژنی ماهیان بومی، آگاهی و اطلاع از ساختار ژنتیکی مولدین و الگوهای جفت شدن آنها برای حفظ تنوع ژنتیکی در نسل بعدی اهمیت زیادی دارد که برای این منظور می‌توان از نشانگرهای مولکولی مناسب استفاده کرد (Doukakis *et al.*,. 1999). در میان نشانگرهای مختلف مولکولی، استفاده از آنالیز DNA به روش میکروستلایت، کارآمدترین روش جهت مطالعه تنوع ژنتیکی مولدین می‌باشد (Fopp-Bayat *et al.*, 2004; Fopp-Bayat, 2007). ریزماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSRs) یا میکروستلایت‌ها، قطعاتی کوتاه و تکرار شونده از بازهایی هستند که به صورت گسترده در طول ژنوم گونه‌های ماهی پراکنش دارند. ریزماهواره‌ها که در گروه نشانگرهای مبتنی بر DNA طبقه‌بندی می‌شوند، با داشتن ویژگی‌هایی از قبیل چندشکلی بالا، الگو توارث هم‌بارزی و فراوانی در طول ژنوم به راحتی قابل تجزیه و تحلیل بوده، به نسبت دیگر نشانگرها دارای برتری هستند (Chistiacov *et al.*,. 2005; Fopp-Bayat, 2009). با توجه به مطالعات وسیع انجام شده مشخص گردید که میکروستلایت‌ها در بیشتر موجودات وجود داشته و در همه آنها نیز از تنوع ژنتیکی بسیار بالایی برخوردار هستند. در کنار دیگر مؤلفه‌های مدیریتی تکثیر در شرایط پرورشی، مدیریت ژنتیکی تکثیر با استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی نیز برای بهبود کیفیت و کمیت مولدین و پیش‌مولدین خاویاری دارای اهمیت زیادی می‌باشد.

مواد و روش ها

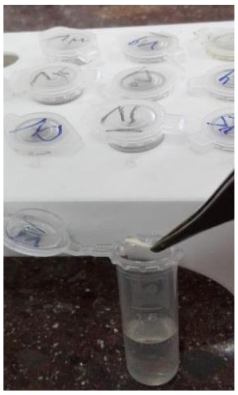
برای تهیه شناسنامه ژنتیکی در یک مزرعه پرورش ماهیان خاویاری نخست باید نسبت به شناسایی مولدینی که برای تولید نسل آینده مورد استفاده قرار می‌گیرند، اقدام گردد (شکل ۲). پس از شناسایی مولدین مناسب جهت تکثیر و تولید نسل باید اقداماتی از جمله تگ‌گذاری مولدین با استفاده از تگ‌های PIT[4]، ثبت اطلاعات زیست‌سنجی شامل طول و وزن کل، تعیین جنسیت و مرحله رسیدگی جنسی به روش لاپاراسکوپی و سونوگرافی (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۸) و نمونه‌برداری از باله دمی ماهیان مورد نظر انجام و یافته‌ها به صورت کد روی ویال‌های نمونه‌برداری نوشته شود (شکل ۳). هر ویال باید شامل ۲ تا ۳ گرم بافت باله دمی جدا شده از هر مولد با استفاده از قیچی و الکل اتلیک ۹۶ درصد باشد. نمونه‌ها تا شروع آزمایش در آزمایشگاه نگهداری خواهند شد. هر کد در سیستم الکترونیک بانک اطلاعاتی کارگاه پرورشی به همراه دیگر اطلاعات ثبت شده برای هر مولد به منظور بهره‌برداری آتی و شناسنامه‌ای مولدین ثبت خواهد گردید. دستگاه خوانش (اسکنر) تگ‌های PIT که قابلیت اتصال به رایانه را دارند، کد را می‌خوانند. در بانک اطلاعاتی کارگاه، کد خوانش شده توسط اسکنر، مشخصات ماهی مورد نظر را نشان خواهد داد. بانک اطلاعاتی برای هر ماهی شامل: گونه، رده سنی، محل صید مولد طبیعی/ والدین اصلی، جنسیت، ژنوتیپ، محل نگهداری فعلی (شماره استخر)، وزن بدن، وضعیت تولیدمثلی و دیگر توضیحات (در صورت دسترسی)، خواهد بود (FAO, 2019).

شکل ۲: شناسایی و انتخاب مولدین از طرق لاپاراسکوپی و تگ‌گذاری

[4] PIT (Passive Integrated Transponder) Tags

در مرحله بعدی باید به استخراج DNA و شناسایی ژنوتیپ ماهیان مورد نظر پرداخت. این مرحله در آزمایشگاه‌های تخصصی ژنتیک و توسط کارشناسان متخصص و به شرح زیر انجام خواهد شد:

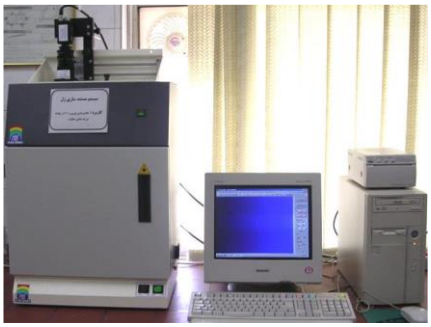
استخراج DNA با استفاده از روش نمکی استات آمونیوم انجام می‌شود. این روش شامل گوارش فیزیکی نمونه بافت باله دمی با استفاده از قیچی یا هموژنایزر می‌باشد. سپس با اضافه کردن محلول پروتئیناز K و انکوباسیون آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۲ ساعت، لیز سلولی از طریق گوارش شیمیایی ادامه می‌یابد. در ادامه با استفاده از محلول استات‌آمونیوم ۷/۵ مولار، نسبت به رسوب مواد غیر قابل گوارش در واکنش اقدام می‌شود. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ و سپس محلول رویی به ویال جدید منتقل می‌گردد. با افزودن اتانول خالص سرد به محلول رویی، DNA محلول به صورت کلاف DNA رسوب می‌کند. آنگاه کلاف DNA نیز به مدت ۵ دقیقه و سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، رسوب می‌کند. پس از شستشو و خشک شدن رسوب به دست آمده در معرض هوا، با استفاده از آب مقطر خالص، رسوب به شکل محلول درآمده، جهت انجام آزمایش‌های مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (یارمحمدی و همکاران، ۱۳۹۷). در ادامه نیاز به تایید کیفیت DNA استخراج شده می‌باشد. عمل تایید کیفیت DNA را می‌توان به دو روش الکتروفورزی (Sambrook *et al.*, 1989) روی ژل آگارز یک درصد و مشاهده روی دستگاه ترانس لومیناتور و یا اسپکتروفتومتر انجام داد.

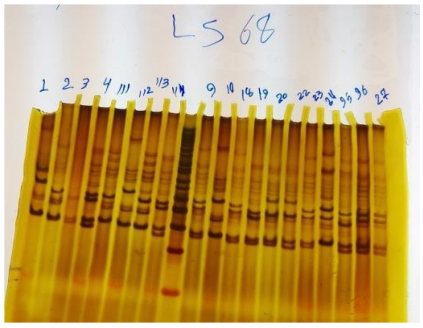


شکل ۳: نمونه برداری از بافت باله دمی و انتقال به ویال حاوی ۹۶ درصد

برای تکثیر ژن‌های هدف در نمونه‌های DNA تخلیص شده، از DNA استخراجی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم و مواد مورد نیاز در واکنش PCR و پرایمرهای میکروستلایت بر اساس دستورالعمل‌های مربوطه استفاده می‌گردد. برای مشاهده نتایج واکنش تکثیر (PCR) از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد و در پی آن از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده می‌شود. بعد از رنگ‌آمیزی و مشخص شدن باندها روی ژل الکتروفورز، تصویر ژل‌های تهیه شده توسط دستگاه مستندساز ژل ثبت می‌گردد (شکل ۴). پس از اندازه‌گیری باندها با استفاده از نرم‌افزار BioCapt، الگوی باندی هر نمونه در مقایسه با مارکر روی کاغذ شطرنجی رسم و اندازه باندها به صورت دقیقی ثبت خواهد شد. نتایج امتیازدهی باندها شامل یک تا ۲ آلل در هر جایگاه (حداقل ۴ جایگاه/پرایمر) مطالعه شده بوده، برای هر ماهی

اختصاصی و همان ژنوتیپ یا فرمول ژنتیکی مولد مورد نظر می‌باشد. با بهره‌گیری از تجارب متخصصین این رشته می‌توان مشخص نمود که کدام جفت/جفت‌ها از نظر ژنتیکی، مناسب لقاح می‌باشند. سپس باندهای حاصل در کل نمونه‌ها از اندازه کوچک به بزرگ شماره‌دهی و آلل-های حاصل کدگذاری می‌شوند. این شماره‌ها و آلل‌ها کدگذاری شده برای آنالیز و تجزیه و تحلیل ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بر اساس این آنالیزها لازم است که نخست ژنوتیپ هر ماهی به صورت فردی و در ادامه میزان تنوع ژنتیکی به عنوان لازمه بقای یک جمعیت، در داخل گله مولدین مشخص شود. آنالیزهای ژنتیکی که تنوع ژنتیکی گله مولدین و پیش مولدین ماهیان مورد نظر را نشان می‌دهند شامل موارد ذیل می‌باشد (Takezaki and Nei, 1996; Lucentini *et al.*, 2006; Wright, 1978).





شکل ۴: الکتروفورز و رنگ آمیزی محصول PCR و ثبت داده‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل

هتروزیگوسیتی و تعداد آلل: هتروزیگوسیتی شاخص مناسبی برای بررسی تاریخچه و تنوع یک جمعیت می-باشد. به عنوان یک اصل، مقادیر هتروزیگوسیتی در محدوده ۰/۳ و ۰/۸ اعداد مناسبی برای تنوع یک جمعیت هستند. اگر مقادیر به دست آمده برای هتروزیگوسیتی به ترتیب بالاتر یا پایین‌تر از حد متوسط باشد، تنوع ژنتیکی در آن جمعیت افزایش و یا کاهش یافته است.

تعادل هاردی-واینبرگ: در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت باید جمعیت‌ها با آزمون هاردی-واینبرگ در تعادل باشند. این حالت زمانی درست خواهد بود که مقدار عددی این شاخص به صفر نزدیک‌تر باشد. در صورت صفر بودن این مقدار، جمعیت در وضعیت تعادل خواهد بود. اما مقادیر بالاتر از صفر نشان‌دهنده کاهش افراد هتروزیگوت و مقادیر منفی به معنی افزایش تعداد افراد هتروزیگوت در جمعیت خواهد بود. انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ در جمعیت‌های پرورشی می‌تواند در نتیجه کوچک‌شدن جمعیت، افزایش درون‌آمیزی و انتخاب برنامه‌های نامناسب تکثیر باشد.

شاخص تمایز جمعیتی (F_{st}): ضریب تمایز F_{st} به عنوان یکی از شاخص‌های مهم به جهت تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود (Ballox and Moulin, 2002). برای تفسیر F_{st} باید دقت کرد که اگر مقدار آن در دامنه ۰/۰۵-۰ باشد، بیانگر تمایز ژنتیکی پایین ولی اگر در دامنه بین ۰/۱۵ – ۰/۰۵ و ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ باشد به

ترتیب نشان دهنده تمایز متوسط و بالای آن جمعیت خواهد بود. مقادیر بالاتر از ۰/۲۵ نیز تنوع بسیار بالایی را در یک جمعیت نشان می‌دهد. پایین بودن مقدار F_{st} در یک جمعیت بیانگر پایین بودن هتروزیگوسیتی (چند شکلی) آن خواهد بود. به هنگام صفر بودن این مقدار، رابطه آمیزشی دو جمعیت به صورت آزاد و مقدار یک به معنای عدم وجود تنوع آللی در بین جمیعت‌ها خواهد بود.

نتایج و بحث

کاهش ذخایر و جمعیت‌های طبیعی، تخریب زیستگاه‌ها و در نتیجه محدودیت دسترسی به منابع خاویار طبیعی موجب شده است تا صنعت آبزی‌پروری ماهیان به عنوان یک منبع جایگزین در تولید خاویار و همچنین به عنوان ابزار و وسیله‌ای به منظور بازسازی ذخایر جمعیت‌های وحشی مد نظر قرار گیرد (یلقی و همکاران.، ۱۳۹۴). گله-های مولد از دو جنبه دارای اهمیت خواهند بود: نخست در مباحث مرتبط با آبزی‌پروری و تولید خاویار و گوشت و در جنبه دوم مباحث مرتبط با بازسازی ذخایر که در صورت لزوم می‌توان از آن‌ها به منظور تولید بچه‌ماهیان رهسپار شونده به دریا استفاده کرد. باید توجه داشت که این مولدین در نتیجه صید از دریا و در نتیجه قرار گرفتن در شرایط اسارت پرورش یافته‌اند و برای اقدامات بعدی نیز در شرایط اسارت تکثیر و پرورش خواهند یافت. بنابراین با در نظر گرفتن اندازه کوچک جمعیت آن‌ها، حفظ سطوح تنوع ژنتیکی در حد اعتدال به منظور به حداقل رساندن آمیزش‌های خویشاوندی در مراحل بعدی، امری بسیار مهم تلقی می‌گردد (Schreier *et al.*,. 2015). فعالیت‌های آبزی‌پروری به دلیل استفاده از لقاح افراد خویشاوند و یا تکثیر تعداد معدودی مولد، سبب کاهش تنوع ژنتیکی در ذخایر پرورشی خواهد شد. لقاح خویشاوندی سبب کاهش بازماندگی و نرخ رشد و صفات رشدی می‌گردد (Norris *et al.*, 1999). برنامه‌های اصلاح‌نژادی که با توجه به بهگزینی افراد براساس اطلاعات ظاهری و ریخت‌شناسی استوار است، معمولاً جهت مدیریت بهگزینی کافی نمی‌باشد. زیرا در این گونه از برنامه‌های اصلاح نژادی هنوز مشخص نیست که آیا تنوع ژنتیکی اولیه در خزانه ژنتیکی مولدین حفظ شده، یا از طریق استفاده از مولدین جدید افزایش یافته و یا به دلیل بهگزینی شدید کاهش یافته است. نکته کلیدی برای حل چنین مشکلی مطالعه ژنتیکی در مولدین مورد استفاده می‌باشد. برای این منظور، نشانگرهای ژنتیکی ابزاری مهم و قدرتمند جهت بررسی تنوع ژنتیکی ذخیره مولدین، ارتباط والدین و عملکرد آنها در برنامه‌های اصلاح نژادی است.

جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در سویه‌های پرورشی معمولاً از آنالیز DNA میکروستلایت استفاده می‌گردد. نشانگرهای میکروستلایت در مطالعات مرتبط با ارزیابی اختلاف‌های ژنتیکی در سطح افراد و جمعیت‌های در معرض خطر انقراض و همچنین به منظور تعیین ساختارهای جمعیت گونه‌های وحشی و پرورشی در ماهیان به صورت گسترده-ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Liu *et al.*, 2009). این نشانگرها به منظور تعیین دقت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی و همچنین تهیه نقشه‌های ژنومی در ماهیان با سایر نشانگرها مقایسه شدند که نتیجه آن با بازدهی بالاتر نشانگرهای میکروستلایت همراه بود (O'Connell and Wright, 2005). علی‌رغم توسعه نشانگرهای جدید، نشانگرهای میکروستلایت در مطالعه و بررسی ساختار ژنتیکی محصولات پرورشی هنوز هم نقش چشم‌گیری را دارند، به صورتی‌که در طی سال‌های ۲۰۱۲ الی ۲۰۱۵ به تعداد ۹۳۳ تحقیق در این زمینه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ثبت شده است. استفاده از آنالیز نشانگر DNA میکروستلایت جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ماهیان خاویاری به منظور مدیریت تکثیر گزارش شده است (Zhu *et al.*, 2002; Fopp-Bayat *et al.*, 2010). مطالعات انجام شده در صورتی که تاسماهیان تولید شده از مولدین وحشی در شرایط اسارت، دارای آلل‌های یکسان و مشترک با والدین خود باشند، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی حفظ شده در جمعیت فعلی می‌باشد که قابلیت انتقال به نسل بعدی خود را خواهد داشت (Zhue *et al.*, 2002). در مطالعه تنوع جمعیت یک ذخیره از مولدین تاسماهیان پرورشی،

سه معیار هتروزیگوسیتی و تعداد آلل، تعادل هاردی-واینبرگ و شاخص تمایز جمعیتی (F_{st}) در گله مورد نظر مورد بررسی قرار می‌گیرد (Kazmarczyk and Fobb-Bayat, 2015). معمولاً در صورت پایین‌بودن تنوع ژنتیکی باید از تلاقی افراد جلوگیری نمود، زیرا منتهی به کاهش قابل توجه تنوع ژنتیکی در نتاج حاصل و نهایتا بازماندگی پایین در آنها خواهد شد. در مطالعه انجام شده روی جمعیت مولدین پرورش نسل F1 گونه فیل‌ماهی در مجتمع بازسازی ذخایر شهید بهشتی که همگی نسل اول مولدین پرورش از والدین وحشی دریای خزر بودند، نشان داد که مطالعه ژنتیکی ابزاری قوی را جهت پایش جنبه‌های مختلف تولید و مدیریت فراهم می‌آورد (یارمحمدی و همکاران، ۱۳۹۷).

توصیه ترویجی

اگر پرورش‌دهنده ماهیان خاویاری قصد مولدسازی و تکثیر یک گله پیش مولد را داشته باشد، باید قبل از هر گونه اقدام جهت مولدسازی و مدیریت پرورش، نیاز مدیریت ژنتیکی گله مورد نظر را انجام دهد. برای این منظور لازم است که در ابتدا گله ماهیان خود را از دیدگاه تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار دهد. برای داشتن گله‌های مولد خاویار مناسب و با کیفیت و نیز لارو و بچه‌ماهی سالم با تنوع ژنی بالا باید از ماهیانی برای تکثیر استفاده کند که دست کم به ترتیب از هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی واینبرگ و شاخص تمایز جمعیتی به ترتیب بالای ۰/۶، صفر یا بسیار نزدیک به آن و ۰/۲۵ برخوردار باشد.

منابع

کاظمی، ر. ، یارمحمدی، م.، حلاجیان، ع. ۱۳۹۵. مروری بر روش های متداول تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی تاس ماهیان (Acipenseridae) : مزایا و معایب، نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی، دوره چهارم، شماره دوم، ۱۲۸-۱۰۷.

یارمحمدی، م. ۱۳۹۷. تهیه شناسنامه ژنتیکی مولدین و پیش مولدین فیل ماهیان پرورشی مراکز تکثیر و پرورش استان گیلان. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ۸۸ صفحه.

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., and Linhart, O. 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon :(I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22(3), 695-717.

Anderson, S., De-Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F. and Young, I.G. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: Conserved features of the mammalian mitochondrial genome *J. Mol. Biol*. 156: 683-717.

Angers, B., Bernatchez, L., Angers, A., Desgroseilles, L. 1995. Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. Jornal of Fish Biology.47. (SupplementA). 177-185.

Balloux F, and Lugon-Moulin N. 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.

Bemis W.E., Findies E.K. and Grande L. 1997. An overview of Acipenseriforms. Environmental Biology of Fishes, *48*(1-4), 25-71.

Billard, R., and Lecointre, G. 2000. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, *10*(4), 355-392.

Birstein V.J. 1993. Sturgeons and Paddlefishes - Threatened Fishes in Need of Conservation. Conservation Biology, *7*, 773-787.

Bronzi, P., and Rosenthal, H. 2014. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: a global market overview. Journal of Applied Ichthyology, *30*(6), 1536-1546.

IUCN, S. 2018. Amphibian Specialist Group 2015. Lithobates catesbeianus. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e. T58565A53969770.

Bronzi, P., Chebanov, M., Michaels, J. T., Wei, Q., Rosenthal, H., and Gessner, J. 2019. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. Journal of Applied Ichthyology, 35(1), 257-266.

Chistiakov, D. A., Hellemans, B., and Volckaert, F. A. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. Aquaculture, *255*(1-4), 1-29.

Doukakis, P., Birstein, V. J., Ruban, G. I., and DeSalle, R. 1999. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. Molecular Ecology, *8*, S117-S127.

FAO, 2019. Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production 1950-2017 (Fishstat J). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 2019.

Fopp-Bayat, D., and Furgała-Selezniow, G. 2010. Application of microsatellite DNA variation in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) cultured in a Polish fish farm. *Polish Journal of Natural Sciences*, *25*(2), 173-181.

Fopp-Bayat, D. 2007. Verification of meiotic gynogenesis in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) using microsatellite DNA and cytogenetical markers. Journal of Fish Biology, 71, pp.478-485.

Fopp-Bayat, D. 2009. Application of DNA finger print analysis for identification of mixed groups of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*). Pol. J. Natur. Sci, *24*, 169-176.

Kaczmarczyk, D. and FoppBayat, D. 2013. Assemblage of spawning pairs based on their individual genetic profiles–as tool for maintaining genetic variation within sturgeon populations. Aquaculture Research, 44(4), pp.677-682.

Kotenev, B.N., Burtsev, I.A., Nokolaev, A.I. and Dergalyova, J.T. 2001. The strategy of sturgeons preservation.*Fish Farm.Fish*. 1:13.

Liu, F., Xia, J. H., Bai, Z. Y., Fu, J. J., Li, J. L., and Yue, G. H. (2009). High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, *297*(1-4), 51-56.

Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Natali, M., and Panara, F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius L.*). *Fisheries Research*, *80* (2-3), 251-262.

McLean, J.E., Seamons, T.R., Dauer, M.B., Bentzen, P., and Quinn, T.P. 2007. Variation in reproductive success and effective number of breeders in a hatchery population of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*): examination by microsatellite-based parentage analysis. Conserv. Genet. 9, 295–304.

Nasrollahzadeh, A. 2010. Caspian Sea and its Ecological Challenges. *Caspian Journal of Environmental Sciences, 8*(1), 97-104.

Norris, A.T., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild

Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture, 180 (3-4), 247-264.

O'Connell, M. and Wright, J.M. 2005. Microsatellite DNA in fishes. Reviews in fish Biology and Fisheries. Vol.7, pp.331-363.

Pourkazemi, M. 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 12-16.

Pourkazemi, M. 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea (Doctoral dissertation, University of Wales Swansea).

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Schreier, A., Stephenson, S., Rust, P., and Young, S. 2015. The case of the endangered Kootenai River white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) highlights the importance of post-release genetic monitoring in captive and supportive breeding programs. *Biological Conservation*, *192*, 74-81.

Takezaki, N. and Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA, Genetics, 144, 389-399.

Wright, S. 1978. The relation of livestock breeding to theories of evolution. *Journal of Animal Science*, *46*(5), pp.1192-1200.

Zhu, B., Zhou, F., Cao, H., Shao, Z., Zhao, N., May, B., & Chang, J. 2002. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Journal of Applied Ichthyology*, *18*(4-6), 301-306.