بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده منابع طبیعی

تنوع ژنتیکی گله‌های پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان

ابوالفتح علیپور

استاد راهنما

دکتر سالار درافشان

۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده منابع طبیعی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان آقای ابوالفتح علیپور

تحت عنوان

تنوع ژنتیکی گله‌های پرورشی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره

در تاریخ ۱۳۹۰/۰۹/۱۲ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهائی قرار گرفت.

۱ -استاد راهنمای پایان نامه	دکتر سالار درافشان
۲ -استاد مشاور پایان نامه	مهندس احمد قاسمی
۳ -استاد داور	دکتر یزدان کیوانی
٤ -استاد داور	دکتر منصوره ملکیان
٥ -سرپرست تحصیلات تکمیلی	دکتر محمدرضا وهابی

تشکر و قدردانی

اعتراف می‌کنم که نه زبان شکر تو را دارم و و نه توان تشکر از بندگان تو، و اما بر حسب وظیفه از

- جناب آقای دکتر سالار درافشان که در تمامی مراحل اجرای پایان‌نامه از هیچ مساعدتی دریغ ننموده و بر من منت نهاده و راهنمایی پایان نامه را بر عهده داشته‌اند.
- جناب آقای مهندس قاسمی مشاور محترم پایان‌نامه و جناب آقای دکتر محبوبی ریاست محترم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان.
- جناب آقای دکترکیوانی و سرکار خانم دکتر ملکیان که زحمت بازخوانی و داوری پایان نامه بر عهده ایشان بود.

خاضعانه سپاسگزارم.

و در پایان از پدر، مادر، عزیزم و همه فرشتگانی که بالهای محبت خود را گسترانیدند و با تحمل دشواری‌ها، سبب شدند تا در کمال آسودگی خیال و فراغت بال، شوق آموختن در من زنده بماند صمیمانه سپاسگزارم و این نیست جز جلوه‌ای از لطف و رحمت پرودگاری که از ادای شکر حتی یک نعمت او ناتوانم.

کلیه حقوق مادی مرتبت بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع
این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

«اثری» کوچک است، خیلی کوچک و شاید هیچ!
اما به یاد عهد قدیم و رسم ادب
تقدیم می‌شود به:

دو وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...
موهایشان سپید شد تا ما رو سفید شویم...

پدرانمان

مادرانمان

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب.....هشت
فهرست اشکال.....یازده
فهرست جداول.....دوازده
چکیده.....۱
فصل اول: مقدمه
مقدمه.....۲
فصل دوم: کلیات و مرور منابع
۲-۱معرفی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان. ۵
۲-۲ تولید قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در ایران.....٦
۲-۳ مدیریت ژنتیکی ذخایر مولدین.....٦
۲-٤ تنوع ژنتیکی.....۷
۲-٤-۱ ژنتیک جمعیت.....۷
۲-٤-۲ ضرورت بررسی تنوع ژنتیکی.....۷
۲-٤-۳ معیارهای سنجش تنوع مولکولی در سطح فرد یا جمعیت..... ۷
۲-۵ انواع نشانگرها.....۷
۲-۵-۱ نشانگرهای مورفولوژیکی.....۷
۲-۵-۲ نشانگرهای سیتوژنتیکی.....۷
۲-۵-۳ نشانگرهای بیوشیمیایی.....۸
۲-۵-۴ نشانگرهای مولکولی.....۸
۲-۵-٤-۱انواع نشانگرهای مولکولی.....۹
۲-۶ ریزماهواره‌ها.....۱۰
۲-۶-۱ انواع ریزماهواره‌ها.....۱۰
۲-٦-۲مزایای ریزماهواره‌ها.....۱۱
۲-٦-۳ معایب ریزماهواره‌ها.....۱۱
۲-٦-٤ تکامل و پیدایش ریزماهواره‌ها ۱۱

۲-۷ واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز..... ۱۲
۲-۸ الکتروفورز..... ۱۳
۲-۹ تعادل هاردی- واینبرگ..... ۱٤
۲-۹-۱ عوامل برهم زننده تعادل..... ۱۴
۲-۹-۱-۱ جهش..... ۱۴
۲-۹-۱-۲ رانش ژنتیکی..... ۱۵
۲-۹-۱-۳ جریان ژنی..... ۱۵
۲-۹-۱-۴ گزینش ۱۶
۲-۱۰ چند شکلی..... ۱۶
۲-۱۱ هتروزایگوسیتی..... ۱۶
۲-۱۱-۱ هتروزایگوسیتی مشاهده شده ۱۷
۲-۱۱-۲ هتروزایگوسیتی مورد انتظار..... ۱۷
۲-۱۱-۳ هتروزایگوسیتی معادل..... ۱۷
۲-۱۲ متغیرهای آماری F..... ۱۷
۲-۱۲-۱ آماره F_{IT}..... ۱۷
۲-۱۲-۲ آماره F_{IS}..... ۱۸
۲-۱۲-۳ آماره F_{ST}..... ۱۸
۲-۱۳ همخونی و تبعات آن بر جمعیت..... ۱۸
۲-۱۳-۲ تأثیر اندازه جمعیت بر همخونی و پیشامد ژنتیکی..... ۱۹
۲-۱۴ فاصله ژنتیکی و همانندی ژنتیکی..... ۲۰
۲-۱۵ تجزیه خوشه‌ای ۲۰
۲-۱۶ شاخص شانون ۲۱
۲-۱۷ مروری بر مطالعات..... ۲۲
فصل سوم: مواد وروش‌ها
۳-۱جمعیت‌های پرورشی نمونه‌برداری شده..... ۲۷
۳-۲ تثبیت و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه..... ۲۷
۳-۳ محل انجام تحقیق..... ۲۷
۳-٤ استخراج DNA..... ۲۷
۳-٤-۱ تجهیزات ۲۸
۳-۴-۲ استخراج DNA به روش استات آمونیوم..... ۲۸
۳-٤-۳ ارزیابی کیفی DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز..... ۲۹
۳-۵ واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)..... ۳۰
۳-۵-۱ بهینه‌سازی شرایط PCR..... ۳۰

۳-۵-۲ انجام واکنش PCR ۳۱
۳-٦ الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ ۳۲
۳-٦-۱ طرز تهیه ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ از استوک ۳۰٪ ۳۲
۳-٦-۲ رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره ۳۳
۳-۷ تجزیه و تحلیل آماری ۳۳
فصل چهارم: نتایج
٤-۱ نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۳٤
٤-۲ نتایج حاصل از PCR ۳٤
۴-۲-۱ جایگاه OMY77 ..... ۳۵
۴-۲-۲ جایگاه OMM1332 ..... ۳۶
۴-۲-۳ جایگاه OMY325 ..... ۳۷
۴-۲-۴ جایگاه OMM1329 ..... ۳۸
۴-۳ تعداد آلل واقعی (N_a) و مؤثر(N_e) ۴۳
۴-۴ تنوع ژنتیکی ۴۳
۴-۵ شاخص شانون ۴۳
۴-۶ تعادل هاردی- واینبرگ ۴۴
۴-۷ فاصله ژنتیکی D و همانندی ژنتیکی I ۴۷
۴-۸ تنگنای ژنتیکی ۴۷
۴-۹ دندروگرام شجره‌ای ۴۸
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری
۵-۱ بحث و نتیجه‌گیری ۴۹
۵-۲ پیشنهادها ۵۵
منابع ۵۶
چکیده انگلیسی

فهرست اشکال

شکل ۲-۱ شمای کلی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....۱۳
شکل ۲-۲ ترکیب فراوانی هتروزیگوت و هموزیگوت تحت موازنه هاردی- واینبرگ.....۱۷
شکل۴-۱ محصول PCR و آرایش باندی DNA ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از آغازگر OMY77 ..... ۳۴
شکل۴-۲ محصول PCR و آرایش باندی DNA ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از آغازگر OMM1332.....۳۵
شکل ٤-۳ محصول PCR و آرایش باندی DNA ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از آغازگر OMY325.....۳٦
شکل ٤-٤ محصول PCR و آرایش باندی DNA ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از آغازگر OMM1329.....۳۷
شکل ۴-۵ توزیع و تنوع واریانس تحت معیار F_{ST}.....۴۵
شکل ۴-۶ نمودار شجره‌ای نمونه‌های قزل‌آلای‌رنگین‌کمان پرورشی (Nei, ۱۹۷۲).....۴۷
شکل ۴-۷ نمودار شجره‌ای نمونه‌های قزل‌آلای‌رنگین‌کمان پرورشی (Nei, ۱۹۷۸) ۴۷

فهرست جداول

جدول۳-۱ آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق..... ۲۹

جدول۳-۲ نوع ومقدار مواد استفاده شده در واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز..... ۳۰

جدول ۳-۳ برنامه‌های استاندارد اجرا شده برای واکنش ریزماهواره..... ۳۰

جدول ٤-۱ نام جایگاه، محدوده باندی، دمای اتصال و تعداد آلل مشاهده شده قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ۳۸

جدول ٤-۲ آلل‌ها و اندازه‌های آن بر حسب جفت باز در جایگاه OMY77 و فراوانی آللی در جمعیت‌های مختلف..... ۳۹

جدول ٤-۳ آلل‌ها و اندازه‌های آن بر حسب جفت باز در جایگاهOMM1332 و فراوانی آللی در جمعیت‌های مختلف..... ٤۰

جدول ٤-٤ آلل‌ها و اندازه‌های آن بر حسب جفت باز در جایگاه OMY325 و فراوانی آللی در جمعیت‌های مختلف..... ٤۰

جدول ٤-۵ آلل‌ها و اندازه‌های آن بر حسب جفت باز در جایگاه OMM1329 و فراوانی آللی در جمعیت‌های مختلف..... ٤۱

جدول٤-٦ تعدادآلل واقعی و مؤثر، تنوع ژنتیکی و شاخص شانون چهار جایگاه مورد مطالعه در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ٤۳

جدول ٤-۷ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت‌های قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ٤٤

جدول ٤-۸ میزان شاخص تمایز (F_{ST}) در جمعیت‌های مورد بررسی..... ٤۵

جدول ٤-۹ میزان شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) در سطح چهار جایگاه مورد بررسی ۴۵

جدول ٤-۱۰ میزان همانندی میان جمعیت‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ٤٦

جدول ٤-۱۱ میزان فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ٤٦

جدول ٤-۱۲ میزان تنگنای ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان..... ٤٦

چکیده

ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) متعلق به خانواده آزادماهیان (Salmonidae) مهمترین ماهی پرورشی سردآبی در ایران است. با توجه به اهمیت مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در مدیریت و انتخاب مولدین شایسته جهت تکثیر در کارگاه‌ها، تنوع ژنتیکی گله‌های پرورشی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از روش ریزماهواره مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی ۳۰ قطعه ماهی از هر یک از گله‌های ایرانی، آمریکایی، اسپانیایی و فرانسوی از مراکز پرورش تهیه شدند. به‌منظور اجرای مطالعات مولکولی، استخراج دی.ان.ا به روش استات آمونیوم از بافت نرم باله دمی یا قسمتی از بدن انجام گرفت.کیفیت دی.ان.ا استخراج شده به‌وسیله الکتروفورز ژل ۱٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد. واکنش PCR با استفاده از چهار جفت آغازگر ریزماهواره (OMY77, OMY325, OMM1332 و OMM1329) در دمای الحاق ۵۸ -۶۲/۵ انجام شد. محصولات PCR روی ژل اکریلامید ۱۲٪ الکتروفورز و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و نتایج حاصل از آنها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex6 آنالیز شد. در مجموع تمامی آغازگرهای مورد استفاده چندشکلی بالایی نشان دادند. تعداد آلل مشاهده شده در تمامی جایگاه‌ها در گستره ۱۶-۸ عدد محاسبه شد. میانگین تعدادآلل مشاهده شده در گله ایرانی ۱۰/۷۵، آمریکایی ۱۱، اسپانیایی ۱۱/۵۰ و فرانسوی ۱۰ محاسبه شد. تعداد آلل مؤثر در تمام جایگاه‌ها در گستره ۱۱/۵۳-۵/۴۰ عدد بود. میانگین تعداد آلل مؤثر در گله ایرانی ۷/۴۳، آمریکایی ۸/۰۳ اسپانیایی ۸/۶۵ و فرانسوی ۷/۱۹ بود. به‌طور کلی دامنه باندی در جایگاه‌های OMY77, OMM1329, OMY325 و OMM1332 به ترتیب ۱۷۸-۱۰۲، ۱۵۰-۱۰۰، ۱۹۸-۱۲۲ و ۲۰۴-۱۷۲ جفت باز بود. میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده در گله ایرانی ۰/۵۹۱، آمریکایی ۰/۵۹۱، اسپانیایی ۰/۶۳۳ و فرانسوی ۰/۵۶۶ به‌دست آمد. میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار در گله ایرانی ۰/۸۶۱، آمریکایی ۰/۸۶۸، اسپانیایی ۰/۸۷۹ و فرانسوی ۰/۸۵۴ بود. نتایج مولکولی انحراف ازتعادل هاردی-واینبرگ را ۱۴ آزمون از ۱۶ آزمون مورد بررسی (جایگاه×گله)، افزایش نسبی هتروزایگوسیتی مشاهده شده به هتروزایگوسیتی مورد انتظار در جایگاه OMY325 گله ایرانی، جایگاه OMY325 گله آمریکایی، جایگاه OMY325 گله اسپانیایی و گله فرانسوی، تمایز ژنتیکی پایین بین گله‌ها (۷٪) و تنوع ژنتیکی بالای درون گله‌ها (۹۳٪) و وجود جریان ژنی قابل توجه بین چهار گله (۱۶/۰۷) را نشان داد. همچنین میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین گله‌ها به ترتیب از گستره ۰/۸۴۷-۰/۷۲۷ و ۰/۳۱۹-۰/۱۶۶ به‌دست آمد. آنالیزهای مولکولی با ارزیابی تنوع ژنتیکی مطلوب درون هر گله قادر به تفکیک مناسب گله‌ها از یکدیگر بود. ترسیم نمودار شجره‌ای در چهار گله مورد بررسی براساس فاصله ژنتیکی (۱۹۷۲، ۱۹۷۸) Nei و به روش UPGMA انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصله نمونه‌های گله‌های آمریکایی، اسپانیایی و فرانسوی در یک شاخه و نمونه های گله ایرانی در شاخه‌ای جداگانه قرار گرفت. میزان F_{ST} ۰/۰۲۳ به‌دست آمد. میزان شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) در گله‌های ایرانی، آمریکایی، اسپانیایی و فرانسوی به‌ترتیب ۰/۳۲۹، ۰/۳۳۴، ۰/۲۹۵ و ۰/۳۴۳ به‌دست آمد. میزان تنوع ژنتیکی درون گله نمونه‌های اسپانیایی از دیگر گله‌ها بیشتر بود. با توجه به جدایی گله ایرانی از دیگر گله‌ها می‌توان عنوان نمود که برای انجام برنامه تلاقی دو گله جهت هیبریدگیری، بهترین برنامه تلاقی گله ایرانی با یکی دیگر از گله‌ها است. جهت درک بهتر ساختار گله قزل‌آلای‌رنگین‌کمان به عنوان مهمترین گونه پرورشی در ایران، مطالعه تنوع جمعیتی آن با استفاده از تعداد بیشتری نشانگر ریزماهواره و همچنین دیگر نشانگرهای مولکولی در تمام گله‌های پرورشی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، *Oncorhynchus mykiss*، ریزماهواره، تنوع ژنتیکی، تمایز ژنتیکی.

فصل اول
مقدمه

ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) متعلق به خانواده آزادماهیان[1] و از راسته آزادماهی-شکلان[2] است [۱۴]. دو واریته اصلی از قزل‌آلای‌رنگین‌کمان وجود دارد. یکی از این واریته‌ها به دریا مهاجرت می-کند و قزل‌آلای پولادسر[3] نامیده می شود. واریته دیگر به طور دائم در آب شیرین زندگی می کند و خود به چندین نژاد تقسیم می شود [۷].

ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان مهتمرین گونه آزادماهیان پرورشی در آب شیرین است، طول بدن در زمان بلوغ، ۴۵-۲۵ سانتی‌متر است و حداکثر به ۷۰ سانتی‌متر بالغ می‌شود. رکورد جهانی صید این ماهی ۱۹۱۰۸ گرم است [۵۹]. مانند سایر آزادماهیان دارای بدنی دوکی‌شکل (کشیده و دراز) است و باله چربی در حد فاصل باله پشتی و باله دمی وجود دارد. اما سایر مشخصات ظاهری که این گونه را از سایر آزادماهیان متمایز می سازد عبارتند از وجود دو نوار قوس و قزح (رنگین‌کمان) در دو طرف بدن که از سرپوش برانشی تا دم کشیده شده است، در نرها این نوار قوس و قزح در فصل تخم‌ریزی پررنگ‌تر و زیباتر شده و اصطلاحا می‌گویند که لباس دامادی پوشیده است [۱۲].

ماهیان سردابی در بین ماهیان پرورشی از اهمیت ویژه ای برخوردارند، خصوصا قزل‌آلای‌رنگین‌کمان به دلیل کیفیت مطلوب، به عنوان یک غذای بازارپسند و لذیذ مورد توجه است. به دلیل این که این ماهی آسان‌تر به غذای دستی عادت کرده و نسبت به تغییرات محیطی و درجه حرارت و کیفیت آب از حساسیت کمتری برخوردار است و شرایط پرورشی را بهتر تحمل می‌کند، از مناسب‌ترین ماهیان سردابی پرورشی محسوب می‌شود [۸] .

محدوده زیستگاه اصلی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان از رودخانه کاسکوکوئیم[4] در آلاسکا آغاز شده و به سمت جنوب ادامه می یابد و با عبور از بخش بریتیش کلمبیا[5] به منطقه باجا در کالیفرنیا می رسد. این ماهی اصولا بومی رودخانه‌های ساحلی شمال‌غرب آمریکا است؛ اما در کناره شرقی انشعاب اصلی در رودخانه صلح در بریتیش کلمبیا

---

[1] Salmonidae
[2] Salmoniformes
[3] Steel head
[4] Kuskokwim
[5] British columbia

و آتابسکا[1] (در آلبرتا) نیز وجود دارد. جمعیتی از این ماهی نیز به صورت بومی در استان چی هوا هوا[2] در کشور مکزیک وجود دارد [۶۴].

دانمارکی‌ها پیشتاز پرورش ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان برای تغذیه انسانی بوده اند. در حال حاضر حرفه پرورش ماهی قزل‌آلا در اکثر کشورهایی که شرایط مناسب آب و هوایی برای پرورش این گونه را دارند توسعه یافته است [۷۹] . قدمت پرورش ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در ایران نیز به چند دهه قبل مربوط می شود، زمانی که اولین مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در سال ۱۳۳۸ هجری شمسی به نام ماهی سرای کرج توسط مرحوم دکتر احمد معتمد در زیر سد کرج احداث گردید. از آن پس تا سال ۱۳۷۶ پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در ایران یک روند توسعه تدریجی را پشت سر گذاشته، به‌طوری‌که میزان تولید قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در این سال به حدود ۲۵۰۰ تن رسید. اما از سال ۱۳۷۶ به بعد به دلیل توجه شرکت سهامی شیلات ایران به امر توسعه پرورش آبزیان در آب‌های داخلی افزایش توان کارشناسی شیلات در استانهای غیرساحلی کشور توسعه این فعالیت با شتاب بیشتری دنبال شد، به طوری که میزان تولید این گونه در سال ۱۳۷۷ نسبت به سال قبل صددرصد افزایش یافت [۱۲].

کشور ایران با تولید ۶۲۶۳۰ تن ماهی‌قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در سال ۱۳۸۸ دارای رتبه چهارم در جهان است. طبق آمار شیلات ایران در سال ۱۳۸۸ استان های چهارمحال‌بختیاری با تولید ۱۲۰۵۶ تن در سال، لرستان با تولید ۱۱۱۸۳ تن ماهی در سال و مازندران با تولید ۱۰۵۱۴ تن ماهی در سال به ترتیب دارای رتبه های اول تا سوم هستند [۳].

سالانه میلیون‌ها قطعه بچه ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از تکثیر مصنوعی تولید و پرورش داده می‌شود اما نباید مسائل مربوط به ذخایر ژنتیکی، حفظ بانک ژنی، دورگه‌گیری و جلوگیری از همخونی[3] را نادیده گرفت. تکثیر غیراصولی و غیرعلمی در مزارع پرورشی و مراکز تکثیر سبب ایجاد اختلالات ژنتیکی و همخونی در نسل مولدین و بروز صفات نامرغوب ناشی از آن شده است. با بروز این مشکلات، درصد تلفات تخم و بچه‌ماهی و نیز میزان ناهنجاری‌های ظاهری و ناقص‌الخلقه بودن بچه ماهیان حاصله در مراکز تکثیر افزایش یافته است. اختلالات ژنتیکی مولدین سبب افزایش ضریب تبدیل غذایی و افزایش غیراقتصادی هزینه‌های تولید در مزارع پرورشی شده است.

ناهنجاری‌های ظاهری ناشی از مسائل ژنتیکی سبب کاهش بازارپسندی آنها شده است. بنابراین مدیران و صاحب‌نظران در امر تکثیر مصنوعی، در برنامه‌ریزی و تکثیر باید نه تنها تنوع ژنتیکی وحفظ فراوانی جمعیت‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان را مد نظر قرار دهند بلکه در برنامه‌های اجرایی خود به عنوان یک دستورالعمل کاربردی به کار برند. تخم‌های چشم زده قزل‌آلای‌رنگین‌کمان از آمریکا و کشورهای اروپایی مانند نروژ، دانمارک، فرانسه، ایتالیا و فنلاند به ایران وارد می‌شوند و در ایران به لارو تبدیل و جهت پرورش به مزارع پرورشی ارائه می‌شوند. تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف وارداتی جهت دورگه‌گیری و جلوگیری از ایجاد همخونی و یا جایگزین کردن جمعیت بومی ایرانی با این جمعیت‌ها الزامی است. پس اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح جمعیت‌ها یا نژادها است که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از جمعیت‌ها حائز اهمیت است.

با توجه به ارزش‌های زیاد این گونه به عنوان گونه پرورشی و عدم مطالعات جمعیتی درمورد آن، جنبه‌های تحقیقاتی آن از جمله مطالعات ژنتیکی در جهت بالا بردن پتانسیل ژنتیکی و دورگه‌گیری و جلوگیری از همخونی و

---

[1] Atabeska
[2] Chi howa howa
[3] Inbreeding depression

جایگزینی گله پرورشی با گله مناسب مورد توجه قرارگرفت. لذا هدف از تحقیق و فرضیه‌های تحقیق را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود.

هدف تحقیق

تعیین تنوع ژنتیکی گله‌های پرورشی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره‌ها.

فرضیه‌ها

۱) تنوع ژنتیکی مناسبی درون گله‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان پرورشی وجود دارد.

۲) تفاوت ژنتیکی بارزی بین گله‌های مختلف قزل‌آلای‌رنگین‌کمان پرورشی وجود دارد.

فصل دوم
کلیات و مرور منابع

۲-۱ معرفی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان متعلق به خانواده Salmonidae و زیرخانواده Salmoninae است [۱۲]. ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان بومی شمال آمریکا است و در رودخانه‌هایی که به اقیانوس اطلس می‌ریزد و از شمال مکزیک تا رود کاسکوئیم در آلاسکا امتداد دارد زیست می‌نماید. این رودخانه دارای آبی تمیز، شفاف و مملو از اکسیژن می‌باشند. این ماهی نیز مانند قزل‌آلای قهوه ای توسط انسان به اقصی نقاط جهان برده شده و به‌خاطر خاصیت سازگاری زیاد آن هم اکنون در اکثر آب‌های شیرین که دارای دمای مناسب جهت ادامه حیات و رشد این گونه هستند حضور دارد و تولید اکثر مزارع پرورش ماهیان سردابی دنیا و تقریبا تمام مزارع پرورش ماهیان سردابی ایران را به خود اختصاص می‌دهد. ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان یک ماهی رودرو[1] است و مهاجرت‌های تولیدمثلی خود را در آب‌های شیرین انجام می‌دهد، عادات تخمریزی این ماهی بسیار عجیب است چنانچه تخمریزی آن در تمام فصول حتی تابستان نیز دیده شده است. یک نژاد از این ماهی به نام قزل‌آلای سرفولادی به قسمت‌های بالایی رودخانه جهت تخمریزی مهاجرت می‌نماید. در رودخانه ساکرامنتو[2] مهاجرت این ماهی از ماه ژولای (اواسط تیر ماه) تا اواسط مارس (اواخر اسفند ماه) به طول می‌انجامد. بیشترین میزان مهاجرت در ماه‌های سپتامبر و اکتبر (اواسط شهریور ماه تا اواسط آبان ماه) اتفاق می‌افتد. پس از تخمریزی مولدین به قسمت‌های پایین دست رودخانه مهاجرت می‌نمایند، تراکم این مهاجرت در بهار و اوقات شب بیشتر است [۱۲].

[1] Anadraum
[2] Sacramento

۲-۲ تولید قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در ایران

صنعت شیلات یکی از زیر بخش‌های مهم کشاورزی در ایران است و توسعه شیلات در دو دهه گذشته نقش به‌سزایی در جلب نظر صاحب‌نظران و سیاست‌گذاران کشوری به آبزی‌پروری داشته است. عوامل کلیدی تأثیر-گذار در توسعه شیلاتی در کشور شامل ظرفیت‌های فیزیکی توسعه آبزی‌پروری، افزایش جمعیت، توجه جامعه به ماهی به‌عنوان غذای سلامتی، گسترش شهرنشینی و صنعتی شدن کشور است. تکثیر و پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در جهان از یک قرن تجاوز می‌کند [۴۵]. در اسکاتلند مزارعی وجود دارند که بیش از یک قرن به فعالیت پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان مشغول هستند. در دهه‌های اخیر هرچند رشد قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در کشورهای اروپای‌غربی رشد کندی داشت ولی در سایر مناطق در آسیا، آمریکای‌جنوبی و اقیانوسیه در حال گسترش است. آمار رسمی منتشر شده توسط سازمان فائو نشان می‌دهد در سال ۲۰۰۸ میلادی، ایران با تولید ۶۲۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در تولید قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در آب شیرین مقام اول در جهان را دارد [۳۶] .

در ایران، پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان به‌صورت مزارع منفرد و با استفاده از پرورش در استخرهای به شکل کانال‌های طویل آغاز گردید و سال‌ها بدون تغییر ماند. سال‌های پایانی برنامه اول توسعه (۱۳۷۳-۱۳۶۸) با شناسایی منابع آبی ۵۰۰ لیتر در ثانیه تحولی جدید در این زمینه در کشور ایجاد شد و شیلات ایران اقدام به معرفی و ترویج روش‌های متنوعی جهت پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در سطح کشور متناسب با اقلیم مناطق کرد. سیستم‌های پرورشی نظیر احداث مجتمع‌های تکثیر و پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، مزارع پرورش متراکم (مداربسته)، مزارع خرد (استخرهای دو منظوره کشاورزی)، پرورش در شالیزارها، پرورش در محیط‌های محصور و پرورش در مزارع خاکی به مرور طی برنامه‌های دوم توسعه (۱۳۷۸-۱۳۷۴) و سوم توسعه (۱۳۸۴-۱۳۷۹) اضافه گردیدکه در برخی موارد از جمله مزارع خرد پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان از موفقیت بسیار خوبی برخوردار بود. هرچند مزارع منفرد نزدیک به ۷۰ درصد تولید قزل‌آلای‌رنگین‌کمان کشور را به‌عهده دارند ولی از اهمیت سایر روش‌های پرورش قزل-آلای‌رنگین‌کمان چیزی کاسته نمی‌شود [۶]. تعداد مزارع پرورش ماهیان سردابی در ایران از ۳۰۶ واحد در سال ۱۳۷۹ به ۱۱۸۰ واحد در سال ۱۳۸۸ رسید و مساحت مزارع پرورشی ماهیان سردابی از ۵۱/۹ هکتار در سال ۷۹ به ۱۶۹ هکتار در سال ۱۳۸۸ رسید [۳].

۲-۳ مدیریت ژنتیکی ذخایر مولدین

جنبه‌های ژنتیکی ذخایر مولدین از اهمیت زیادی برخوردار هستند، زیرا پتانسیل یک جمعیت را در حقیقت ژنتیک آن جمعیت معین می‌کند. با وجود اینکه برای پدیدار شدن پتانسیل ذخایر ماهیان، وجود محیط مناسبی در کارگاه الزامی است، اما باید توجه داشت که پتانسیل بیولوژیکی هر جمعیت، در حقیقت به آلل‌های موجود در آن جمعیت بستگی دارد. آگاهی از روش‌های قابل استفاده جهت اعمال مدیریت، محافظت، یا بهره‌برداری از آلل‌ها، برای مدیران کارگاه‌های پرورش الزامی است. آنان باید بدانند که اعمال مدیریت ژنتیکی، چگونه می‌تواند بر توان تولید مؤثر باشد، زیرا هرگونه اعمال مدیریت، خزانه ژنی یک جمعیت را متأثر می‌سازد. معمولا هرگاه ماهیان دستکاری شوند، برخی از فنوتیپ‌ها و آلل‌ها حذف می‌گردند. یک مدیر کارگاه تکثیر، ابتدا باید تصمیم بگیرد که

ماهیان از کدام جمعیت اخذ شوند، راه مشخصی برای این تصمیم‌گیری وجود ندارد. برای رسیدن به پاسخ این سوال فقط باید اهداف، نیازها، تحقیقات قبلی و پیش داوری‌های شخصی را مورد بررسی قرار داد [۴].

۲-۴ تنوع ژنتیکی

۲-۴-۱ ژنتیک جمعیت

ژنتیک جمعیت به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و به عبارت دیگر به فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و قوانین حاکم بر تغییرات آنها می‌پردازد. ژنتیک جمعیت علم مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها است. این علم تنوع حاصل از عواملی همچون انتخاب، جهش، نوترکیبی، جریان تصادفی ژنی و اندازه جمعیت مؤثر را پیش بینی می‌کند [۱۷].

۲-۴-۲ ضرورت بررسی تنوع ژنتیکی

مقدار و ماهیت تنوع ژنتیکی در یک جمعیت جهت برآورد اندازه جمعیت مؤثر،گذشته جمعیت (مهاجرت، اثر تنگنای ژنتیکی[1])، ساختارجمعیت، چگونگی اثر انتخاب بر ژن‌ها وتعیین جایگاه ژنی صفات کمی کاربرد دارد. انواع تنوع ژنتیکی شامل تنوع فنوتیپی (ظاهری)، تنوع کروموزومی (کاریوتایپ)، تنوع ایمونولوژیکی (گروه‌های خونی)، تنوع پروتئینی (آنزیم ها) و تنوع در سطح دی.ان.ا (چندشکلی توالی های دی.ان.ا[2]) است. تنوع مولکولی یا چندشکلی شامل تغییر درنوکلئوتیدها، اضافه شدن یا حذف نوکلئوتیدها و تنوع در تعداد تکرارهای توالی‌های تکرارشونده پشت سرهم است [۱۷].

۲-۵ انواع نشانگرها

۲-۵-۱ نشانگرهای مورفولوژیکی

به علایمی که به طور مستقیم در فنوتیپ جانور و گیاه قابل تشخیص وتوارث‌پذیر هستند نشانگرهای مورفولوژیکی گفته می‌شوند. طول‌کل، طول استاندارد، طول پوزه، ارتفاع سر، قطر و چشم ازجمله صفات مورفولوژیک قابل اندازه‌گیری در آبزیان هستند. اگر چه نشانگرهای مورفولوژیکی به طور سنتی درعلوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند ولی دارای محدودیت‌های اساسی مانند تعداد کم این نشانگرها، دقت کم، تأثیرپذیری شدید از محیط و مرحله رشد، سن و وجود غالبیت در بروز صفات هستند. اساس و تفسیر ژنتیکی بسیاری از این نشانگرها نامشخص بوده و شناسایی افراد ناخالص از خالص امکان‌پذیر نیست. اما به دلیل سهولت انجام، کم‌هزینه بودن وعدم نیاز به امکانات پیچیده وگران‌قیمت برای اندازه‌گیری‌ها، محققین بسیاری از این نشانگرها استفاده می‌نمایند [۶۲].

۲-۵-۲ نشانگرهای سیتوژنتیکی

وجود اختلاف در شکل، اندازه و تعداد کروموزم‌ها می‌تواند بیانگر وجود اختلاف ژنتیکی باشد. بنابراین این نشانگرها نمایان‌گر تنوع در ساختمان کروموزوم‌ها است. مطالعات سیتوژنتیکی به منظور مقایسه اختلافات موجود بین افراد یک گروه و آشکار شدن مسیر تکاملی تغییرات در کروموزم‌های تشکیل دهنده ژنوم، تفکیک گونه‌ها و بعضاً جمعیت‌های مختلف از نظر تعداد و نوع کروموزوم‌ها انجام می‌گیرد.

---

[1] Bottleneck
[2] DNA

۲-۵-۳ نشانگرهای بیوشیمیایی[1]:

برخی از تفاوت‌ها در ترتیب نوکلئوتیدی دی.ان.ا بین دو موجود، ممکن است به صورت پروتئین‌هایی با اندازه-های مختلف بروز کند که از طریق بیوشیمیایی قابل آنالیز و مطالعه است. این نشانگرها را نشانگر پروتئینی می‌گویند که به دو نوع آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند. آنزیم‌های موجود در هر فرد ممکن است دارای بیش از یک فرم مولکولی باشند. فرم‌های مولکولی متفاوت یک آنزیم در یک فرد را آیزوزایم[2] می‌گویند. ساختمان اولیه آیزوزایم‌ها ازاین جهت متفاوتند که به وسیله ژن‌های متفاوت رمزگذاری می‌شوند و در نتیجه چنین ساختمان مولکولی متفاوت یک آنزیم که دارای فعالیت آنزیمی (کاتالیزوری) یکنواخت و مشخص هستند را اصطلاحاً آیزوزایم گویند [۲۳].

آلوزایم‌ها[3]، از انواع آللی پروتئین‌های حاصل از یک جایگاه در ژن هستند. از دهه ۱۹۶۰ الکتروفورز آلوزایم بر ژل نشاسته رایج‌ترین روش مولکولی بود که در ژنتیک شیلاتی به کار گرفته می‌شود. از بین نشانگرهای اولیه، آلوزایم‌ها به طور گسترده در ژنتیک گونه‌های آبزی به کار می‌روند. از تفاوت در وجود یا عدم وجود و فراوانی نسبی آلل‌ها برای شناسایی تنوع ژنتیکی و شناسایی بین واحدهای ژنتیکی در سطح جمعیت وگونه استفاده می‌شود. آلوزایم در آبزی‌پروی برای شناسایی اثر آمیزش خویشاوندی و شناسایی ذخایر ماهیان به‌کار می‌رود.

از معایب استفاده از آلوزایم‌ها، کاهش هتروزایگوسیتی به‌واسطه آلل‌های بی اثر (از نظر آنزیمی غیر فعال هستند) و همچنین نیاز به دانستن کمیت و کیفیت نمونه‌های (نیاز به نمونه‌های تازه) مورد نظر است. به علاوه بعضی از تغییرات در توالی دی.ان.ا که در سطح پروتئینی پنهان می‌شوند، کاهش دهنده میزان تنوع قابل مشاهده هستند. علی-رغم مزیت این نشانگر و سهولت استفاده از آن و هزینه اندک، کاربردآنها در ژنتیک آبزیان محدود شده است [۵۷].

۲-۵-٤ نشانگرهای مولکولی

هرگونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی دی.ان.ا که از والدین به نتاج قابل انتقال باشد به عنوان نشانگر مولکولی به کار گرفته می‌شود. تفاوت‌های موجود در سطح دی.ان.ا که هیچ‌گونه تظاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می-کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینه رشته‌های پلی‌پلوییدی تأثیر بر جا می‌گذارند در واقع نشانگرهای دی.ان.ا چند شکلی موجودات را در سطح دی.ان.ا تعیین می‌کنند این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می‌کنند و در نتیجه توالی‌های کدکننده[4] و غیرکدکننده[5] را در بر می‌گیرد. بررسی این‌گونه تفاوت‌ها که فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم دی.ان.ا امکان‌پذیر است به نشانگرهای مولکولی در سطح دی.ان.ا معروف است.

فراوانی بالا، هم‌بازر بودن[6] اکثر این نشانگرها، امکان استفاده از آنها در تمام مراحل زندگی حتی دوران جنینی، عدم تأثیر از شرایط محیطی، امکان استفاده از نرم افزارهای رایانه‌ای مختلف در آنالیز داده‌ها ، قدرت تمایز بالای این نشانگرها، نمایان ساختن تفاوت بین ترتیب‌های غیرکدکننده علاوه براختلاف موجود در ترتیب‌های کدکننده از مزایای این نشانگرها است. این نشانگرها به دو دسته مبتنی بر پی.سی.آر[7] وغیر مبتنی بر پی.سی.آر[8] تقسیم می‌شوند. انواع مختلفی از این نشانگرها، با تفاوت‌های بسیاری از لحاظ تکنیکی، روش تولید، نحوه کاربرد و امتیازبندی و

---

[1] Biochemical markers
[2] Isozyme
[3] Allozyme
[4] Coding sequences
[5] Non-coding sequences
[6] Codominant
[7] Based on PCR
[8] Non-based PCR