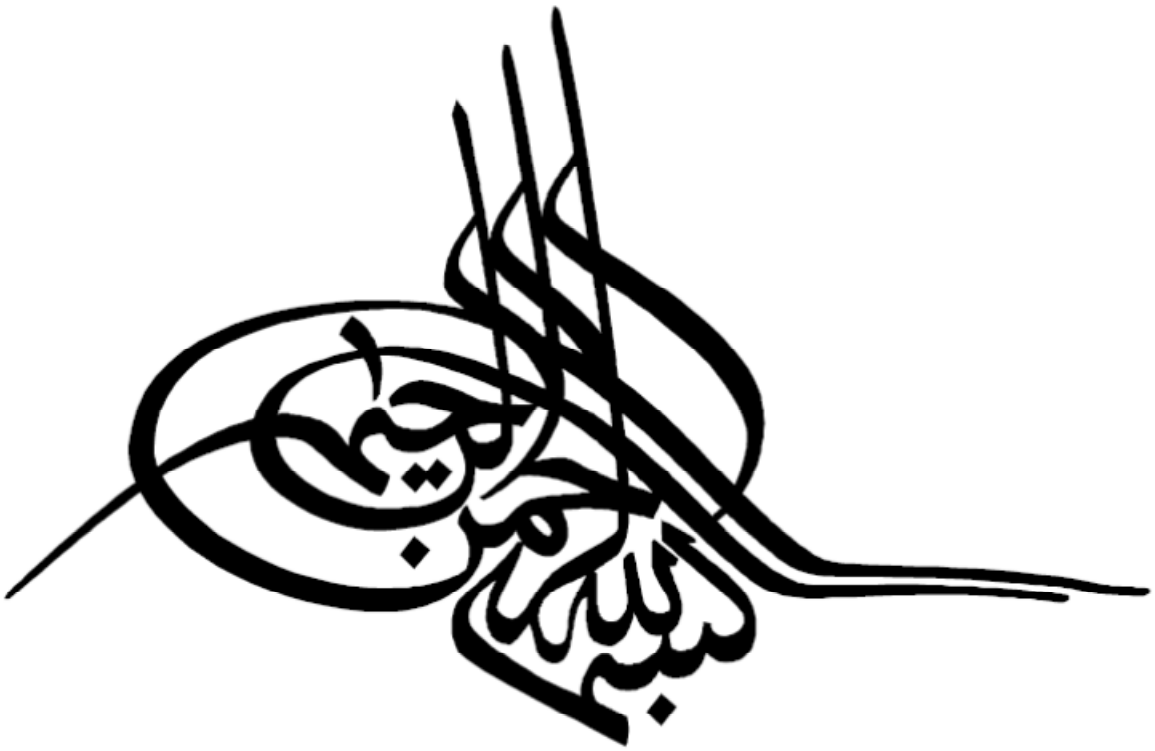
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده منابع طبیعی

باسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه

بدین وسیله گواهی می شود آقای کاوه خسرویانی دانشجوی رشته شیلات گرایش تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۱۱ از پایان نامه ۶ واحدی خود با عنوان: **تنوع ژن‌های MHC در جمعیت-های پرورشی و وحشی ماهی آزاد دریای خزر** (*Salmo trutta caspius*) دفاع کرده است. اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آنرا برای دریافت درجه کارشناسی ارشد تائید می‌نمایند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
استاد راهنمای اول	دکتر محمدرضا کلباسی	دانشیار	
استاد راهنمای دوم	دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
استاد ناظر (داخلی)	دکتر عبدالمحمد عابدیان	دانشیار	
استاد ناظر (خارجی)	دکتر علی شعبانی	دانشیار	
نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر عبدالمحمد عابدیان	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **تکثیر و پرورش آبزیان** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده **علوم دریایی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکتر محمد رضا کلباسی و دکتر مجید صادقی زاده** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **کاوه خسرویانی** دانشجوی رشته **تکثیر و پرورش آبزیان** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **کاوه خسرویانی**

تاریخ و امضا: ۱۳۹۱/۱۱/۱۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم دریایی
گروه تکثیر و پرورش آبزیان

پایان نامه برای اخذ مدرک کارشناسی ارشد
رشته تکثیر و پرورش آبزیان

تنوع ژن‌های MHC در جمعیت‌های پرورشی و وحشی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

نگارش:
کاوه خسرویانی

اساتید راهنما:
دکتر محمد رضا کلباسی
دکتر مجید صادقی‌زاده

بهمن ۱۳۹۱

این پایان نامه به رسم ادب

خاضعانه و عاشقانه

تقدیم می‌گردد به

پدر و مادر عزیزم

خواهر مهربانم

عموی دلسوزم

برادران همراهم

تشکر و قدردانی

''سپاس و ستایش خدای که توفیق نگارش این پایان‌نامه را بر بنده عطا فرمود ''

بر خود لازم می‌دانم از زحمات استاد گرانقدر و راهنمای پایان‌نامه، جناب آقای **دکتر محمد رضا کلباسی** که لحظه به لحظه همراهیم کردند و علم و دانش خود را بدون هیچ چشم‌داشتی بر من ارزانی داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای **دکتر مجید صادقی‌زاده** که افتخار شاگردیشان نصیب بنده گردید بی‌نهایت سپاسگزارم.

از داوران محترم جناب آقای **دکتر علی شعبانی** و **دکتر عبدالمحمد عابدیان کناری** که با نظرات سازنده خود به غنای این پایان نامه افزودند تشکر می‌نمایم. از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر **عبدالمحمد عابدیان کناری** به خاطر مساعدت‌های بی‌دریغشان تشکر می‌نمایم.

همچنین از سرکار خانم دکتر **شیرین جمشیدی** به خاطر راهنمایی‌ها و کمک‌های بی‌شائبه‌ایی که طی مراحل آزمایشگاهی به بنده فرمودند، بی‌نهایت سپاسگزارم و برایشان سلامت و سعادت آرزومندم.

از جناب آقای **مهندس مهدی مکرمی** ریاست محترم بازسازی ذخایر سازمان شیلات به خاطر هماهنگی و مساعدت‌های بی‌دریغشان تشکرو قدردانی می‌کنم. همچنین از جناب آقای **مهندس مصطفی رضوانی** ریاست محترم مرکز بازسازی ذخایر شهید باهنر کلاردشت، جناب آقای **دکتر محمد صیاد بورانی** ریاست محترم مرکز تحقیقات ماهیان سردابی کشور و مدیریت محترم مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهی آزاد دریای خزر لفور به خاطر مساعدت برای دریافت نمونه کمال سپاسگزاری را دارم.

از جناب آقای **مرتضی کمالی** کارشناس آزمایشگاه شیلات دانشکده علوم دریایی و سرکار **خانم هلن دیداری**، **مریم اسماعیلی** و **زهرا فضل زرندی** کارشناسان آزماشگاه ژنتیک و بیوشیمی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس برای همکاری صمیمانه‌شان طی مراحل آزمایشگاهی قدردانی می‌نمایم.

از دوستان عزیزم خانم‌ها **شاهده عبدالعزیزی، مریم خواجوی، مهشید ملکوتیان، مولود شریعتی و مینا زمانی** و آقایان **امیر لطفی‌زاده، ایمان شیردل، ناصر نوروزی، احمد فرهادی، اکبر واثقی، بابک بخشی‌نژاد، علی‌محمد احدی** و **وحید خیرالهی** به خاطر حمایت‌های صمیمانه‌شان طی مراحل مختلف تحقیق بی‌نهایت تشکر می‌نمایم.

در نهایت از زحمات دلسوزانه و محبت‌های بی‌پایان خانواده عزیزم که در تمام مراحل زندگی یاور بنده بوده‌اند و سختی زندگی را به جان خریدند تا حقیر بتوانم به تحصیل علم و دانش ادامه دهم، سپاسگزارم.

با تشکر

کاوه خسرویانی

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) یکی از گونه‌های بومی دریای خزر می‌باشد که از نظر زیست محیطی بسیار مورد توجه بوده و حفاظت و بازسازی ذخایر مبتنی بر حفظ تنوع ژنتیکی آن اهمیت بالایی دارد. خصوصیات ویژه این گونه چون بازارپسندی و کیفیت بالای گوشت تمایل به تکثیر و پرورش این گونه در بخش آبزی‌پروری کشور ایران را افزایش داده و لاروهای بدست آمده از نسلF1 این ماهی در استان‌هایی چون مازندران، تهران، زنجان و گیلان در حال پرورش می‌باشند. در این تحقیق قرابت ژنتیکی مولدین پرورشی شده نسل پایه و نسل F1 بدست آمده از آنها، با ذخیره وحشی ماهی آزاد دریای خزر از منظر ژنوم عملکردی MHC مورد آزمون قرار گرفت. به این منظور واریانس ژنتیکی دومین اگزون ژن‌های MHC کلاس IIα (DAA) و IIß (DAB) با استفاده از روش SSCP و توالی‌یابی، در جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و جمعیت وحشی (به نام قراردادی کلاردشت)؛ هر جمعیت حداقل ۳۰ نمونه، مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان می‌دهد ژنوم MHC در ماهی آزاد دریای خزر دارای چندشکلی بالایی بوده و جایگاه‌های DAA و DAB به ترتیب واجد ۱۵ و ۱۲ الل می‌باشند، که جمعیت وحشی کلاردشت دارای بیشترین و جمعیت پرورشی تنکابن و نسل F1 آن کمترین غنای اللی را دارند. به طور کلی در جمعیت‌های پرورشی و وحشی ماهی آزاد دریای خزر الل‌های DAA*03، DAA*10 و DAB*11 این ژنوم بیشترین فراوانی را داشته و از جمعیت وحشی به نسل F1 حاصل از مولدین پرورشی، از غنای اللی کاسته شده و از ۲۷ الل شناسایی شده، در جمعیت پرورشی لفور کاهش ذخیره ژنی، از ۶ الل به ۹ الل در نسل F1 رسیده و در جمعیت پرورشی تنکابن از ۱۱ الل به ۱۳ الل رسیده است. هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho) جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و وحشی کلاردشت به ترتیب برابر ۰/۶۰، ۰/۶۶، ۰/۷۰، ۰/۶۳ و ۰/۷۳ بوده و هتروزیگوتی مورد انتظار اصلاح شده (UHe) این جمعیت‌ها به ترتیب برابر ۰/۷۹، ۰/۸۲، ۰/۸۱، ۰/۷۸ و ۰/۸۲ می‌باشد. شاخص فاصله ژنتیکی درونی (F) این جمعیت‌ها به ترتیب برابر ۰/۲۳، ۰/۱۷، ۰/۱۲، ۰/۱۷ و ۰/۱۰ می‌باشد. شاخص فاصله بین جمعیتی (F_{ST}) ذخیره وحشی کلاردشت نسبت به جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن و نسل F1 تنکابن به ترتیب برابر ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۱، ۰/۰۰۹ و ۰/۰۱۶ و بین جمعیت‌های پرورشی لفور و تنکابن نسبت به نسل F1 آنها برابر ۰/۰۹۶ و ۰/۰۳۷ می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی الل‌های جایگاه DAA و DAB به ترتیب دارای تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۶۲ و ۰/۰۱۲ ، فاصله غیرهمسان بین اللی (Dn) ۰/۰۷۵ و ۰/۰۱۳ و Dn/Ds برابر ۱/۹ و ۱/۳ می‌باشند. با توجه به افزایش فاصله ژنتیکی جمعیت‌های پرورشی از ذخیره وحشی ماهی آزاد دریای خزر، از بچه‌ماهیان تکثیر شده در مزارع پرورشی برای بازسازی ذخایر این گونه نباید استفاده شود و برای جلوگیری از افزایش درون‌آمیزی و کم شدن غنای ژن‌های عملکردی مهم مانند ژنوم MHC در جمعیت‌های پرورشی، می‌توان از شناسنامه ژنتیکی در این جمعیت‌ها استفاده و تکثیر این مولدین طی لقاح مخلوط اسپرم و تخمک بهینه شود.

کلمات کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، *Salmo trutta caspius* ، ژنوم MHC، SSCP، بازسازی ذخایر

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- دریای خزر(Caspian Sea) ۷

۱-۳- ماهی آزاد دریای خزر (*S.trutta caspius*)..... ۸

۱-۳-۱. خصوصیات ماهی‌شناختی ماهی آزاد دریای خزر ۸

۱-۳-۲. وضعیت زیست محیطی ماهی آزاد دریای خزر ۹

۱-۴- تخمین زدن تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی..... ۱۲

۱-۴-۱. بررسی تنوع درون جمعیتی..... ۱۳

۱-۴-۲. بررسی تنوع بین جمعیتی ۱۵

۱-۵- مجموعه سازگار نسجی (Major Histocompatibility complex) ۱۹

۱-۵-۱. ساختار و عملکرد مولکول‌های MHC..... ۲۰

۱-۵-۲. مجموعه ژنوم MHC..... ۲۲

۱-۵-۳. چندشکلی ژنوم MHC..... ۲۵

۱-۵-۴. ژنوم MHC و بیماریها ۲۶

۱-۶- کاربردهای نشانگر MHC در ژنتیک جمعیت آبزیان..... ۲۷

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- وضعیت جمعیت‌های ماهی آزاد دریای خزر ۳۰

۲-۲- سیر تحول در استفاده از نشانگر مولکولی ۳۲

۲-۳- بررسی ژنوم MHC در مهره‌داران ۳۳
۲-۴- ژنوم MHC ماهیان استخوانی ۳۵
۲-۵- استفاده از ژنوم MHC به عنوان نشانگر در علوم آبزیان ۳۵
۲-۵-۱. رابطه ژنوم MHC و انتخاب جفت ۳۶
۲-۵-۲. ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهیان ۳۷
۲-۶- یافتن الل‌های MHC ایجاد مقاومت نسبت به بیماری‌ها ۳۹

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد مورد نیاز ۴۱
۳-۱-۱. نمونه برداری ۴۱
۳-۱-۲. تخلیص DNA ۴۱
۳-۱-۳. واکنش تکثیر زنجیره‌ایی پلی‌مراز (PCR) ۴۲
۳-۱-۴. واسرشته سازی محصول PCR ۴۲
۳-۱-۵. آنالیز SSCP-PAGE ۴۲
۳-۱-۶. رنگ‌آمیزی نیترات نقره ۴۳
۳-۲- روش کار ۴۳
۳-۲-۱. نمونه‌برداری ۴۳
۳-۲-۲. استخراج DNA ۴۵
۳-۲-۳. تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ۴۵
۳-۲-۴. واکنش تکثیر زنجیره‌ایی پلی‌مراز (PCR) ۴۷
۳-۲-۴,۱. انتخاب پرایمر مناسب ۴۷

۳-۲-۴,۲. بهینه سازی شرایط PCR ۴۷
۳-۲-۴,۳. تکثیر جایگاه DAB ژنوم MHC کلاس II ۴۸
۳-۲-۴,۴. تکثیر جایگاه DAA ژنوم MHC کلاس II ۴۸
۳-۲-۴,۵. بررسی کیفیت محصول PCR ۵۰
۳-۲-۵. بررسی چندشکلی صورتبندی تک‌رشته‌ای (SSCP) ۵۰
۳-۲-۵,۱. تکثیر قطعه مورد نظر طی فرایند PCR ۵۰
۳-۲-۵,۲. واسرشته سازی محصول PCR ۵۱
۳-۲-۵,۳. الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (PAGE) ۵۲
۳-۲-۵,۴. بهینه‌سازی آنالیز SSCP ۵۲
۳-۲-۵,۵. رنگ‌آمیزی نیترات نقره ۵۳
۳-۲-۶. تعیین توالی نمونه‌ها ۵۶
۳-۲-۷. روش‌های آماری و بیوانفورماتیکی استفاده شده ۵۶

فصل چهارم: نتایج تحقیق

۴-۱- استخراج DNA ۵۸
۴-۲- واکنش تکثیر پلی‌مراز (PCR) ۵۹
۴-۲-۱. تکثیر جایگاه DAB ژنوم MHC کلاس II ۵۹
۴-۲-۲. تکثیر جایگاه DAA ژنوم MHC کلاس II ۶۰
۴-۳- آنالیز SSCP محصول PCR ۶۲
۴-۴- تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۶۴
۴-۴-۱. تنوع الل‌های ژنوم MHC ۶۴

۴-۴-۲. آنالیز چندشکلی، هتروزیگوتی و شاخص تثبیت ژنوم MHC ۶۸
۴-۴-۳. آنالیز χ^2 و انحراف از تعادل HWE ۷۰
۴-۵- تنوع ژنتیکی بین جمعیتی ۷۱
۴-۵-۱. شاخص F_{ST} ۷۱
۴-۵-۲. شاخص G_{ST} ۷۳
۴-۶- توالی الل‌های ژنوم MHC ۷۵
۴-۶-۱. جایگاه DAA ۷۵
۴-۶-۲. جایگاه DAB ۷۸

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱- جایگاه فیلوژنتیک ماهی آزاد دریای خزر با توجه به ژنوم MHC ۸۱
۵-۲- چندشکلی ژنوم MHC ماهی آزاد دریای خزر ۸۲
۵-۳- مقایسه نشانگر MHC با نشانگرهای خنثی ۸۴
۵-۴- تنوع نشانگر MHC در جمعیت‌های پرورشی و وحشی ماهی آزاد دریای خزر ۸۵
۵-۵- شاخص فاصله ژنتیکی بین جمعیتی مناسب برای نشانگر MHC ۸۶
۵-۶- بازسازی ذخایر و تکثیر و پرورش ماهی آزاد دریای خزر ۸۸
۵-۷- نتیجه گیری ۸۹
۵-۸- آزمون فرضیات ۹۰
۵-۹- پیشنهادات ۹۱
۵-۹-۱. پیشنهادات مستخرج از پایان نامه ۹۱
۵-۹-۲. پیشنهادات پژوهشی ۹۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های مورد بررسی ۴۹

جدول ۳-۲ ترکیبات استفاده شده برای واکنش PCR ۴۹

جدول ۳-۳ محلول واسرشته سازی SSCP ۵۱

جدول ۳-۴ مواد مورد نیاز برای ساختن ژل اکریل‌آمید ۱۰ درصد برای آنالیز SSCP ۵۳

جدول ۳-۵ مراحل رنگ‌آمیزی نیترات نقره ژل اکریل آمید ۵۵

جدول ۴-۱ فراوانی الل‌های ژنوم MHC کلاس II جمعیت‌های لفور، نسل F1 لفور، تنکابن ۶۵

جدول ۴-۲ آنالیز چندشکی، هتروزیگوتی و شاخص تثبیت (F) ژنوم MHC جمعیت‌های لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر ۶۹

جدول ۴-۳ میانگین چندشکلی، هتروزیگوتی و شاخص تثبیت ژنوم MHC جمعیت‌های لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر ۷۰

جدول ۴-۴ آزمون χ^2 جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن ۷۱

جدول ۴-۵ ماتریس فاصله بین جمعیتی F_{ST} برای جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و وحشی کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر ۷۲

جدول ۴-۶ آماره F ژنوم MHC کلی جمعیت‌های مختلف ماهی آزاد دریای خزر ۷۲

جدول ۴-۷ ماتریس فاصله ژنتیکی Nei (G_{ST}) بین جمعیت‌های ۷۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ محل قرار گیری دریای خزر در نیمکره شمالی و زیستگاه های ماهی آزاد دریای خزر ۸

شکل ۱-۲ تعداد بچه ماهی رهاسازی شده برای بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر..... ۱۱

شکل ۱-۳ نحوه ارائه آنتی‌ژن توسط MHC به گیرنده سلول لنفوسیت T..... ۱۹

شکل ۱-۴ بخش‌های مختلف گیرنده‌های MHC و جایگاه‌های کد کننده هر بخش آن..... ۲۰

شکل ۱-۵ مراحل ساخته شدن مولکول MHC classI و تحویل دادن آنتی‌ژن به سطح سلول..... ۲۲

شکل ۳-۱ ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری از ماهی آزاد دریای خزر در استان مازندران..... ۴۴

شکل ۳-۲ دستگاه‌های مورد استفاده برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده..... ۴۶

شکل ۳-۳ مراحل انجام آنالیز SSCP ۵۴

شکل ۳-۴ ژنوتایپ کردن ژل های اکریل‌آمید به کمک برنامه Gel Scanner..... ۵۷

شکل ۴-۱ استخراج DNA از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر..... ۵۸

شکل ۴-۲ تکثیر جایگاه DAB ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر..... ۶۰

شکل ۴-۳ تکثیر جایگاه DAA ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر..... ۶۱

شکل ۴-۴ آنالیز SSCP ژنوم MHC کلاسII جمعیت مولدین پرورشی لفور ماهی آزاد دریای خزر..... ۶۳

شکل ۴-۵ فراوانی الل‌های جایگاه DAA ژنوم MHC جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و وحشی کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر..... ۶۶

شکل ۴-۶ فراوانی الل‌های جایگاه DAB ژنوم MHC جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و وحشی کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر..... ۶۷

شکل ۴-۷ فاصله ژنتیکی جمعیت‌های پرورشی لفور، نسل F1 لفور، تنکابن، نسل F1 تنکابن و وحشی کلاردشت ماهی آزاد دریای خزر (*S. trutta caspius*) با استفاده از شاخص F_{ST}..... ۷۳

شکل ۴-۸ توالی الل‌های هم‌ردیف شده جایگاه DAA ژنوم MHC ماهی آزاد دریای خزر ۷۶

شکل ۴-۹ آنالیز فیلوژنتیک الل‌های جایگاه DAA ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر.....۷۸

شکل ۴-۱۰ توالی الل‌های هم‌ردیف شده جایگاه DAB ژنوم MHC ماهی آزاد دریای خزر.....۷۹

شکل ۴-۱۱ – آنالیز فیلوژنتیک الل‌های جایگاه DAB ژن MHC کلاس II ماهی آزاد دریای خزر ۸۰

شکل ۵-۱ - مدل TSP ژنوم MHC ماهی آزاد دریای خزر و تمایز ژنتیکی آن طی فرایند گونه‌زایی ۸۰

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه:

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius,* Dorofeeva 1967) یکی از گونه های بومی دریای خزر از خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) می‌باشد که در فصل تولیدمثل(اواخر پائیز و اوایل بهار) به رودخانه‌های حاشیه جنوبی-غربی دریای خزر مثل کرگانرود، سردآبرود، تنکابن و ناورود مهاجرت می‌کنند (Farid Pak، ۱۹۶۷). در سالهای اخیر بر اثر مشکلاتی چون آلودگی‌های محیطی، صید بی رویه، تخریب زیستگاه (مخصوصا احداث سد در رودخانه ها) جمعیت این گونه به شدت کاهش یافته است. علیرغم گزارشاتی که Coad (۱۹۸۰)، Kiabi و همکاران (۱۹۹۹) مبنی بر در معرض انقراض بودن این گونه داده-اند، ولی این گونه هنوز در لیست Least concern سازمان IUCN قرار دارد (Niksirat و Abdoli، ۲۰۰۹؛ Kiabi و همکاران، ۱۹۹۹).

با توجه به این مشکلات، نیاز به بازسازی این گونه بسیار ضروری است و به این ترتیب در طول سال-های گذشته تلاش‌های زیادی برای تکثیر مصنوعی این ماهی در مرکز تکثیر و بازسازی کلاردشت انجام شده است و سالانه بالغ بر ۵۰۰ هزار بچه ماهی که بعد از ۲ سال به وزن ۲۰-۱۵ گرمی می‌رسند، رهاسازی می‌شود (Jalali و Amiri، ۲۰۰۹). برای تکثیر این گونه مولدین نر و ماده بعد از صید از رودخانه‌های سردآبرود و تنکابن به این مرکز منتقل و به محض رسیدگی کامل، اسپرم و تخمک‌گیری انجام و به روش لقاح خشک و mixed-milt (ترکیب اسپرم چند نر و مخلوط کردن با ترکیب تخمک‌های چند ماده) لقاح انجام می‌شود. با توجه به اینکه افراد مختلف می‌توانند خصوصیات اسپرمی مثل سرعت، مدت زمان تحرک، اندازه، خصوصیات بیوشیمیائی و شکل تحرک متفاوتی داشته باشند، در نتیجه رقابت اسپرمی افراد مختلف متفاوت می‌باشد (Quinn، ۲۰۰۵؛ Campton، ۲۰۰۴). از سالهای ۱۹۸۰ مطالعات زیادی به بررسی این روش لقاح پرداختند و به این نتیجه رسیدند که نرها به طور مساوی در فرایند لقاح

شرکت نمی‌کنند و در طول گذشت زمان می‌تواند منجر به تغییر نسبت‌های ژنوتیپی در نسل‌های متوالی شود (Gile and Ferguson، ۱۹۹۵). در بررسی سوری‌نژاد و همکاران (۱۳۸۹) مشخص شده است که مولدین نر ماهی آزاد دریای خزر هم به طور مساوی شانس لقاح و تشکیل نسل بعد را ندارند و تعدادی کمی از افراد بیشتر نسبت ژنتیکی نسل بعد را بوجود می آورند (سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹؛ Vera و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات Blanchet و همکاران (۲۰۰۸) روی آزادماهی اطلس(*Salmo salar*) نشان می‌دهد شاخص های مورفولوژیک و ژنتیکی زاده‌های شرایط طبیعی با انچه در حالت پرورشی وجود دارد، متفاوت می‌باشد به طوری که ماهیان پرورشی هتروزیگوتی یا چندشکلی ژنوتیپی کمتری را نشان می-دهند (Blanchet و همکاران، ۲۰۰۸).

ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را عواملی چون جریان ژنی، شارش ژن، انتخاب طبیعی و جهش تعیین می-کنند (Wright، ۱۹۳۱). امروزه در بررسی برهم کنش و نتیجه تغییرات این عوامل از روش‌های مختلف می‌توان شاخص‌های مهمی چون اندازه‌موثر جمعیت را به دست آورد (Wilson و Ranala، ۲۰۰۳). بررسی ژن‌هایی که از نظر اکولوژیک حائز اهمیت می‌باشند می‌تواند اثرات انتخاب طبیعی یا مصنوعی و شارش ژنی اعمال شده بر این ژن‌ها را بررسی کرد. عواملی چون تکه تکه شدن زیستگاه‌ها، آلودگی، صید بی رویه و در نهایت تلاش انسان برای بهره کشی از منابع(آزادسازی به منظور افزایش صید، انتخاب گونه برای تکثیر و پرورش در شرایط بسته) باعث کاهش تعداد موثر جمعیت شده، که خود منجر به افزایش نرخ درون آمیزی و کاهش تنوع گونه‌ها می‌شود (Young، ۱۹۹۶). جمعیت‌های کوچک به مراتب بیشتر در معرض خطر هستند (Harrison و Hasting، ۱۹۹۶). کاهش تنوع در جمعیت در کوتاه مدت باعث کاهش بسیاری از شاخص‌های شایستگی (fitness) جمعیت مثل زنده مانی، بازدهی تولید مثلی و نرخ رشد شده و در طولانی‌مدت باعث کاهش توانائی گونه در مقابله با تغییر شرایط محیطی می‌شود (Frankham و Ralls، ۱۹۹۸؛ Biljsma، ۲۰۰۰). برای مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و بررسی تنوع

افراد و جمعیت، بیشتر از نشانگرهای خنثی مثل mtDNA، میکروستلایت‌ها و چند شکلی تک نوکلئوتیدی استفاده می‌شود (Paul، ۲۰۰۰). علیرغم اینکه مطالعه این نشانگرها برای مطالعه فیلوژنتیک و تاریخچه جمعیت‌ها (مثل در تنگنا قرار گرفتن)، الگوی تبادل ژنی جمعیت‌ها و دسته‌بندی افراد بر اساس قرابت خانوادگی اطلاعات خوبی بدست می‌دهد (Blouin و همکاران، ۱۹۹۶؛ Balloux و Lugon-Moulin، ۲۰۰۲)، ولی برای مطالعه اثرات به‌گزینی که در اثر تقابل جانور با محیط رخ می‌دهد یا مطالعه ظرفیت جانوران در برابر تغییرات محیطی، این نشانگرها نمی توانند اطلاعات روشنی نشان دهند(Meyer و Bull، ۲۰۰۲؛ van Tienderen و همکاران، ۲۰۰۲). ساختار تولیدمثلی جمعیت ها، در تنگنا قرار گرفتن جمعیت‌ها و تاریخچه بیوژئوگرافی گونه ها معمولا به یک شکل روی تمام نشانگرها اثر می‌گذارند ولی تنوع نواحی عملکردی (توالی های بیان شونده و تنظیمی) علاوه بر اینکه در اثر عواملی چون شارش ژنی، مهاجرت و غیره تغییر می‌کنند، بلکه تحت اثرات انتخاب طبیعی در طول زمان بوده و برای ژن‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد. صفاتی که امکان زیست یک گونه یا دسته‌ای از گونه‌ها در یک زیستگاه خاص را فراهم می‌کنند، می‌بایست به تعداد محدودی از ژنها وابسته بوده که تنوع آن را نشانگرهای تصادفی نمی‌توانند نشان دهند (van Tienderen و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعه Merila و Crnokrak (۲۰۰۱) نشان داد که بین تنوع صفات کمی با نشانگرهای مولکولی همبستگی بالائی وجود دارد و حتی تنوع در صفات کمی بالاتر بوده که خود نشان می‌دهد در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از ژن‌های با تنوع اکولوژیک بالاتر بهتر از نشانگرهای تصادفی می‌باشد (Merila و Cronkrak، ۲۰۰۱). مطالعات زیادی هم روی تنوع ژنتیکی جمعیتهای ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از نشانگرهای خنثی چون RAPD (Jamshidi و Kalbassi، ۲۰۱۱)، میکروستلایت (Shirangi و همکاران، ۲۰۱۱) و AFLP (حبیبی و کلباسی، ۱۳۸۷) انجام شده است. همچنین بررسی فیلوژنیک و وضعیت ژنتیکی این ماهی توسط Vera و همکاران، (۲۰۱۱) نشان می‌دهد این ماهی به گروه دانوبی گونه *Salmo trutta* تعلق دارد و تفاوت

ژنتیکی معنی داری بین جمعیتهای در حال تکثیر مصنوعی با وحشی ندارند (Vera و همکاران، ۲۰۱۱). از این گذشته، زمانی که جمعیت‌ها در مدت زمان کوتاهی از هم جدا شده باشند، ممکن است تغییراتی را در نشانگرهای خنثی از خود نشان ندهند که در این صورت با استفاده از ژنهای که تحت اثر بهگزینی هستند مثل مجموعه سازگار نسجی[1] (MHC)، می‌توان تفاوت بین جمعیت‌ها را مشاهده کرد (Cohen 2002). برخلاف نشانگرهای خنثی، تنوع بالای MHC نشان دهنده تغییرات تکاملی و سازگاری افراد درون و بین جمعیت‌ها در مواجه با انگل‌های خارجی، بهگزینی نژادی، انتخاب جفت و ارتباط جنین با مولد می-باشد(Edwards و Hedrick، ۱۹۹۸).

از آنجا که یکی از سیاست‌های مهم در ارتقای صنعت آبزی‌پروری کشور، بالا بردن توان تولید با استفاده از گونه‌های بومی مناسب می‌باشد، طی سالهای گذشته تلاش‌های زیادی برای اهلی کردن و معرفی ماهی آزاد دریای خزر به عنوان یکی از گونه‌های پرورشی شده است و در همین راستا تعداد زیادی لارو ماهی آزاد خزر برای اهلی شدن و مولد سازی از مرکز تکثیر کلاردشت به مراکز تحقیقاتی و پرورشی شمال کشور مثل موسسه تحقیقات ماهیان سردابی تنکابن، مرکز تکثیر و پرورش ماهیان آزاد فیروزکوه، مرکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای سوادکوه و غیره منتقل شده و با فراهم کردن شرایط پرورشی این مولدین به عنوان نسل پایه برای تکثیر مصنوعی بهگزینی شده‌اند و و بعد از تخم و اسپرم‌کشی و لقاح mixed-millt تخم‌ها بدست آمده و به عنوان نسل اول (F_1) بدست‌آمده در این مراکز پرورش داده می‌شوند. از طرف دیگر همانطور که گفته شد این گونه از لحاظ اکولوژیک وضعیت مناسبی نداشته و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی آزاد کلاردشت سال‌هاست با تکثیر و رهاسازی لاروهای ۱۰-۱۵ گرمی سعی در حفظ ذخایر این ماهی داشته و ذخایر این ماهی همواره وابسته به این فعالیت‌ها بوده است. با توجه به اینکه یکی از شاخص‌های مهم برای انتخاب جمعیت یک گونه برای آبزی‌پروری، دارا بودن تنوع ژنتیکی

[1] Major Histocampatibility Complex