تشخیص ماهیان قزل‌آلای خال‌قرمز *Salmo trutta* متعلق به رودخانه مردق در رودخانه لیقوان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

ایرج هاشم زاده سقرلو[1]*، حمید فرحمند[2]، اصغر عبدلی[3]، لوئیس برناتچز[4] و محمود کرمی[5]

[1] گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

[2] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

[3] گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

[4] گروه زیست شناسی، دانشگاه لاوال، کبک، کانادا

[5] گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ١٣٩٠/٣/٣٠- تاریخ تصویب: ١٣٩١/٣/٣٠)

چکیده

در این مطالعه جمعیت‌های ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز *Salmo trutta* L. 1758 رودخانه‌های لیقوان و مردق در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی با استفاده از ١٢ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ٥٢ قطعه ماهی از جمعیت‌های یادشده به علاوه ۴۵ نمونه از ماهیان رودخانه‌های بابلرود و هراز مطالعه شد و با توجه به بررسی آلل‌های خصوصی، انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ، تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها (آماره F_{st} =٠/٠۴) و با توجه به گزارش‌های دیگر می‌توان عنوان کرد که در خلال سال‌های ١٣٨٣-١٣٨۶ حداقل باید یک مورد رهاسازی ماهیان قزل‌آلای خال‌قرمز از رودخانه مردق به رودخانه لیقوان انجام شده باشد. این در حالی است که در ماهیان هر دو رودخانه آلل‌های خصوصی مشاهده شد، که اختصاصی بودند و نشان‌دهنده این امر است که در رودخانه لیقوان پیش از انجام عملیات انتقال ماهی، ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز بومی وجود داشته است.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای خال‌قرمز (*Salmo trutta*)، لیقوان، مردق، ریزماهواره، انتقال ماهی

* نویسنده مسئول تلفن: (داخلی ٢٥۴٥) ۶-٠٣٨١-۴۴٢۴۴٠١ فاکس: ٠٣٨١-۴۴٢۴۴٢٣ E-mail: ihashem@nres.sku.ac.ir

مقدمه

زیستگاه‌های ماهیان تحت تأثیر عوامل متعددی در حال تخریب است. افزایش رسوب‌گذاری به علت فعالیت‌هایی نظیر تخریب جنگل‌ها و فرسایش آبخیزها، زیستگاه‌های تولیدمثلی بسیاری از گونه‌های نیازمند به آب تمیز و شفاف و پر اکسیژن را تخریب نموده است (Virijenhoek, 1998). به علاوه پساب‌های کشاورزی، آفت‌کش‌ها، کودها و فاضلاب‌های خانگی به طور فزاینده‌ای به بوم سازگان آبی وارد شده و عرصه را برای بقای آبزیان تنگ‌تر می‌کند. از سوی دیگر احداث سدها برای تأمین آب کشاورزی، آشامیدنی، تولید برقاب و کنترل سیلاب مانعی را در برابر مهاجرت و پراکنش طبیعی ماهیان مهاجر ایجاد کرده و امکان تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه‌های آب شیرین را از بین برده و موجب تجزیه زیستگاه، کاهش اندازه جمعیت‌ها، افزایش درون‌آمیزی، کاهش توان سازگاری، بقا و در نهایت موجب افزایش خطر انقراض جمعیت‌ها می‌شود. به مشکلات یادشده می‌توان مشکلات متعددی نظیر ورود ماهیان غیربومی به محیط‌های بومی سایر ماهیان را افزود، که می‌تواند بواسطه رقابت‌های زیستی، برون‌آمیزی و از بین بردن سازگاری‌های محلی (Hashemzadeh and Abdoli, 2007) برای ماهیان بومی مشکل ساز باشد.

ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز، *Salmo trutta* L. 1758، یکی از گونه‌های مهمی است که اهمیت و طرفداران زیادی را در صید تفریحی دارد (Hashemzadeh and Abdoli, 2007). وجود و حفظ این ماهی در مناطق مختلف کشور و احیای ذخایر آن با روش‌های علمی می‌تواند به نوعی رونق‌بخش صنعت گردشگری و درآمدزایی برای نواحی گردشگری کشور باشد.

قزل‌آلای خال‌قرمز به طور طبیعی در راستای شرق ـ غرب از رودخانه‌های حوزه دریاچه آرال تا ایسلند در اروپا و در راستای شمال ـ جنوب از شمال نروژ و شمال شرق روسیه تا کوه‌های اطلس در شمال آفریقا پراکنش دارد (Bernatchez, 2001). این ماهی دارای اشکال و سازگاری‌های زیستی متفاوتی شامل شکل فرازرو (مهاجر از آب شور و لب شور به آب شیرین رودخانه – *S.trutta caspius*)، دریاچه‌ای (ساکن دریاچه‌های آب شیرین- *S.trutta lacustris*) و رودخانه‌ای (*S. trutta fario*) است (Elliot, 1994). در ایران این ماهی در سه حوضه خزر، دریاچه ارومیه و دریاچه نمک در جنوب البرز پراکنده است (Abdoli, 2000).

جمعیت‌های این ماهی دارای تنوع ریختی بالایی هستند (Ferguson and Taggart, 1991) و این انعطاف‌پذیری فنوتیپی در بسیاری از موارد موجب مطرح شدن مباحث رده‌بندی در این زمینه شده است. در ایران ماهیان قزل‌آلای خال‌قرمز در رودخانه لیقوان تبریز از نظر تعداد خال‌های قرمز دارای فنوتیپ متفاوتی در مقایسه با سایر قزل‌آلاهای خال‌قرمز هستند و برخی از پژوهشگران معتقدند، ممکن است این ماهی زیرگونه خاصی از قزل‌آلای خال‌قرمز باشد (Abdoli, 2000).

جمعیت‌های ماهی آزاد دریای خزر، *S. trutta caspius*، که هم گونه قزل‌آلای خال‌قرمز است، به علت صید بی‌رویه و از بین رفتن زیستگاه‌ها رو به کاهش گذاشته است (Abdoli, 2000) و این امر حفاظت و مدیریت ذخایر این ماهی با ارزش را ضروری می‌سازد. شیلات ایران با تأسیس مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر در کلاردشت اقدام به تکثر و بازسازی ذخایر این ماهی نموده است.

در همه رودخانه‌های ایران ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز مورد حفاظت قرار گرفته و صید تفریحی آن منوط به اخذ مجوزهای صید است. در زمینه ضرورت حفاظت و مدیریت ذخایر یا جمعیت‌های هر گونه، موضوعاتی مطرح می‌شود که یکی از مهمترین آنها که در مبحث حفاظت و مدیریت گونه‌ها مدنظر است و در برنامه‌ریزی‌های مدیریت ذخایر مطرح می‌شود، تعریف واحدهای مدیریتی (Management units) یا واحدهای مهم از نظر تکاملی (Evolutionary significant units) است (Hallerman, 2003). جمعیتی از یک گونه که دارای مهاجرت بسیار کم بوده و یا اساساً ارتباطی با سایر جمعیت‌ها ندارد و از نظر ژنتیکی نسبت به سایر جمعیت‌های آن گونه متمایز است،

یک واحد مدیریتی است (Freeland, 2005) که اختصاص مدیریت و تلاش‌های حفاظتی مجزا را ضروری می‌سازد (Frankham, 2004). یکی از معیارهای انتخاب جمعیت‌های مناسب برای تقویت جمعیت‌های تحت مدیریت (در صورت کوچک بودن اندازه جمعیت مورد نظر) انتخاب جمعیتی است که دارای بیشترین شباهت بوم‌شناختی و ژنتیکی به جمعیت مورد نظر باشد (Hallerman, 2003)، اما در سال‌های گذشته سازمان شیلات ایران اقدام به نقل و انتقال ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز از سد لار (رودخانه هراز) به رودخانه‌های واقع در آذربایجان نموده است که این عملیات مدیریتی می‌تواند برای جمعیت‌های ساکن منطقه مخرب باشد (Hashemzadeh and Abdoli, 2007).

در این مطالعه برای تشخیص رهاسازی ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز در رودخانه‌های آذربایجان، دو رودخانه محل زیست این گونه با در نظر گرفتن ماهیان رودخانه هراز به عنوان منشأ ماهیان انتقال یافته به آذربایجان سعی شد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای رهاسازی‌های احتمالی ماهی در رودخانه‌های مردق و لیقوان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

محل نمونه‌برداری

عملیات نمونه‌برداری در اواخر تابستان و اوایل پائیز سال ۱۳۸۶ در رودخانه‌های لیقوان (تبریز - دامنه شمالی کوه سهند)، مردق (مراغه - دامنه جنوبی کوه سهند) و هراز انجام شد (شکل ۱). مختصات جغرافیایی رودخانه‌های محل صید ماهیان در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول (۱) مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری

محل نمونه‌برداری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	تعداد نمونه	حوضه
رودخانه لیقوان	۴۶:۲۷:۲۱	۳۷:۴۹:۴۸	۳۲	ارومیه
رودخانه مردق	۴۶:۲۴:۰۰	۳۷:۲۰:۰۰	۲۰	ارومیه
رودخانه هراز	۵۲:۰۲:۴۳	۳۵:۵۰:۵۳	۲۰	خزر

شکل (۱) نقشه پراکنش نمونه های مورد استفاده در این مطالعه

نمونه‌گیری

در این مطالعه نمونه‌گیری در رودخانه‌های هراز (حوضه دریای خزر) و مردق و لیقوان (حوضه دریاچه ارومیه) با استفاده از الکتروشوکر انجام شد. برای اجتناب از نمونه‌برداری ماهیان خویشاوند (در مورد ماهیان زیر یک سال)، عملیات صید در طولی بیشتر از ۱۰۰ متر انجام شد (Hansen *et al*., 1997). باله سینه‌ای و شکمی سمت راست ماهیان صید شده، قطع گردیده و در الکل اتانل ۹۶٪ جهت بررسی نگهداری شد. جهت استخراج DNA از روش استخراج نمک (Aljanabi and Martinez, 1997)

استفاده شد. کیفیت DNA موجود در نمونه‌های استخراج شده ابتدا بواسطه الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شده و مقدار DNA با استفاده از دستگاه طیف‌سنج قطره‌ای (NanoDrop) در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای انجام بررسی‌های ریزماهواره‌ای جمعیت‌های مورد نظر از ۱۲ نشانگر ریزماهواره دارای نشان فلوروسانت استفاده شد (جدول ۲).

عملیات تکثیر هرکدام از نشانگرهای ریزماهواره‌ای در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۸۰-۷۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ پیکومول از هریک از پرایمرهای پیشرو و پسرو، 1X بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مول کلریدمنیزیم، ۰/۲۵ میلی‌مول dNTPs، ۰/۲۵ واحد آنزیم بیوتگ DNA پلیمراز ۵ واحد بر مایکرولیتر و ۶/۵۸ مایکرولیتر آب مقطر به صورت PCR منفرد با استفاده از دستگاه ترموسایکلر PTC100 (MJ Research) و ترموسایکلر 2720، (Applied Biosystem) انجام شد. چرخه دمایی واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) شامل یک چرخه ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال خاص هر پرایمر (جدول۲) و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

جدول (۲) مشخصات جایگاه های ریزماهواره ای مورد استفاده

ریزماهواره	پرایمرها	دمای اتصال پرایمرها (درجه سانتی‌گراد)	دامنه اندازه آلل‌ها (جفت باز)	منبع
Bs131	5'-CACATCATGTTACTGCTCC-3' 5'-CAGCCTAATTCTGAATGAG-3'	۵۰	۱۴۶-۱۶۴	(Estoup *et al.*, 1998)
OneU9	5'-CTC TCT TTG GCT CGG GGA ATG TT-3' 5'-GCA TGT TCT GAC AGC CTA CAG CT-3'	۵۵	۱۸۸-۲۰۸	(Scribner *et al.*, 1996)
Ssa197	5'-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG-3' 5'-TGGCAGGGATTTGACATAAC-3'	۶۰	۱۲۸-۱۶۴	(O'Reilly *et al.*, 1996)
Ssa407	5'-ACCAACCTGCACATGTCTTCTATG-3' 5'-GCTGCCGCCTGTTGTCTCTTT-3'	۵۵	۲۰۶-۳۲۶	(Cairney *et al.*, 2000)
Ssosl417	5'-TTGTTCAGTGTATATGTGTCCCAT-3' 5'-GATCTTCACTGCCACCTTATGACC-3'	۵۲	۱۶۴-۱۹۰	(Slettan *et al.*, 1995)
Ssosl438	5'-GACAACACACAACCAAGGCAC-3' 5'-TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT-3'	۵۵	۹۴-۱۰۴	(Slettan *et al.*, 1996)
Str15INRA	5'-*GTT T*CT CTG TGA CAG GTG GAT CAC TC-3' 5'-TCC TCT ACT GAA GGG ATT TGC-3'	۵۸	۱۷۴-۱۸۶	(Swatdipong, 2009)
Str543	5'-CGG AAT GCC ATT TTT CAC TC-3' 5'-*GTT T*GC CAC GTT CTA CAG TCA GC-'3	۵۸	۲۹۸-۳۱۴	(Swatdipong, 2009)
Str60INRA	5'-CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC-3' 5'-GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC-3'	۵۵	۸۴-۹۴	(Estoup *et al.*, 1993)
Str73INRA	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAACTAGACCTA-3'	۵۸	۱۳۸-۱۴۴	(Estoup *et al.*, 1993)
Str85INRA	5'-*GTT T*GA GGA AGG AAG GGA GAA AGG-3' 5'-CCT ATT ATA TGC TCT CCC AGT GC-3'	۵۵	۲۱۸-۲۲۲	(Swatdipong, 2009)
Strutta58	5'-TGT GTG GAA TAT GGG ACA TTG-3' 5'-*GTT T*AC AGG AGC AAC TGC AGC AC-3'	۵۰	۲۶۶-۳۳۲	(Swatdipong, 2009)

پس از تکثیر ریزماهواره‌های مورد بررسی موفقیت عملیات تکثیر بواسطه الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی شده و سپس عملیات خواندن ژنوتیپ ها با استفاده از دستگاه ABI3130 انجام شد. پس از پایان یافتن عملیات خواندن ژنوتیپ‌ها توسط دستگاه، داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار GeneMapper4.0 مشاهده شده و نتایج عملیات تعیین ژنوتیپ ویرایش شد. پس از ویرایش ژنوتیپ‌ها، نتایج به صورت جدول اطلاعات آللی برای بررسی‌های بعدی بدست آمد.

بررسی‌های آماری

جدول اطلاعات آللی ایجاد شده توسط برنامه GeneMapper 1.2 با استفاده از Excel Microsatellite Toolkit 3.1.1 (Park, 2001) به فایل‌های مورد استفاده در نرم‌افزار GenePop V4 و FSTAT293 تبدیل شد. برای بررسی روابط هاردی-واینبرگ (Hardy-Weinberg) و میزان تمایز در بین جمعیت‌های مورد مطالعه از نرم‌افزار Genepop V4 (Raymond and Rousset, 1995)، برای تطبیق افراد به جعیت‌ها از نرم‌افزار baps5 و برای محاسبه پارامترهای تنوع ژنتیکی از نرم‌افزار FSTAT293 استفاده شد.

نتایج

بر اساس آزمون هاردی-واینبرگ جمعیت‌های مورد مطالعه در تعادل بودند ($P\leq ۰/۰۱$). تنها جمعیت لیقوان در مورد آلل Strutta58 در تعادل نبود. اما با توجه به این که عدم تعادل این جایگاه تأثیر قابل توجهی در تعادل جمعیت در رابطه با مجموع آلل‌ها نداشت، این جایگاه نیز در بررسی‌ها مد نظر قرار گرفت (جدول۳).

تمایز جمعیت‌ها

بر اساس آماره F_{st} محاسبه شده برای جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت رودخانه هراز و بابلرود و رودخانه‌های مردق و لیقوان دارای تمایز ژنتیکی بالایی می‌باشند. بر اساس این نتایج جمعیت رودخانه لیقوان نسبت به جمعیت‌های رودخانه‌های مردق و هراز دارای ضریب تمایز ۰/۰۴ و ۰/۵ بوده و میزان تمایز جمعیت روخانه مردق نسبت به جمعیت رودخانه هراز ۰/۴۷ بود. تمایز جمعیت رودخانه مردق از جمعیت رودخانه لیقوان قابل توجه نبود (جدول ۴). تمایز جمعیت رودخانه بابلرود نسبت به سایر جمعیت‌های بیشتر بود.

جدول (۳) شاخص های تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه- N: اندازه نمونه، A: تعداد آلل در هر جایگاه، A_R: غنای آللی، A_{pr}: فراوانی آلل‌های خصوصی، H_e: ناخالصی مورد انتظار، H_o: ناخالصی مشاهده شده و P_{HW}: سطح اطمینان انحراف از تعادل هاردی واینبرگ

جمعیت	N	A	A_R	A_{pr}	H_e	H_o	P_{HW}
خزر							
هراز	۱۸	۳/۸۳	۱/۷۸۳	۲۷	۰/۳۳۸	۰/۳۱۸	NS*
بابلرود	۲۴	۱/۵۸	۱/۱۴۲	۵	۰/۰۷۱	۰/۰۷۱	NS
ارومیه							
لیقوان	۳۲	۲/۵	۱/۶۰۶	۲	۰/۲۸۳	۰/۲۶۱	NS
مردق	۱۹	۲/۸۳	۱/۶۲۳	۵	۰/۲۷۶	۰/۲۷۴	NS

جدول (۴) تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس آماره F_{st}

جمعیت	بابلرود	هراز	لیقوان
بابل رود	۰		
هراز	۰/۷۲	۰	
لیقوان	۰/۷۳	۰/۵۰	۰
مردق	۰/۷۵	۰/۴۷	۰/۰۴

تطبیق افراد به جمعیت‌های مبدأ

با تطبیق افرادی که به صورت تصادفی نمونه‌برداری شده بودند به جمعیت‌های مبدأ با استفاده از روش Trained Clustering، افراد نمونه‌برداری شده از رودخانه‌های بابلرود، هراز، لیقوان و مردق به ترتیب با صحت ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۸۱٪ و ۵۰٪ به جمعیت‌های مبدأ انطباق داده شدند (جدول۵).

جدول (۵) انطباق افراد به جمعیت‌های مبدأ

جمعیت	بابلرود	هراز	لیقوان	مردق	درصد تطبیق صحیح
بابلرود	۱۲	۰	۰	۰	۱۰۰
هراز	۰	۱۰	۰	۰	۱۰۰
لیقوان	۰	۰	۹	۲	۸۱
مردق	۰	۰	۴	۴	۵۰
مجموع	۱۲	۱۰	۱۳	۶	۸۲/۸

بحث

جمعیت‌های مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشتند، که این امر نشان‌دهنده عدم وجود زیرساختارهای جمعیتی (Knutsen *et al.*, 2001) در نقاط نمونه‌برداری شده و عدم وجود مهاجرت از سایر جمعیت‌های احتمالی (Hallerman, 2003) ساکن مناطق مورد مطالعه است. اما در مورد جایگاه Strutta58 در جمعیت لیقوان که در تعادل هاردی ـ واینبرگ قرار ندارد و با توجه به تعاریف و شروط مدل هاردی ـ واینبرگ (Hallerman, 2003) باید عنوان کرد که در این جمعیت احتمالاً یکی از شروط برقراری مدل یادشده نقض شده است (مثلاً وجود انواعی از مهاجرت).

براساس معیارهای موجود می‌توان مقدار تمایز جمعیت‌ها را براساس آماره F_{st} در سه گروه تمایز ناچیز ($F_{st}\leq$۰/۰۵)، تمایز متوسط (۰/۰۵< F_{st}<۰/۲۵) و تمایز قابل توجه (F_{st} >۰/۲۵) طبقه‌بندی نمود (Freeland, 2005). نتایج نشان داد که جمعیت‌های رودخانه‌های لیقوان، مردق، بابلرود و هراز متفاوت هستند. اما جمعیت‌های رودخانه مردق و لیقوان، دارای تمایز قابل توجهی نبودند که این امر با توجه به ماهیت آماره F_{st}، می‌تواند نشان‌دهنده نوعی تبادل در بین این دو جمعیت در گذشته نزدیک (چند سال گذشته) باشد، با توجه به وجود موانع طبیعی (وجود کوه سهند و دریاچه شور ارومیه) و فاصله جغرافیایی، احتمال تبادل طبیعی ماهی در بین این دو رودخانه ممکن نیست و باید علت دیگری را جستجو کرد. در مطالعه Knusten *et al.* (2001) در مورد منشأ ترکیبی جمعیت‌های قزل‌آلای خال‌قرمز در رودخانه‌های نروژ نیز مشاهده مشابهی در بین دو جمعیت از جمعیت‌های مطالعه شده گزارش شده است. پژوهشگران یادشده نیز با مشاهده تمایز پایین در بین جمعیت‌های یاد شده، آنها را جمعیت‌هایی تفسیر کردند که دارای منشأ ترکیبی و مشابه هستند. در ایران نیز در مطالعات مشابهی که با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای در مورد جمعیت‌های ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه‌های سردابرود، تنکابن، کرگانرود و ناورود انجام شده است (Vera *et al.*, 2011)، ملاحظه شده است که مقادیر تمایز ژنتیکی در بین جمعیت‌های یاد شده کمتر از مقادیر تمایز مشاهده شده در مطالعه حاضر است، که می‌توان علت این امر را تکثیر مصنوعی و رهاسازی ماهی آزاد دریای خزر در این رودخانه‌ها عنوان کرد. برخلاف مطالعه Vera *et al.* (2011) رودخانه‌های مورد مطالعه در این پژوهش تحت مدیریت و تقویت ذخایر قرار ندارند. در مطالعات دیگر در دانمارک کاهش تمایز ژنتیکی در بین جمعیت‌های قزل‌آلای خال‌قرمز به عنوان یکی از تأثیرات فعالیت‌های رهاسازی ماهی معرفی شده است (Nilsson *et al.*, 2008). تمایز بالایی که در بین جمعیت‌های رودخانه‌های هراز و بابلرود در حوزه خزر مشاهده شد، می‌تواند طبیعی باشد، زیرا در مطالعاتی که در مورد جمعیت‌های قزل‌آلای خال‌قرمز در اروپا انجام شده است (Antunes *et al.*, 2006) در محدوده جنوبی پراکنش جمعیت‌های قزل‌آلای خال‌قرمز به علت محدودیت‌های بوم‌شناختی مثل محدودیت‌های دمایی در برابر مهاجرت بین جمعیت‌ها، مقدار تمایز آنها افزایش می‌یابد. جمعیت‌های ایرانی قزل‌آلای خال‌قرمز هم از جمعیت‌های حاشیه جنوب شرقی قلمروی پراکنش این گونه هستند و مقادیر تمایز بالای آنها نسبت به یکدیگر با مطالعه پژوهشگران یادشده همخوانی داشته و قابل توجیه است.

در بررسی‌های تطبیق افراد نمونه‌برداری شده به صورت تصادفی به جمعیت‌ها، افراد جمعیت‌های نمونه‌برداری شده از رودخانه‌های هراز و بابلرود با صحت ۱۰۰٪ به جمعیت‌های مبدأ خود منتسب شدند که این امر نیز نشان‌دهنده تمایز جمعیت‌های مذکور از هم و از جمعیت‌های رودخانه‌های لیقوان و مردق است، اما در مورد جمعیت‌های مردق و لیقوان تنها ۵۰ درصد از افراد نمونه رودخانه مردق به طور صحیح به نمونه رودخانه مردق منتسب شدند و در مورد نمونه جمعیت رودخانه لیقوان مقدار تطبیق صحیح برابر با ۸۱ درصد است و تطبیق‌های غیرصحیح تنها در بین این دو رودخانه انجام شده است، که این مشاهده می‌تواند گویای وجود ماهیان مشترک در بین این دو جمعیت باشد و باید عنوان کرد

که تا زمان نمونه‌برداری مربوط به این مطالعه، عملیات رهاسازی ماهی از سد لار (رودخانه هراز) در رودخانه‌های مردق و لیقوان صورت نگرفته است. مورد مشابهی در مطالعات انجام شده توسط Knusten *et al.* (2001) نیز گزارش شده است و ماهیان رودخانه‌های دارای منشأ ترکیبی به نمونه‌های سایر رودخانه‌ها نیز منتسب شده‌اند. البته در مطالعه Knusten *et al.* (2001) جمعیت‌های رودخانه‌های یک سیستم مرتبط مطالعه شده‌اند و در مورد جمعیت‌های مذکور بر خلاف جمعیت‌های ایرانی سطح تمایز عمومی کمتر بوده است. برای تعیین این موضوع که جهت انتقال ماهی در بین رودخانه‌های لیقوان و مردق چگونه بوده است، در کنار این واقعیت که برخلاف سایر جمعیت‌های مطالعه شده، در جمعیت لیقوان جایگاه Strutta58 در زمان نمونه گیری در تعادل نبود، می‌توان گفت که عملیات انتقال ماهی از رودخانه مردق صورت گرفته است و عدم تعادل مشاهده شده به علت رهاسازی یا ورود ماهیان رودخانه مردق (مهاجرت مصنوعی) به رودخانه لیقوان در زمانی نزدیک به زمان نمونه‌برداری بوده است، زیرا عدم تعادل با گذشت یک نسل پس از رهاسازی و تولید نسل جدید، در صورت ادامه نیافتن معرفی ماهیان غیربومی برطرف شده و تعادل مجدداً در جمعیت ایجاد می‌شود (Hallerman, 2003). این نتیجه‌گیری را می‌توان با استناد به بررسی‌های مورفولوژیک انجام شده در مورد همین نمونه‌ها نیز تأیید کرد (Hashemzadeh, 2010). در بررسی‌های مورفولوژیک مشاهده شد که تعداد خال‌های قرمز در جمعیت رودخانه لیقوان که ۵۴-۴۰۰ عدد گزارش شده است (Saadati, 1977)، به طور متوسط برابر با ۳۹/۳±۱۱۹/۲ (۳۸ تا ۲۰۴ خال قرمز) بود که میانگین یادشده ظاهرا کاهش یافته است و با توجه به این که تعداد خال‌های قرمز دارای عوامل کنترل‌کننده ژنتیکی نیز است (Skaala and Jostad, 1987; Blanc *et al.*, 1994) و دارای ضریب وراثت‌پذیری ۰/۱±۰/۷ است (Blanc *et al.*, 1994)، می‌توان عنوان نمود که این کاهش میانگین تعداد خال‌ها ممکن است به علت ترکیب با ماهیان غیربومی نیز باشد. سایر ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیز نشان‌دهنده شباهت قابل توجه ماهیان رودخانه‌های لیقوان و مردق هستند (Hashemzadeh, 2010).

بررسی آلل‌های خصوصی نیز می‌تواند در مشخص کردن این که آیا جمعیت ماهیان لیقوان قبل از رهاسازی منقرض شده است یا خیر اطلاعات مفیدی را در اختیار قرار دهد. زیرا در هر جمعیت معمولاً آلل‌هایی وجود دارد که مختص آن جمعیت هستند. در مقایسه رودخانه‌های لیقوان و مردق مشاهده شد که در رودخانه مردق ۵ و در رودخانه لیقوان ۲ آلل خصوصی وجود دارد. این در حالی است که در مجموع در دو رودخانه مردق و لیقوان تعداد ۲۱ آلل وجود دارد که در حوزه خزر مشاهده نشده است. با این اوصاف با توجه به مشاهده آلل‌های خصوصی در رودخانه لیقوان می‌توان نتیجه گرفت که در این رودخانه در مرحله پیش از انجام عملیات رهاسازی، ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز وجود داشته است. این نتیجه با مطالعات Nielsen *et al.* (2001) و Nilsson *et al.* (2008) مطابقت دارد. آنها مشاهده کردند که در تعدادی از رودخانه‌هایی که در آنها ماهی آزاد اقیانوس اطلس و قزل‌آلای خال‌قرمز رهاسازی شده‌اند، هنوز جمعیت‌های وحشی بومی وجود داشته‌اند و حتی پس از رهاسازی ماهیان غیربومی هم تا حدی از فرایند نفوذ ژن‌های غیربومی در امان مانده‌اند (Nielsen *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2008).

با توجه به اصل مدیریت تطبیقی و دانش‌محور (Hashemzadeh and Abdoli, 2007) باید عنوان کرد که هرگونه عملیات بازسازی ذخایر، نقل و انتقال ماهی نیازمند انجام مطالعات مقدماتی است و باید با توجه به شناخت و آگاهی‌های علمی انجام شود (Hallerman, 2003). در این مطالعه مشخص شد که انتقال ماهی در صورتی انجام شده است که پیش از اجرای عملیات رهاسازی ماهی، جمعیت ماهی بومی در رودخانه لیقوان وجود داشته است و این جمعیت با شرایط طبیعی حاکم بر رودخانه سازگاری داشته است. آزادماهیان به طور

طبیعی بواسطه گرایش به تولید مثل در زیستگاه مادری و تمایل به ایجاد سازگاری‌های محلی ممکن است نیازمند مدیریت اختصاصی هر جمعیت باشند (Lehtonen *et al.*, 2009)، لذا ممکن است جمعیت رودخانه لیقوان در اثر اختلاط با جمعیت ماهی قزل‌آلای خال‌قرمز رودخانه مردق دچار فشار برون آمیزی شده (Hashemzadeh and Abdoli, 2007) و شایستگی‌های زیستی را که در رابطه با ویژگی‌های کمی خود در رویارویی با رژیم‌های انتخابی رودخانه لیقوان حاصل کرده است، از دست بدهد. این فرایند در نهایت می‌تواند ضعف جمعیت و مخاطراتی را در پی داشته باشد، که جمعیت را در ورطه انقراض قرار دهد. با توجه به موارد یاد شده می‌توان براساس منابع راه کارهایی را برای انجام عملیات مدیریت ذخایر آبزیان از طریق رهاسازی ماهی و تقویت یا بازسازی ذخایر ارایه داد:

- انجام مطالعات مقدماتی در مورد جمعیت مورد مدیریت شامل مطالعات جمعیت‌شناسی (سرشماری، بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات بوم‌شناختی در محیط زیست تحت مدیریت) و انجام مدیریت از طریق رهاسازی ماهی تنها در زمانی که از بین رفتن ماهیان بومی کاملاً مشخص و قطعی شده باشد (Nilsson *et al.*, 2008).
- در صورت نیاز به رهاسازی ماهی بهتر است اولاً از ماهیان همان رودخانه استفاده شود، اما در صورت نیاز به انتقال و رهاسازی ماهی از سایر مناطق باید، از ماهیان مناطقی استفاده شود که دارای ویژگی‌های جمعیتی، بوم شناختی و ژنتیکی نزدیک‌تری هستند (Hallerman, 2003).

در مورد ماهیان رودخانه لیقوان نیز که یکی از شاخص‌های جمعیت‌های قزل‌آلای خال‌قرمز ایران بوده و سوالات زیادی در مورد رده بندی آن در بین پژوهشگران وجود دارد، بهتر بود قبل از انجام انتقال ماهی و از بین بردن هویت ژنتیکی این جمعیت به مسائل یاد شده توجه بیشتری می‌شد. در عین حال هنوز هم برای بازیابی افراد این جمعیت در ترکیب جدید و مختلط آن می‌توان امیدوار بود. در برخی منابع منتشر شده عنوان شده است که در رودخانه‌های تحت مدیریت و رهاسازی ماهی آزاد اقیانوس اطلس با استناد به نمونه‌های تاریخی مانند نمونه‌های فلس موفق شده‌اند نمونه‌های باقی مانده از ماهیان بومی را در رودخانه‌های مورد مطالعه در بین ماهیان رهاسازی شده شناسایی کنند (Nielsen *et al.*, 2001)، با این شرح باید در مورد جمعیت رودخانه لیقوان نیز عملیات انتقال و رهاسازی ماهی متوقف شود و بدون بررسی‌های مقدماتی از انجام آن خودداری شود. علاوه بر این با توجه به آلل‌های خصوصی و شرایط محیطی متفاوت رودخانه لیقوان باید این رودخانه به عنوان یک واحد مدیریتی مستقل مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

لازم است از آقایان کیاوش گلزاریان پور، روزبه احمدی، حمید نیک سیرت، محمد باباپور، مجید بختیاری و محمد تهرانی به سبب همکاری ارزشمندشان در نمونه‌برداری، و از آقایان کریگ پریمر، آکاراپونگ سواتدی پونگ، ویله آوکی و خانم مری لینکویست جهت ارائه حمایت‌های علمی و آزمایشگاهی که انجام این مطالعه را ممکن ساختند صمیمانه قدردانی شود.

References

- Abdoli, A., 2000. The inland water fishes of Iran. Iranian museum of nature and wildlife. 378 p (in Persian).
- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research 25, 4629–4693.
- Antunes, A., Faria, R., Jhonson, W.E., Guyomard, R., Alexandrino, P., 2006. Life on the edge: persistence and contrasting spatoal genetic structure of distinct brown trout life histories at their ecological limits. Journal of Heredity 97, 193-205.
- Bernatchez, L., 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta*) inferred from

phylogeographic, nested clade, and mismatch analysis of mitochondrial DNA variation. Evolution 55, 351-379.
- Blanc, J.M., Chevassus, B., Krieg, F., 1994. Inheritance of the number of red spots on the skin of the brown trout. Aquatic Living Resources 7, 133-136.
- Cairney, M., Taggart, J.B., Hoyheim, B., 2000. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in - Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. Molecular Ecology 9, 2175-2178.
- Elliot, J.M., 1994. Quantitative Ecology and the Brown trout. Oxford University Press, 286 p.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R., 1993. $(CT)_n$ and $(GT)_n$ microsatellites - a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (Brown Trout). Heredity 71, 488-496.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J. M., Adriamanga, M., Guyomard, R., 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). Molecular Ecology 7, 339-353.
- Ferguson, A., Taggart, J. B., 1991. Genetic differentiation among sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations of Lough Melvin, Ireland. Biol. J. Linn. Soc. 43, 221-237.
- Frankham R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2004. A premier of conservation genetics. Oxford University press, 234 p.
- Freeland, J.R., 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd., 388 p.
- Hallerman, E., (editor) 2003. Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. American fisheries society publications, 475 p.
- Hansen, M.M., Nielsen, E.E., Mensberg, K.L.D., 1997. The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout *Salmo trutta* L. Molecular Ecology 6, 469-474.
- Hashemzadeh, S.I., 2010. Morpho-Genetic comparison among brown trout (*Salmo trutta fario*) populations in Haraz, Liqvan and Mardagh Rivers – Iran. PhD thesis. Department of fisheries. Faculty of natural resources. University of Tehran. (In Persian)
- Hashemzadeh, S. I., Abdoli, A., 2007. The impacts of propagation and release of brown trout, *Salmo trutta fario,* into rivers in Iran. Abzian Magazine No.82. (In Persian)
- Knutsen, H., Knutsen, J.A., Jorde, P.E., 2001. Genetic evidence for mixed origin of recolonized sea trout populations. Heridity 87, 207-214.
- Lehtonen, P., Tonteri, A., Sendek, D., Titov, S., Primmer, C.R., 2009. Spatio-temporal genetic structuring of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations within the River Luga, Northwest Russia. Conservation Genetics 10, 281-289.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Bach, L.A., 2001. Looking for a needle in a haystack: Discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked populations. Conservation Genetics 2, 219-232.
- Nilsson, J., Östergren, J., Lundqvist, H., Carlsson, U., 2008. Genetic assessment of Atlantic salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta* stocking in a Baltic Sea river. Journal of Fish Biology 73, 1201-1215.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnnnell, S.K., Wright, J.M., 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 2292-2298.
- Park, S.D.E., 2001, Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. PhD thesis. University of Dublin.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86, 248-249.
- Saadati, M.A.G., 1977. Taxonomy and distribution of the freshwater fishes of Iran. MSc. thesis. Colorado State University: Fort Collins.
- Scribner, K.T., Gust, J.R., Fields, R.L., 1996. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: Cross-species amplification and population genetic applications. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 833-841.
- Skaala, Ø., Jørstad, K.E., 1987. Inheritance of the fine spotted pigmentation pattern of brown trout. Polskie Archiwum Hydrobiology 35, 295-304.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O., 1995. Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Microsatellites at the Ssosl25,

Ssosl85, Ssosl311, Ssosl417 Loci. Animal Genetics 26, 281-282.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O., 1996. Polymorphic Atlantic salmon, *Salmo salar* L, microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. Animal Genetics 27, 57-58.
- Swatdipong, A., 2009. Conservation genetics of exploited Finnish salmonid fishes. PhD. thesis. University of Turku, Finland.
- Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Pino-Querido, A., Kalbasi, M.R., Martínez, P., 2011. Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. Hydrobiologia 664, 51-67.
- Vrijenhoek, R.C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. Journal of Fish Biology 53, 394-412.

Identification of Brown Trout, *Salmo trutta*, of Mardgh River in Liqvan River (Iran), Using Microsatellite Loci

I. Hashemzadeh Segherloo[1*], H. Farahmand[2], A. Abdoli[3], L. Bernatchez[4] and M. Karami[5]

[1] Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, University of Shahre Kord - Iran, [2] Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj- Iran, [3] Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Research Institute, University of Shahid Beheshty, Tehran- Iran, [4] Institut de Biologie Int´egrative et des Syst`emes, Pavillon Charles-Eug`ene-Marchand, Universit´e Laval, Qu´ebec-Canada, [5] Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj-Iran

(Received: 19-06-2011 - Accepted: 19-06-2012)

Abstract

In this study brown trout *Salmo trutta* populations in Mardagh and Liqvan Rivers from the West and East Azerbaijan provinces (Iran) were studied using 12 microsatellite loci. In total 52 fish from the mentioned populations and 45 fish from Babolrood and Haraz Rivers were analyzed. According to the analysis of the private alleles, Hardy-Weinberg equilibrium test and genetic differentiation between the populations (F_{st}=0.04) and based on other reports, it can be concluded that during the years 2004-2007, there should be at least a case of brown trout transfer from Mardagh to Liqvan River. In both the Liqvan and Mardagh Rivers private alleles specific to each river were observed, indicating that indigenous brown trout were existent in Liqvan River prior to fish transfer.

Keywords: Brown trout (*Salmo trutta*), Liqvan, Mardagh, Microsatellite, Fish transfer

*Corresponding author: Tel: +983814424401 Fax: +983814424423 E-mail: ihashem@nres.sku.ac.ir