

Identification of Caspian salmon *Salmo caspius* (Kessleri, 1877) and rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) escaped from breeding cages on the southern shores of the Caspian Sea using genetic sequencing in the southern basin of the Caspian Sea

Seyedeh Sara Jafari Kenari¹ | Rasoul Ghorbani^{*2} | Hamidreza Rezaei³ |
Rahmatollah Naddafi⁴ | Hadiseh Kashiri⁵ | Francois Pompanon⁶

1. Ph.D. Student of Aquatic Production and Exploitation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: ss.jk.sara@gmail.com
2. Corresponding Author, Professor, Dept. of Aquatic Production and Exploitation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: rasulghorbani@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: hamid.r.rezaei@gmail.com
4. Associate Prof., Dept. of Aquatic Resources, Dept. of Coastal Research, Uppsala University of Agricultural Sciences, Sweden. E-mail: rahmat.naddafi@slu.se
5. Associate Prof., Dept. of Aquatic Production and Exploitation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: hadiskashiri@gmail.com
6. Professor at the University of Grenoble, France. E-mail: francois.pompanon@univ-grenoble-alpes.fr

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 08.27.2021
Revised: 09.01.2021
Accepted: 09.08.2021

Keywords:
Cage,
Caspian Sea,
Caspian Sea salmon,
Genetic sequencing,
Rainbow trout

ABSTRACT

Appearance identification of Caspian salmon (*Salmo caspius* Kessleri, 1877) and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), which may have escaped from breeding cages on the southern shores of the Caspian Sea or breeding grounds and into the sea. In this study, 20 fish from different regions of the Caspian Sea: Bandar Anzali (3 salmon), Tonekabon (4 salmon, 1 rainbow trout), Nowshahr (1 salmon, 1 rainbow mite), Fereydunkenar (3 salmon), Sari (1 salmon, 1 rainbow trout) and Miankaleh (3 salmon, 1 rainbow trout) were caught and used as much as possible using genomic sequencing. He distinguished and identified these two species. Some tail fins were isolated from all samples and fixed in 96% alcohol for DNA extraction and Bioneer extraction column kit was used for DNA extraction. Preliminary results of mitochondrial genome sequencing showed the proximity of the sequenced genome to the species registered in GenBank. Specimens caught in Miankaleh, Sari, Fereydunkenar and Anzali with a very similar appearance to salmon showed high genomic similarity with rainbow trout in sequencing. The rest of the samples showed the same salmon sequence with the appearance of salmon. According to this study, there is a possibility of salmon escaping from breeding cages, which can have a great impact on the ecosystem of the region and aquatic animals, including other species of fish.

Cite this article: Jafari Kenari, Seyedeh Sara, Ghorbani, Rasoul, Rezaei, Hamidreza, Naddafi, Rahmatollah, Kashiri, Hadis, Pompanon, Francois. 2022. Identification of Caspian salmon *Salmo caspius* (Kessleri, 1877) and rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) escaped from breeding cages on the southern shores of the Caspian Sea using genetic sequencing in the southern basin of the Caspian Sea. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (1), 1-16.



شناسایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius* (Kessleri, 1877) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) فرار کرده از قفس‌های پرورشی با استفاده از توالی‌یابی ژن *Cyt b* در حوضه جنوبی دریای خزر

سیده سارا جعفری کناری^۱ | رسول قربانی^{۲*} | حمیدرضا رضایی^۳ | رحمت‌اله ندافی^۴ |
حدیثه کشیری^۵ | فرانسوا پومپانون^۶

۱. دانشجوی دکتری تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: ss.jk.sara@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: rasulghorbani@gmail.com
۳. دانشیار گروه محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: hamid.r.rezaei@gmail.com
۴. دانشیار گروه منابع آبی، بخش تحقیقات ساحلی، دانشگاه علوم کشاورزی افسس، سوئد. رایانامه: rahmat.naddafi@slu.se
۵. دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: hadiskashiri@gmail.com
۶. استاد دانشگاه گرنوبل فرانسه. رایانامه: francois.pompanon@univ-grenoble-alpes.fr

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	تشخیص ظاهری ماهی آزاد دریای خزر، (<i>Salmo caspius</i> (Kessleri, 1877) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Walbaum 1792) که ممکن است از قفس‌های پرورشی مستقر در سواحل جنوبی دریای خزر و یا مراکز تکثیر فرار کرده و به دریا راه یافته باشند، بسیار دشوار است. در این مطالعه، تعداد ۲۰ نمونه ماهی از دریای خزر: بندرانزلی (۳ ماهی آزاد)، تنکابن (۴ ماهی آزاد، ۱ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان)، نوشهر (۱ ماهی آزاد، ۱ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان)، فریدونکنار (۳ ماهی آزاد)، ساری (۱ ماهی آزاد، ۱ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) و میانکاله (۳ ماهی آزاد، ۱ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) صید و با استفاده از توالی‌یابی ژنومی تا حد امکان این دو گونه را از هم تفکیک و شناسایی کرد. از همه نمونه‌ها مقداری باله دمی جدا شده و به منظور استخراج DNA در الکل ۹۶ درصد فیکس شده و برای استخراج DNA از کیت ستونی استخراج شرکت Bioneer استفاده شد. نتایج اولیه توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی درصد نزدیکی ژنوم توالی‌یافته با گونه‌های ثبت شده در GenBank را نشان داد. نمونه‌های صید شده در میانکاله، ساری و فریدونکنار و انزلی با ظاهری بسیار شبیه به ماهی آزاد، در توالی‌یابی شباهت بالای ژنومی را با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند. بقیه
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۵	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۷	
واژه‌های کلیدی:	
توالی‌یابی ژنتیکی، دریای خزر، قفس، ماهی آزاد دریای خزر، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان	

نمونه‌ها با ظاهر ماهی آزاد همان توالی ماهی آزاد را نشان دادند. بر اساس این مطالعه، احتمال فرار قزل‌آلا از قفس‌های پرورشی وجود دارد که می‌تواند اثرات زیادی بر اکوسیستم منطقه و آبیان از جمله گونه‌های دیگر ماهی بگذارد.

استناد: جعفری کناری، سیده سارا، قربانی، رسول، رضایی، حمیدرضا، ندافی، رحمت‌اله، کشیری، حدیث، پومپنون، فرانسوا (۱۴۰۱). شناسایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius* (Kessler, 1877) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) فرار کرده از قفس‌های پرورشی با استفاده از توالی‌یابی ژن *Cyt b* در حوضه جنوبی دریای خزر. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبیان، ۱۱ (۱)، ۱-۱۶.

DOI: 10.22069/japu.2021.19428.1605



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

به‌منظور اعمال مدیریت مسئولانه و منطقی بر منابع، باید ساختار جمعیتی گونه‌ای ماهیان که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم دارای اهمیت اقتصادی هست، مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد (تودلا، ۱۹۹۹). حوضه آبریز کاسپین در جنوب دریای خزر محل زیست حدود ۱۱۵ گونه ماهی است (جولاده رودبار و همکاران، ۲۰۱۵) که بسیاری از آن‌ها نیز دارای ارزش تجاری هستند آزادماهیان (*Salmonidae*) یکی از باارزش‌ترین گونه‌های ماهیان است که به‌صورت طبیعی در نیمکره شمالی کره زمین پراکنده شده‌اند اما امروزه برخی از گونه‌های آن جهت مقاصد پرورشی به اغلب نقاط جهان معرفی شده است (وان در لان و فریک، ۲۰۲۱)، این ماهیان اغلب متعلق به مناطق سردسیری و یا معتدله می‌باشند، و به همین جهت به آن‌ها ماهیان سردآبی اطلاق می‌گردد، خانواده آزادماهیان دارای ۱۱ جنس و حدود ۲۴۷ گونه هست (فریک و همکاران، ۲۰۲۱) جنس *Salmo* Linnaeus, 1758 یکی از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده به دلیل نادر و در معرض خطر انقراض بودن است و گونه ماهی آزاد دریای خزر *Salmo caspius* (کسلری، ۱۸۷۷) است (وطن‌دوست و همکاران، ۲۰۱۴)، این گونه بزرگ‌ترین نمونه از قزل‌آلای دریایی در حوضه کاسپین است که در مواردی با وزن بیش از ۴۵ کیلوگرم در زمان مهاجرت تخم‌ریزی در رودخانه منتهی به دریای خزر (رودخانه کورا در کشور آذربایجان) صید شده است. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) نیز عضو مهم دیگری از این خانواده می‌باشد. این ماهی یکی از مهم‌ترین گونه ماهیان آب شیرین است که سهم بالایی در تأمین غذای انسان دارد (ستاری و همکاران، ۲۰۰۳) و به‌عنوان گونه اصلی در اکثر کارگاه‌های تکثیر و

پرورش ماهیان سردآبی در بیش‌تر نقاط جهان درآمده است.

تشخیص ظاهری *Salmo caspius* و *Oncorhynchus mykiss* که ممکن است از قفس‌های پرورشی و یا مراکز تکثیر فرار کرده باشند و به دریا راه‌یافته باشند، بسیار سخت و دشوار است و تا حد زیادی این دو گونه باهم اشتباه گرفته می‌شوند. از تبعات منفی فرار گونه‌های پرورشی به آب‌های آزاد می‌توان به تولید گونه‌های هیبرید اشاره نمود، این روند می‌تواند خلوص ژنتیکی و ذخایر گونه‌ای آزادماهیان را در حوضه جنوبی خزر دستخوش تغییرات اساسی قرار دهد. از این‌رو انجام مطالعات برای شناسایی گونه‌ها و هیبریدها با استفاده از توالی‌یابی ژنتیکی گونه‌ای ضروری به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین به‌منظور بهبود مدیریت ارزیابی ذخایر آبزیان، شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیتی، مهاجرت و عوامل محیطی تأثیرگذار با توجه به نوع گونه اهمیت دارد. هرچه دانش ما از جمعیت‌ها و تنوع درون‌گونه‌ای بیش‌تر باشد، تلاش برای حفاظت از آن‌گونه موفقیت‌آمیزتر است (جنتی و همکاران، ۲۰۱۳).

جمعیت‌ها در حقیقت مجموعه متنوعی از ژن‌ها هستند که عواملی هم‌چون فاصله نسل‌ها، صید بی‌رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاه‌ها منجر به کاهش اندازه مؤثر جمعیت‌ها و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر شده و خطر انقراض را افزایش می‌دهد (ذوالقرنین و همکاران، ۲۰۱۰). به‌علت بزرگ بودن اندازه مؤثر جمعیت ماهیان دریایی و جریان ژنی محدود در آب‌های شیرین، ماهیان دریایی در مقایسه با ماهیان آب شیرین و تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین‌تری را نشان می‌دهند (برایت و همکاران، ۲۰۰۵).

به‌دلیل اهمیت ماهی آزاد دریای خزر و با توجه به فقدان اطلاعات لازم در زمینه تأثیر عوامل

متفاوت‌اند، به‌طورکلی برای جمعیت طبیعی زیان‌آور است (آتر و همکاران، ۱۹۹۳).

به دلیل کمبود نمونه‌های دریایی و دشوار بودن تشخیص تمایز گونه‌های پرورشی فرار کرده از قفس‌های پرورشی در دریا با گونه‌های دریایی، کمبود اطلاعات و ذخیره ژنتیکی در ایران سعی می‌شود با استفاده از داده‌های ژنتیکی خلوص گونه‌ها، در صورت بروز تبادل ژنتیکی بین گونه‌های وحشی و اهلی موردبررسی قرار گیرد. بسیاری از ماهیان قزل‌آلا فرار کرده از قفس و یا کارگاه‌های تکثیر، بعد از مدتی در دریا بودن ظاهری بسیار شبیه به ماهی آزاد پیدا می‌کنند و تشخیص این دو گونه از هم از روی خصوصیات ظاهری بسیار کاری مشکل و سخت خواهد بود. بدین‌منظور برای شناسایی و تشخیص این دو گونه از هم احتیاج به روش‌های دیگری مثل توالی‌یابی ژنتیکی می‌باشد. از این‌رو در این مطالعه سعی شده است با استفاده از توالی‌یابی ژنومی تا حد امکان این دو گونه را از هم تفکیک و شناسایی کرد.

مواد و روش‌ها

در مسیر مطالعه بر روی دو گونه قزل‌آلا و ماهی آزاد، تعداد ۲۰ نمونه از مناطق حوضه جنوبی دریای خزر به ترتیبی که در جدول ۱ آمده است، نمونه‌ها صید شدند. محل حدودی مناطق نمونه‌برداری در شکل ۱ مشخص شده است.

اکولوژیکی بر ساختار جمعیت‌های آن در دریای خزر، در این مطالعه سعی شده با استفاده از اطلاعات صید، داده‌های ژنتیکی، پراکنش و تشخیص ماهی آزاد بومی دریای خزر از گونه‌های پرورشی در سواحل جنوبی خزر (استان گلستان، مازندران و گیلان) فراهم شود. مطالعات فرار گونه‌های بالغ نشان داده است که آن‌ها می‌توانند با موفقیت رشد کنند، یا به‌طور متداول در رودخانه‌هایی که وارد می‌شوند، بیش‌تر با ماهی بومی متصل شوند، بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت بومی را تغییر دهند (کروزیر، ۱۹۹۳؛ کلیفورد و همکاران، ۱۹۹۷ ب). انتقال ژن‌های گونه‌های غیربومی به گونه‌های بومی ممکن است اثرات منفی بر سازگاری، بهره‌وری و ذخایر جمعیت گونه‌های بومی داشته باشد.

کلیفورد و همکاران (۱۹۹۷) نشان داده‌اند که نوجوانان ماهی آزاد فرار کرده از یک واحد پرورشی به یک رودخانه چرخه حیات خود را به‌طور کامل با موفقیت تکمیل کرده، کاملاً به آن عادت کرده، تکثیر کرده و با نژاد ماهی آزاد بومی در آن رودخانه نیز متصل و تکثیر شده است. به‌طور مشابه، مطالعات فرار از بزرگ‌سالان نشان داده است که آن‌ها می‌توانند با موفقیت رشد کنند، یا به‌طور متداول در رودخانه‌هایی که وارد می‌شوند، بیش‌تر با ماهی بومی متصل شوند، بنابراین ساختار ژنتیکی جمعیت بومی را تغییر دهند (کروزیر، ۱۹۹۳؛ کلیفورد و همکاران، ۱۹۹۷ ب). براساس نتایج آتر و همکاران (۱۹۹۳) تکثیر بین نژادهای ماهیان آزاد که از نظر ژنتیکی



شکل ۱- محل‌های نمونه‌برداری.

جدول ۱- شرح مناطق و نمونه‌های صید شده.

شماره	منطقه صید	تعداد	نوع گونه
۱	فریدونکنار	۱	آزاد
۲	فریدونکنار	۱	آزاد
۳	انزلی	۱	آزاد
۴	ساری	۲	قرل‌آلای رنگین کمان
۵	میانکاله	۳	آزاد
۶	فریدونکنار	۱	آزاد
۷	ساری	۱	آزاد
۸	انزلی	۱	آزاد
۹	تنکابن	۱	آزاد
۱۰	نوشهر	۲	آزاد. قرل‌آلای رنگین کمان
۱۱	تنکابن	۱	آزاد
۱۲	میانکاله	۱	قرل
۱۳	تنکابن	۱	آزاد
۱۴	انزلی	۱	آزاد
۱۵	تنکابن	۲	آزاد. قرل‌آلای رنگین کمان

نمونه‌ها از کیت استخراج ستونی شرکت Bioneer استفاده شد.

به‌منظور تکثیر ژن میتوکندریایی *Cytb* ماهی آزاد و دریای خزر و قزل‌آلای رنگین‌کمان، از آغازگرهای اختصاصی زیر برای تکثیر قطعه موردنظر در دستگاه ترموسایکلر استفاده شد:

SalmoF : 5' CCAGCACCHTCTAAYATCTCAGT 3'

SalmoR : 5' AAGAAAGATGCYCCGTTTRGC 3'

پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ استفاده شد. که در شکل ۱ مشخص است. جمعیت‌های مورد مطالعه از لحاظ ژنتیکی از یکدیگر تمایز یافته و در یک خوشه قرار نگرفتند. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تمایز ریختی جمعیت‌ها در مناطق مورد مطالعه بیش‌تر متأثر از نقش عوامل ژنتیکی بوده است.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تعداد ۲۰ نمونه ماهی‌های آزاد (*Salmo caspius*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از حوضه جنوبی دریای خزر و مراکز تکثیر و قفس‌های پرورشی مستقر در دریا، قطعه‌ای به طول حدود ۲۰۰ جفت باز از ژن سیتوکروم b برای نمونه‌ها به‌دست آمد. در جدول زیر درصد نزدیکی توالی‌های نمونه‌ها با گونه‌های ثبت‌شده در GenBank نشان داده شده است.

تفاوت ظاهری ماهی آزاد و قزل‌آلا در حالت عادی و پرورشی بسیار متفاوت است (شکل‌های ۲ و ۳)، ولی زمانی که قزل‌آلای رنگین‌کمان در محیط لب‌شور مثل دریا قرار بگیرد، به‌عنوان مثال در قفس‌های دریایی پرورش یابد، از نظر ظاهری بسیار شبیه به هم خواهند شد، به‌طوری‌که تشخیص و تفکیک ظاهری آن‌ها بسیار سخت و مشکل خواهد بود. نتایج این مطالعه این موضوع را تأیید می‌کند.

هم‌چنین ۳ نمونه بچه‌ماهی انگشت‌قد ماهی *Salmo caspius* و *Oncorhynchus mykiss* از مراکز تکثیر پرورش شهر تنکابن تهیه گردید. از نمونه‌ها قسمتی از باله دمی جدا نموده و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت گردید، سپس برای انجام مطالعات بعدی به آزمایشگاه منتقل شد. برای استخراج DNA از

واکنش PCR به‌صورت زیر برای تکثیر ژن سیتوکروم b به اجرا درآمد. واسرشتگی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، الحاق دو رشته DNA در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط اولیه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت پس از اتمام ۴۰ چرخه مرحله بسط نهایی به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. و سپس برای انجام توالی‌یابی به روش سنگر به شرکت ژن فن آوران ارسال شدند.

بازنگری توالی‌ها با نرم‌افزار BioEdite و هم‌ردیفی (Align) با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد. شاخص‌های تنوع نوکلئوتیدی، جایگاه‌های چندشکلی (polymorphic sites)، انتقالی (transitions) و متقاطع (transversions)، تنوع هاپلوتایپی و واریانس آن‌ها بر اساس مدل (Nei, 1987) شاخص گاما به‌منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین نمونه‌های موردبررسی، درصد ترکیب نوکلئوتیدی، تست بی‌طرفی تاجیما (test of Tajima, 1989-D) با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 3.1 انجام شد. برای ترسیم درخت فیلوژنی به روش Maximum Likelihood و



شکل ۲- نمایی از ماهی آزاد دریای خزر.

اقتباس از:

Jouladeh Roudbar, A., Farahmand, H., Abed-Elmdoust, A.R., Mojazi Amiri, B. 2021. Distribution, Conservation Status and Identification Key of *Luciobarbus Heckel 1843* in Iran. 10: 77-92. 10.30473/EAB.2021.54891.1800.



شکل ۳- نمایی از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

اقتباس از:

Jouladeh Roudbar, A., Farahmand, H., Abed-Elmdoust, A.R., Mojazi Amiri, B. 2021. Distribution, Conservation Status and Identification Key of *Luciobarbus Heckel 1843* in Iran. 10: 77-92. 10.30473/EAB.2021.54891.1800.

جدول ۲- درصد نزدیکی ژنوم توالی‌یافته با گونه‌های ثبت شده در GenBank.

ردیف	منطقه صید	تعداد	گونه شناسایی شده با استفاده ویژگی‌های ریختی	درصد شباهت به <i>O. mykiss</i>	درصد شباهت به <i>S. caspius</i>
۱	فریدونکنار	۱	آزاد	۹۵/۱۷ درصد	
۲	فریدونکنار	۱	آزاد	۹۴/۲۴ درصد	
۳	انزلی	۱	آزاد		۹۸/۳۹۵ درصد
۴	ساری	۲	قزل‌آلای رنگین‌کمان	۹۴/۲۴ درصد	
۵	میانکاله	۳	آزاد	۹۴/۴۵ درصد	
۶	فریدونکنار	۱	آزاد		۹۷/۷۹ درصد
۷	ساری	۱	آزاد		۹۷/۲۶ درصد
۸	انزلی	۱	آزاد		۹۵/۸۰ درصد
۹	تنکابن	۱	آزاد		۹۸/۹ درصد
۱۰	نوشهر	۲	آزاد. قزل‌آلای رنگین‌کمان		۹۵/۸۰ درصد
۱۱	تنکابن	۱	آزاد	۹۶/۳۸ درصد	
۱۲	میانکاله	۱	قزل		۹۵/۱۵ درصد
۱۳	تنکابن	۱	آزاد	۹۰/۱۷ درصد	
۱۴	انزلی	۱	آزاد		۹۵/۱۵ درصد
۱۵	تنکابن	۲	آزاد. قزل‌آلای رنگین‌کمان	۹۵/۹۳ درصد	

نشان دادند. تعداد جایگاه‌های مورد استفاده برای محاسبه فاصله با سطح مورد اجازه از داده‌های از دست رفته (۰/۰۵) ۱۵۱ جایگاه به‌دست آمد. تنوع ژنتیکی به‌دست آمده برای جایگاه‌های پلی‌مورف در جدول ۲ ارائه شده است.

با توجه به نتایج مندرج در جدول ۲ نمونه‌های صیدشده در میانکاله، ساری، فریدونکنار و انزلی اگرچه از لحاظ ظاهری بسیار شبیه به ماهی آزاد بودند، اما با توجه به نتایج توالی‌یابی ژن *Cyt b* شباهت با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را نشان دادند. اما نمونه‌هایی با ظاهر ماهی آزاد همان توالی ماهی آزاد را

جدول ۳- تنوع استاندارد جایگاه‌های پلی‌مورفی.

میانگین تعداد ژن کپی شده	۱۹/۳۲ ± ۲/۶۳
تعداد آلل	۳/۶۰۹ ± ۰/۱۵۴

با توجه به سطح هاپلوتایپی، مجموع فرکانس توالی‌ها با ۰/۴۷ به‌دست آمد. میزان تنوع ژنتیکی، پلی‌مورفیسم در لوکوس‌ها، تعداد انتقال‌ها و واژگونی‌ها در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع مولکولی، جایگاه‌های چند شکلی، انتقالی و مقاطع.

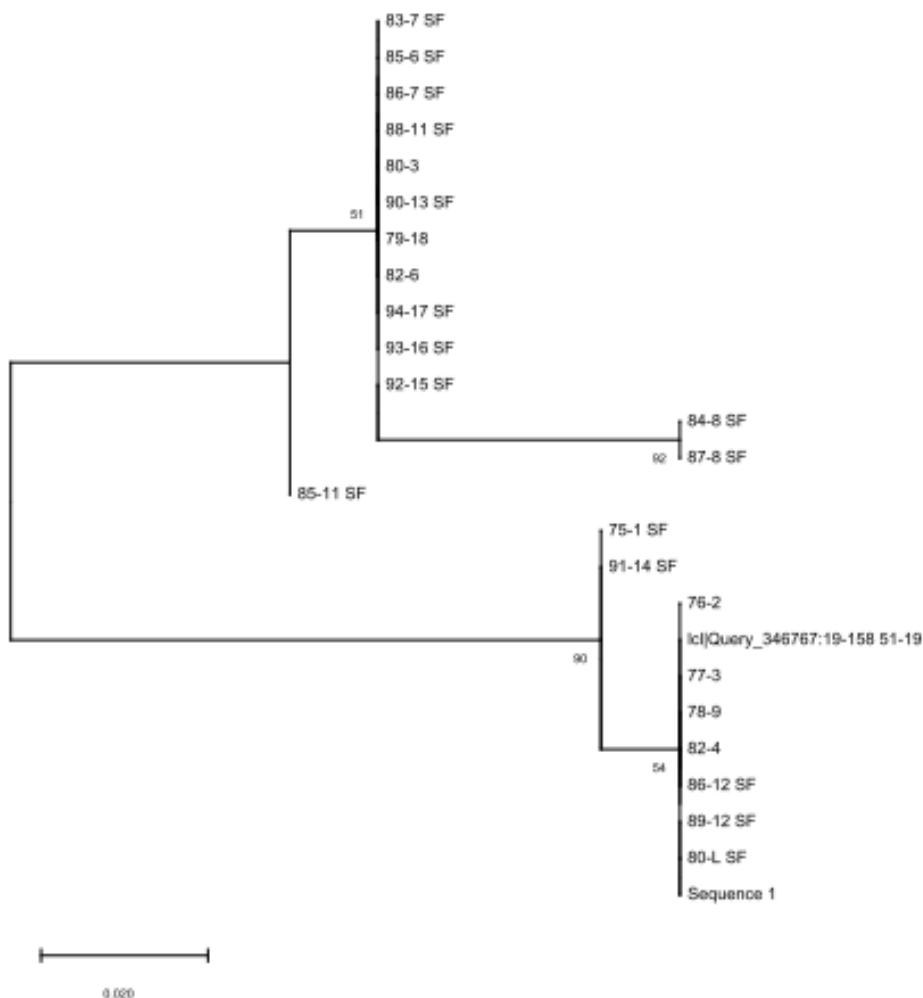
تنوع ژنی	۱/۰۰ ± ۰/۰۱۴
تعداد انتقال‌ها	۲۳۲
تعداد واژگونی	۱۴۱
تعداد جایگزینی	۳۷۳
تعداد جایگاه پلی‌مورفی	۱۴۲
مکان‌های مشاهده شده با انتقال	۱۲۸
مکان‌های مشاهده شده با واژگونی	۱۴۱
مکان‌های مشاهده شده با جایگزینی	۱۴۲

هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۱۰۵ ± ۰/۵۷۳ و تعداد آلل‌ها ۰/۰۱۴ ± ۳/۶۰۹ به‌دست آمد. مقدار آمار آزمون بی‌طرفی (neutrality tests) تاجیما و شاخص F_S نیز طبق جدول ۵ به‌دست آمد که شاخص منفی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P \geq ۰/۰۱$).

درصد بازهای آلی تشکیل‌دهنده ژن *Cyt b* برای نمونه‌های توالی‌یابی شده شامل $A=۲۱/۳۹$ درصد، $C=۳۳/۱۶$ درصد، $T=۲۸/۷۰$ درصد و $G=۱۶/۷۵$ درصد بود. هم‌چنین میانگین تفاوت جفت بازی $۳۲/۴۷ \pm ۷۲/۳۳$ برآورد شد. تنوع نوکلئوتیدی Pi (میانگین بر حسب جایگاه) $۰/۴۷ \pm ۰/۲۴$ به‌دست آمد. مقدار میانگین

جدول ۵- تست بی‌طرفی (Neutrality tests).

Tajima's D	$۳/۴۰ \pm ۰۰/۰$
Tajima P-value	$۰/۹۹۹ \pm ۰/۰۰$
F_S P-value	$۰/۱۳۲ \pm ۰/۰۰$
F_S	$=۲/۸۵$



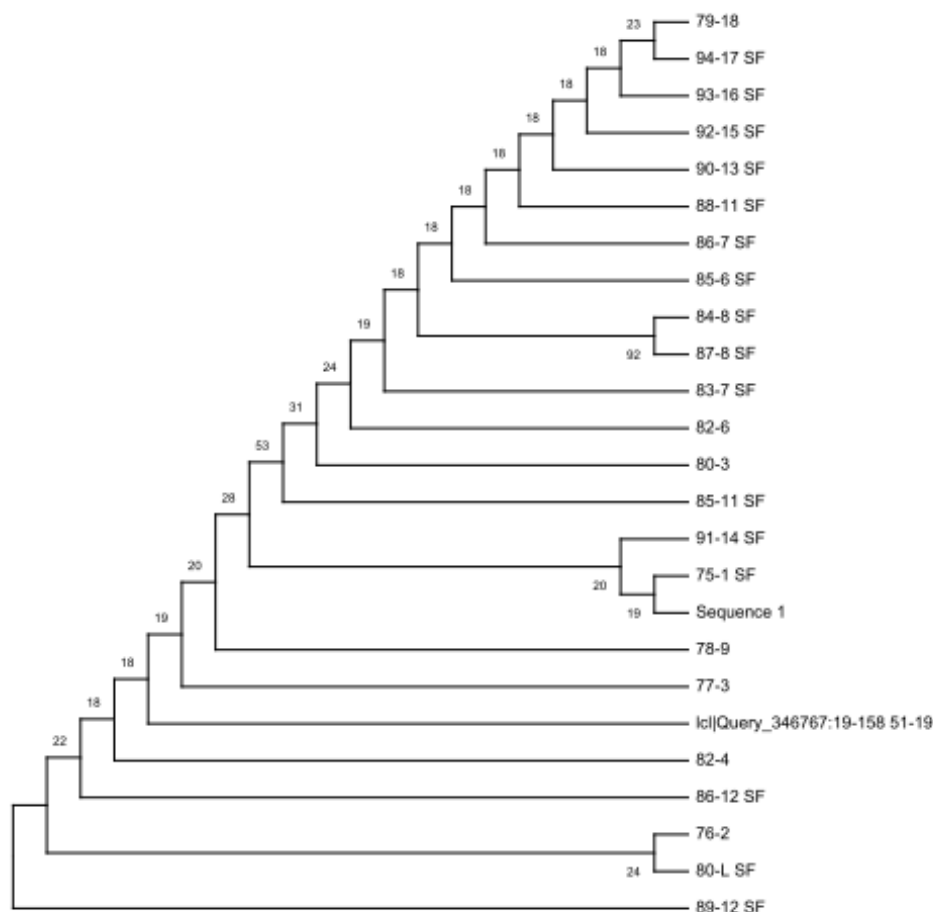
شکل ۴- درخت تکاملی ماهیان آزاد و قزل‌آلا در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از **Maximum Likelihood**.

درخت MP با استفاده از الگوریتم Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) با سطح جستجو ۰/۰ به دست آمد که در آن درختان اولیه با افزودن تصادفی به دست آمدند. دنباله‌ها (۱۰ تکرار) تجزیه و تحلیل شامل ۲۲ توالی نوکلئوتیدی بود. موقعیت‌های

تاریخ تکامل با استفاده از روش حداکثر مجازات (Maximum Parsimony) استنباط شد. تجزیه و تحلیل درخت توسط برنامه MEGA 6.0 بین توالی‌های ماهی آزاد دریای خزر و قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد.

از حداکثر تجزیه و تحلیل ۲۰ گونه سالمونید حاصل شده است. نتایج نشان داد دو گونه قزل‌آلای رنگین کمان و آزاد دریای خزر به درستی از هم جدا هستند و گونه‌هایی اطمینان از نوع گونه وجود نداشت و ظاهر ماهی آزاد داشتند مثل شماره ۱۲ که از انزلی صید شده بود در گروه قزل‌آلای رنگین کمان قرار گرفت. هم‌چنین ماهی‌های آزاد صید شده از میانکاله (شماره ۳، ۴ و ۱۴)، انزلی (شماره ۱۲)، در گروه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان قرار گرفتند.

کدون شامل + Noncoding^۲ + 3rd + nd بود. همه موقعیت‌های حاوی شکاف و داده‌های مفقود شده حذف شدند در مجموع ۸۶۰۹ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت. تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA 6.0 انجام شد. روش حداکثر مجازات را برای تکاملی نشان می‌دهد. این درخت به صورت فیلوگرام، به طول یک داده، شاخه به میزان تغییر ویژگی کشیده شده است. همه گونه‌ها در ۱۰۰ درصد از تکرار bootstrap بازیابی شد. اجماع دقیق درختان



شکل ۵- درخت تکاملی ماهیان آزاد و قزل‌آلا در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از Maximum Parsimony

آشکارسازی روابط تکاملی جمعیت‌های نزدیک به هم ابزار مناسبی است (تاکزاک و نی، ۱۹۹۶). در بررسی‌های تنوع ژنتیکی غنای آلی نسبت به

راه‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی جوامع زیستی وجود دارد اما اندازه‌گیری فراوانی آلی یا ژنوتیپ‌ها از ساده‌ترین آن‌ها بوده و جهت بیان و

بیش‌ترین نسبت نوکلئوتید مشاهده شده از نمونه‌های استخراج شده مربوط به باز سیتوزین به‌میزان ۳۳/۱۶ و کم‌ترین باز مربوط به باز گوانین به‌میزان ۱۶/۷۵ بود. این میزان در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۴) روی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد خزر برای بیش‌ترین درصد مربوط به باز آدنین و کم‌ترین درصد باز گوانین بود.

در تخمین الگوی جانشینی در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۳) بیش‌ترین مقدار واژگونی ۱۷۰ و بیش‌ترین مقدار جایگزینی ۹۰ در رودخانه چالوس بود. این مقدار در این مطالعه برای کل نمونه‌های صید شده از دریای خزر به‌صورت کلی محاسبه شد که مقدار واژگونی ۲۳۲ و مقدار جایگزینی ۱۳۷ بود. میانگین درجه خویشاوندی در مطالعه ماهیان آزاد دریای خزر توسط نجار لشگری و همکاران بیش‌ترین مقدار را برای رودخانه سردآبرود ۰/۳۴ به‌دست آوردند. این مقدار در مطالعه حاضر ۰/۹۹ به‌دست آمد.

تعیین توالی ژنوم میتوکندریایی امکان بررسی الگوهای تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف را فراهم کرده و با پیشرفت و تکامل دستگاه‌های تعیین توالی و نرم‌افزارهای تخصصی، مطالعات ژنتیکی بیش‌تری نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می‌دهند که دلیل آن را به بزرگ بودن اندازه مؤثر جمعیت، جریان ژنی بالا در محیط‌های دریایی و برعکس جریان ژنی محدود در ماهیان آب شیرین نسبت می‌دهند (روسی و همکاران، ۲۰۰۴).

ویژگی کلی مشترک تقریباً همه مفاهیم گونه خوشه‌ای از جمعیت با مسیر تکاملی خاص است (دی کوپروز، ۲۰۰۷). به نظر می‌رسد توجه به این جنبه از مفاهیم گونه در طبقه‌بندی و حفظ ماهی آزاد می‌تواند جایگزین مفیدی برای جلوگیری از تورم طبقه‌بندی باشد، در حالی که حفاظت از تنوع ماهی

هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است. زیرا بالا بودن غنای آللی نشان‌دهنده بالا بودن اندازه مؤثر جمعیت است و استفاده از آن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی که برای برنامه‌های به‌گزینی یا حفاظت انتخاب شده‌اند، مناسب‌تر است. ناخالصی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها ارزش زیادی دارد زیرا هر فرد ناخالص ناقل ال‌های متفاوتی بوده که نشان‌دهنده تنوع است (دیز و پرسا، ۲۰۰۹). در این مطالعه بررسی میانگین مقادیر به‌دست آمده برای تعداد آل‌ها ناخالصی مشاهده نشد.

وجود مواد سمی در آب می‌تواند موجب افزایش مرگ و میر جمعیت‌ها کاهش تنوع و فراوانی ژنتیکی و از بین رفتن آل‌های کمیاب شود (تئودوراکیز و همکاران، ۲۰۰۱). هم‌چنین بالا بودن ارتباط ژنتیکی (هروردن و همکاران، ۲۰۰۶) و تبادلات ژنتیکی (هولیهان و همکاران، ۲۰۰۶) سبب کاهش تعداد آل‌های اختصاصی می‌شود. در مقابل بالاتر بودن آل اختصاصی و تراز بالای پلی‌مورفیسم می‌تواند ناشی از پویایی ژنتیک جمعیت باشد. ورا و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ساختار ژنتیکی مولدین ماهیان آزاد دریای خزر با آغازگرهای ریزماهواره، بیش‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۹۰ اعلام کردند. میزان تنوع ژنتیکی در ماهیان دریایی ۰/۷۹، در ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ و در ماهیان آنادرم ۰/۶۸ گزارش شده است (دوودی و آویس، ۲۰۰۰). میزان تنوع ژنتیکی در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۳) $0/09 \pm 0/47$ بوده است. هم‌چنین میزان آن در مطالعه حاضر $0/24 \pm 0/47$ به‌دست آمد که کم‌تر بودن مقدار آن از مقدار اعلام شده برای ماهیان آنادرم است و پایین بودن آن را می‌توان به عوامل مختلفی چون صید بی‌رویه، از بین رفتن مکان‌های طبیعی تخم‌ریزی، تکثیر مصنوعی و موارد دیگر نسبت داد.

واریانس مولکولی در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که تنوع ژنتیک در بین جمعیت رودها و تفاوت‌های تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت آزاد خزری وجود دارد و این تفاوت قابل توجه در رودخانه‌ها ($P < 0/01$) نشان‌دهنده توانایی پاسخ به انتخاب طبیعی جمعیت است (کالینوسکی، ۲۰۰۵).

از آزمون تاجیما به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن محاسبه استفاده می‌شود. هدف این آزمون یافتن شناسایی تمایز بین توالی DNA که به طور تصادفی (بیطرف) و DNA که تحت غیرتصادفی در حال تکامل است، می‌باشد. در یک جمعیت، فراوانی یک جهش خنثی به طور تصادفی از طریق رانش ژنتیکی در نوسان است. با توجه به نتایج میزان آزمون تاجیما $0/99$ به دست آمده است این درحالی است که کم‌ترین مقدار در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۴) برای ماهی آزاد خزر در رودخانه سردآبرود مقدار منفی $0/50$ بوده است. در این مطالعه نشان داده شد که مقدار D مثبت و معنی‌دار به دست آمده که بیانگر کمبود آلل‌های کمیاب است. D مثبت تاجیما نشان‌دهنده سطوح پایین چندشکلی با فرکانس پایین و فرکانس بالا است به عنوان مثال، پس از یک تنگنا یا یک رفت و برگشت انتخابی، که نشان‌دهنده کاهش اندازه جمعیت و/یا انتخاب متعادل است. میانگین تفاوت‌های جفتی و تعداد محل‌های تفکیک، هر کدام به گونه‌ای مقیاس‌بندی می‌شوند که انتظار می‌رود در جمعیتی با اندازه ثابت در حال تحول بی‌طرفانه یکسان باشند.

با توجه به بررسی مطالعات انجام‌شده، احتمال فرار قزل‌آلا از قفس‌های پرورشی وجود دارد که می‌تواند اثرات زیادی بر اکوسیستم منطقه و آبریان از جمله گونه‌های دیگر ماهی بگذارد. اگرچه مطالعات جامع و کاملی از هیبرید شدن گونه‌های پرورشی و

آزاد در هر حوضه را بهبود می‌بخشد. بنابراین، به منظور اطمینان از اصطلاح پایداری طولانی مدت تنوع ماهی آزاد، پیشنهاد می‌شود مطالعات طبقه‌بندی در مجموعه از گونه‌ها که شامل ماهی آزاد نیز باشد بر روی خوشه‌های ژنومی جمعیت در هر حوضه یا منطقه جغرافیایی به جای توصیف گونه‌ها فقط با استفاده از نمونه‌های مورفولوژیکی یک تنها جمعیت متمایز شده، باید انجام شود (هاشم‌زاده و همکاران، ۲۰۲۱).

انتقال و جایگزینی از شاخص‌های تنوع مولکولی هستند (تامورا و همکاران، ۲۰۰۴) و در مطالعه نجار لشگری و همکاران (۲۰۱۷)، بالاترین سطح تغییرات مولکولی در رودخانه سردآبرود مشاهده شده است. مشکل طبقه‌بندی با درجه خویشاوندی تعیین می‌شود. اگر ($P < 0/05$) فرضیه صفر رد می‌شود (برابری بین درخت و میزان تکامل) و اگر ($P > 0/05$) باشد نشان‌دهنده نرخ تکامل بین درخت‌های تبارزایی است (تاجیما، ۱۹۹۳) و درجه خویشاوندی ماهی آزاد خزر در این مطالعه برابری بین درخت و میزان تکامل را نشان می‌دهد. جمعیت وحشی و حفظ خلوص ژنتیکی آن‌ها نقش کلیدی در حفاظت از منابع ژنتیکی ماهی آزاد خزری دارد. به عنوان اولین قدم، جمعیت وحشی باقی‌مانده باید شناسایی و از نظر ژنتیکی مشخص شود (لیو و کوردس، ۲۰۰۴).

آپوستولیدیس و همکاران (۲۰۱۱) تفاوت ژنتیکی ماهی آزاد بومی جمعیت جنوب بالکان *S. trutta* را براساس DNA میتوکندری و تنوع ریز ماهواره‌ای بررسی کردند. الگوی تمایز جمعیت مشاهده شده در ریزماهواره‌ها با آنچه در تنوع mtDNA نشان داده شده متفاوت است، اما هر دو روش تقسیم‌بندی بسیار قوی تنوع ژنتیکی در بین مکان‌های نمونه‌برداری را نشان می‌دهند بنابراین نتایج نشان می‌دهد که راهبردهای حفاظتی باید به منظور حفظ یکپارچگی و منحصر به فرد بودن ژنتیکی هر جمعیت باشد. نتایج

امکان این دو گونه را از هم تفکیک و شناسایی کرد. نتایج اولیه توالی‌یابی ژنوم میتوکندریایی درصد نزدیکی ژنوم توالی‌یافته با گونه‌های ثبت شده در GenBank را نشان داد، نمونه‌های صید شده در میانکاله، ساری و فریدونکنار و انزلی با ظاهری بسیار شبیه به ماهی آزاد، در توالی‌یابی شباهت بالای ژنومی را با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند. بقیه نمونه‌ها با ظاهر ماهی آزاد همان توالی ماهی آزاد را نشان دادند.

بومی و تلاقی ژنی آن‌ها در حوضه جنوبی دریای خزر به ثبت نرسیده است، اما این موضوع امری محتمل و مهم است و نیاز به بررسی دقیق و کامل‌تر و مطالعات ژنتیکی جامعی دارد. برای تعیین نمونه‌های هیبرید و این‌که هیبریداسیون بین دو گونه اتفاق افتاده است یا خیر، باید از مارکرهای هسته‌ای و بعد کلونینگ یا روش NGS استفاده کرد که هر دو روش زمان‌بر و هزینه بالایی دارند. استفاده از توالی‌یابی ژنومی تا حد

منابع

- Apostolidis, A.P., Stoumboudi, M.Th., Kalogianni, E., Cote, G., and Bernatchez, L. 2011. Genetic divergence among native trout *Salmo trutta* populations from southern Balkans based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. J. Fish Biol. 79, 1950-1960 doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03136.x, available online at wileyonlinelibrary.com.
- Avise, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Bernatchez, L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution, 55: 351-379.
- Brigitte, J., Hansen, M., and Loeschker, V. 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. Biol. J. Linnean Soc. 84: 1-11.
- Clifford, S.L., McGinnity, P., and Ferguson, A. 1997. Genetic changes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations of NW Irish rivers resulting from escapes of adult farm salmon. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Clifford, S.L., McGinnity, P., and Ferguson, A. 1997. Genetic changes in an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) population resulting from escapes of juvenile farm salmon. Journal of Fish Biology (In Press).
- Cortey, M., and García-Marín, J.L. 2002. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. J. Fish Biol. 60: 1058-1063.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. Syst. Biol. 56: 879-886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>.
- Dewoody, J.A., and Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56: 461-473.
- Diz, P.A., and Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus alprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture 287: 278-285.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N., and Fong, J.D. 2021. Eschmeyer's catalog of fishes: genera/species by family/subfamily. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed dd mmm 2021.
- Grassi, F., Imazio, S., Gomarasca, S., Citterio, S., Aina, R., Sgorbati, S., Skala, F., Patrignani, G., and Labra, M. 2004. Population structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. Plant Science, 166: 1437-1441.

- Hashemzadeh, S.I., Farahmand, H., Abdoli, A., Bernatchez, L., Primmer, C.R., et al. 2012. Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian Sea and two inland lake basins, Iran: a morphogenetic approach. *J. Fish Biol.* 81: 1479-1500.
- Herwerden, L.V., McLlwin, J., Al-Quf, H., Al-Amry, W., and Reyes, A. 2006. Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes of Teleostei) to a population genetic study Arabian Peninsula stocks. *Fisheries Research*, 79: 258-266.
- Hoolihan, J.P., Anandh, P.J., and Herwerden, L.V. 2006. Mitochondrial analysis of narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) suggests a single genetic stock in the ROPME sea area. *ICES J. Marine Sci.* 63: 1066-1074.
- Janati, A., Norouzi, M., and Nazemi, A. 2013. Population genetic structure of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) in Anzali wetland and Gorganrud estuary using microsatellite markers. *Journal of Aquaculture Development*, 7: 3. 1-10.
- Jouladeh Roudbar, A., Vatandoust, S., Eagderi, S., Jafari, S., and Mousavi-Sabet, H. 2015. Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. *AAFL Bioflux*. 8: 855-909.
- Jouladeh Roudbar, A., Farahmand, H., Abed-Elmdoust, A.R., Mojazi Amiri, B. 2021. Distribution, Conservation Status and Identification Key of *Luciobarbus Heckel 1843* in Iran. 10: 77-92. 10.30473/EAB.2021.54891.1800.
- Kalinowski, S.T. 2005. Polymorphic loci require large sample size or estimate genetic distance. *Heredity*, 94: 33-36.
- Liu, Z.J., and Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their application in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Najjarlashgari, S., Rezvani Gilkolaei, S., Miar, A., and Salehi Farsani, A. 2014. Study of genetic diversity in Caspian brown trout (*Salmo caspius*) emigrant population to Chalous river using sequencing technique. 1st National Conference of Passive Defense in Bandar Abbas Marine Science. <https://civilica.com/doc/359306>.
- Najjarlashgari, S., Rezvani Gilkolaei, S., Miar, A., and Salehi Farsani, A. 2014. Study of genetic diversity in Caspian brown trout (*Salmo caspius*) emigrant population to Gorganrud river using microsatellite method. 1st National Conference of Passive Defense in Bandar Abbas Marine Science. <https://civilica.com/doc/359307>.
- Rossi, A.R., Ungaro, A., De Innocentiis, S., Crosetti, D., and Sola, L. 2004. Phylogenetic analysis of Mediterranean Mugilids by allozymes and 16S rRNA genes investigation: Are the Mediterranean species of *Liza* monophyletic? *Biochem. Genet.* 42: 301-313.
- Rousset, F. 2004. Genetic structure and selection in subdivided populations Princeton. Princeton University Press.
- Sattari, M., Shahsavani, D., and Shafiee, Sh. 2003. Ichthyology (2) (Systematic). Haqshenas publication, 502p.
- Tajima, F. 1993. Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics*, 135: 599-607.
- Takezaki, N., and Nei, M. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 11030-11035.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W., and Lamb, T. 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analysis in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 317-326.
- Tudela, S. 1999. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research*, 42: 3. 229-243.

- Utter, F., and Ryman, N. 1993. Genetic markers and mixed stock fisheries. *Fisheries*, 18: 11-21.
- Van der Laan, R., and Fricke, R. 2021. Eschmeyer's catalog of fishes: family-group names. (<http://www.calacademy.org/scientists/catalog-of-fishes-family-group-names/>). Electronic version accessed dd mmm 2021.
- Vatandoust, S., Abdoli, A., Anvarifar, H., and Mousavi-Sabet, H. 2014. Morphometric and meristic characteristics and morphological fario (Pisces: Salmonidae) along the southern Caspian Sea basin. *Europ. J. Zoologic. Res.* 3: 2. 56-65.
- Vera, M., Cortey, M., Sanz, N., and Garcia-Marin, J.L. 2010a. Maintenance of an endemic lineage of brown trout (*Salmo trutta*) within the Duero river basin. *J. Zoologic. System. Evolut. Res.* 48: 2. 181-187.
- Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Pino-Querido, A., Kalbassi, M.R., and Martinez, O. 2011. Phylogeography, genetic structure and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran.
- Zolgharnine, H., Kamyab, M., Keyvanshokoo, S., Ghasemi, A., and Nabavi, S.M.B. 2010. Genetic diversity of *Avicennia marina* (Forsk.) vierh. Populations in the Persian GULF by microsatellite markers. *J. Fish. Aqua. Res.* 5: 223-229.