

## Genomic-based investigation of genetic diversity in broodstock of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758)

Jafari O.<sup>1\*</sup>; Karamirad N.<sup>2</sup>; Golshan M.<sup>3</sup>; Sarpanah A.<sup>1</sup>; Zeinalabedini M.<sup>4</sup>; Abdollahzadeh E.<sup>1</sup>; Hassanzadeh Saber M.<sup>1</sup>; Nasrolahpourmoghadam M.<sup>2,5</sup>; Shakouri M.<sup>2</sup>; Mohseni M.<sup>1</sup>

\*Jaafari.omid@yahoo.com

1- International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

2- Iran Fisheries Organization, Tehran, Iran

3- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

5- Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: July 2025

Accepted: September 2025

Published: November 2025



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Introduction

Sturgeons (Acipenseriformes) are of the most commercially and scientifically important fish species in the globe. These fish are mostly anadromous, spending most of the life cycle in the marine and brackish waters and migrating to the freshwater rivers to spawn (Kottelat and Freyhof, 2007). The Caspian Sea basin has been the main refuge for six species of sturgeons namely *Huso huso*, *Acipenser persicus*, *Acipenser stellatus*, *Acipenser guldenstaedtii*, *Acipenser nudiiventris* and *Acipenser ruthenus*, all of which under critically endangered level of the IUCN red list (IUCN, 2025). Generally speaking, the number of sturgeon species has declined, and the beluga (*H. huso*) is currently in the most critical situation due to a decline in the number of adults leading to local extinctions of the wild populations (Dudu *et al.*, 2014). It is worth noting that female beluga does not spawn every year and the optimal reproductive performance of these fish occurs at an age equivalent to twice the age of first sexual maturity, which can be considered as a limiting factor in the survival of this species considering the shrinking populations (Boscari *et al.*, 2021). Several factors such as overfishing and poaching for trade of caviar and meat, dam construction, loss of nursery grounds, pollution, global warming, and reduced volume of freshwater flowing into the seas are considered to be the most important components in the decline of wild sturgeon populations. In order to compensate the loss of wild populations of *H. huso* and on the other hand providing the human society required caviar and protein, Iranian Fisheries Organization started the restocking activity since five

decades ago and established sturgeon aquaculture from two decades ago. Due to the sharp decrease in wild mature beluga of the southern Caspian Sea during the last decades, nowadays most of the aquaculture and restocking activities are forced to be focused on the brood stock generated from few wild parents in the past. Therefore, it is necessary to use modern molecular methods and prepare a genomic-based certificate to protect genetic reserves and enhance the genetic diversity of the native beluga in the south of the Caspian Sea. Genetic diversity represents the variations in the number and type of alleles available in chromosomal loci, which is also considered the main basis for the adaptation of species and populations against changing environmental conditions. While several molecular markers such as SSR, AFLP, and mtDNA, have been widely used during the four decades in fisheries studies (Robledo *et al.*, 2018), these days due to the revolution in the genome sequencing technologies (NGS) more robust genotyping methods such as Genotyping-by Sequencing (GBS) can provide more diverse, sensitive and accurate estimations by screening thousands of variant markers throughout the whole genome of organisms even in species without reference genome (Sonah *et al.*, 2013; Andrews *et al.*, 2016; Barriá *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Therefore, during the present study for the first we used a genome-based technique known as GBS in order to estimate the amount of genetic diversity and identify possible genetic nuclei in *H. huso* brood stock available at International Sturgeon Research Institute (ISRI).

### Methodology

The feeding was stopped a week before sampling and each fish specimen was PIT tagged for later traceability purposes. Caudal fin tissues of 23 *Huso huso* was sampled and preserved in absolute ethanol for later molecular experiments. DNA extraction was done from the fin tissues through Phenol-Chloroform method with minor modifications (Jafari *et al.*, 2022) and their quality and quantity in terms of DNA integrity, purity and concentration were determined using 0.8% agarose gel and Nano Drop instrument (ND 1000). After DNA samples were qualitatively approved, DNA pellets were sent to Novogene for 150bp PE sequencing on a lane of Illumina Novaseq 6000. Quality of the raw reads generated by sequencing were assessed through Trim Galore ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)) and only window reads with mean quality of 20 were kept in the final dataset. The clean data set then mapped to the genome reference of *Huso huso* using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) and the SNP calling was performed based on Stacks. After conducting SNP calling, SNPs were filtered based on parameters such as MAF of 0.05, LD and Hardy-Weinberg equilibrium. Dispersal of fish individuals were visualized using Principal Component Analysis (PCA) based on the two first components in R (Team, 2013). Furthermore, FineRADstructure was used to illustrate the probable genetic clusters based on coancestry information through SNPs (Malinsky *et al.*, 2018).

### Results

The sequence quality analysis showed that the quality of the sequences was high with an average of 92.55. In total, 294 Gb of DNA data obtained from GBS libraries contained an average of 41% guanine (G) and cytosine (C) bases in the genome of *Huso huso*. PE genomic sequencing produced 261,974,459 reads, with an average alignment of 90% to the reference genome (Table 1). The average number of reads obtained from DNA sequencing in each specimen was about 11 million reads. The results of variant calling showed

that a total of 1836 SNP markers with a minimum allele frequency of 0.05 were called from genome sequencing in *H. huso* with the maximum number of SNPs detected on chromosome 58 (Fig. 1). Based on the results obtained from SNPs obtained from genomic sequencing, the amount of genetic diversity observed in the *H. huso* broodstock was 0.35. Also, the inbreeding and nucleotide diversity were calculated to be 0.02 and 0.28, respectively (Table 2). The distribution of genetic diversity in the *H. huso* broodstock using the two first components of PCA is depicted in Figure 2. Based on the results of the PCA, the first two components accounted for 31.89% of the variance. The results of the phylogenetic relationships based on coancestry relationship also showed that the studied broodstock of *H. huso* can be considered in two main genetic sub-groups (Fig. 3).

### Discussion and conclusion

Identifying genetic reserves and maintenance of genetic diversity are among the most important measures in managing broodstock either in a sustainable aquaculture activity or in a restocking program. In sturgeons' aquaculture, there is a particular concern about the reduction of genetic diversity in intensive beluga farming. Preservation of an appropriate level of genetic diversity within the population is of great importance in diminishing negative effects of inbreeding and genetic drift. In the present study, and to the best of our knowledge for the first time in Iran, the identification of genetic groups in the broodstock of *Huso huso* available at the International Sturgeon Research Institute was carried out using GBS method. Accordingly, creation of a genetic certificate using 1836 SNP markers obtained from GBS was successfully implemented on 23 *H. huso*. Based on the obtained results from 1836 SNP marker, the observed heterozygosity was 0.36 in the investigated broodstock of *H. huso*. Observed heterozygosity is the most common indicator of genetic diversity used in determining the genetic health of fish broodstocks. Alongside with the observed heterozygosity, allelic richness should also be taken into consideration in assessment of genetic diversity. Results of the SNP markers showed a considerable number of alleles ( $A_n=105$ ) in the studied broodstock of *H. huso*, indicating a satisfactory level of heterogeneity in this broodstock. This was also supported by the small value of inbreeding ( $F_{is}=0.02$ ). The UPGMA tree based on coancestry information revealed an admixture pattern of genetic clustering in *H. huso*. It seems that wild parents from different populations had been used in generating the broodstock of *H. huso* at ISRI during the past decades. However, based on the genetic clustering heatmap it is suggested to consider two genetic nuclei in the investigated broodstock of *H. huso* in order to keep the genetic diversity for future sustainable aquaculture purposes.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgment

Hereby we wish to appreciate Iranian Fisheries Science Research Institute and Iranian Fisheries Organization for their financial support and also providing laboratory required equipment to conduct the current project.

## مقاله علمی - پژوهشی:

# برآورد میزان تنوع ژنتیکی در ذخیره مولدین فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus, 1758) با استفاده از داده‌های حاصل از توالی یابی ژنوم

امید جعفری<sup>۱\*</sup>، ناصر کرمی راد<sup>۲</sup>، مهدی گلشن<sup>۳</sup>، علی نقی سرپناه<sup>۱</sup>، مهرشاد زین‌العابدینی<sup>۴</sup>، اسماعیل عبداله‌زاده<sup>۱</sup>، محمد حسن‌زاده صابر<sup>۱</sup>، مریم نصراله پورمقدم<sup>۵،۲</sup>، مهدی شکوری<sup>۲</sup>، محمود محسنی<sup>۱</sup>

\*Jaafari.omid@yahoo.com

- ۱- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
- ۲- سازمان شیلات ایران، تهران، ایران
- ۳- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۴- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- ۵- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ چاپ: آبان ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۴

## چکیده

فیل ماهی به عنوان اصلی‌ترین گونه پرورشی از ماهیان خاویاری در ایران مطرح بوده که ذخیره مولدین کنونی آن از تعداد محدودی مولد وحشی در دو گذشته ایجاد شده است. فقدان گونه‌های شناسنامه‌دار یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده در توسعه صنعت آبزی‌پروری ماهیان خاویاری در ایران بوده است. از این‌رو، در پروژه حاضر و برای اولین بار از تکنیک توالی‌یابی مبتنی بر ژنوم<sup>۱</sup> به منظور برآورد تنوع ژنتیکی و تهیه شناسنامه مولکولی مبتنی بر ژنوم از ذخیره مولدین فیل ماهی موجود در انستیتو ماهیان خاویاری، استفاده شد. توالی‌یابی ژنومی منجر به تولید ۲۹۴GB داده حاصل از ۲۶۱۹۷۴۴۵۹ خوانش ژنومی شد که در نهایت باعث شناسایی ۱۸۳۶ نشانگر SNP<sup>۲</sup> در ژنوم فیل ماهی شد که بیشترین تعداد آن بر کروموزوم شماره ۵۸ مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل SNPs کشف شده نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی مورد مشاهده در ذخیره مولدین فیل ماهی موجود در انستیتو، ۰/۳۵ است. همچنین ۱۰۵ آلل در ذخیره مولدین مورد بررسی یافت شد که بیانگر تنوع آلی مناسب در این گونه بود. نتایج حاصل از روابط هم‌تباری با استفاده از مارکرهای SNP شناسایی شده برای اولین بار نشان داد که ذخیره ژنتیکی مولدین فیل ماهی در انستیتو در دو خوشه ژنتیکی، قابل تقسیم بندی هستند. میزان همخونی در مولدین فیل ماهی مورد بررسی ۰/۰۲ برآورد گردید که این میزان پایین همخونی در کنار ساختار جمعیتی مختلط مورد مشاهده در آزمون PCA می‌تواند بیانگر تنوع بالا در مولدین وحشی ایجادکننده جمعیت حاضر باشد. با توجه به دسترسی بسیار محدود به مولدین وحشی برای غنی‌سازی خزانه ژنی گله‌های پرورشی، پیشنهاد می‌گردد تا با استفاده از روش‌های نوین مبتنی بر ژنومیکس در زمینه شناسایی خزانه‌های ژنی، حفظ ساختارهای ژنتیکی و تکثیر هدفمند بر اساس اطلاعات ژنتیکی در بازسازی ذخایر و آبزی‌پروری اقدام گردد.

**لغات کلیدی:** چندشکلی تکنوکلوتیدی، خزانه ژنی، درون آمیزی، ژنومیکس، ماهیان خاویاری

\*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Genotyping-by sequencing

<sup>2</sup> Single nucleotide polymorphism (SNP)

## مقدمه

ماهیان خاویاری از راسته تاسماهی شکلان (Acipenseriformes)، یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی آبهای دریایی و شیرین بوده که از نظر علمی و نظر تجاری از اهمیت بالایی برخوردارند. اکثر گونه‌های ماهیان خاویاری، رودکوچ هستند و بیشتر عمر خود را در دریا می‌گذرانند و سپس برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها می‌آیند. به طور کلی، ماهیان خاویاری رشد کندی دارند و از سن بلوغ بالایی نیز برخوردارند به طوری که با توجه به گونه ممکن است سن بلوغ حداکثر تا ۲۰ سال به طول انجامد (Kottelat and Freyhof, 2007). حوضه دریای خزر پناهگاه اصلی برای اقامت شش گونه از ماهیان خاویاری به نام‌های فیل‌ماهی (*Huso huso*)، قره‌برون (*Acipenser persicus*)، ازون‌برون (*Acipenser stellatus*)، چالباش (*A. guldenstaedtii*)، شیب (*A. nudiventris*) و استرلیاد (*A. ruthenus*) است که هر شش گونه در فهرست قرمز IUCN در طبقه به‌شدت در معرض خطر انقراض قرار دارند (IUCN, 2025). به طور کلی، تعداد گونه‌های ماهیان خاویاری کاهش یافته است و ماهی خاویاری بلوگا (*H. huso*) در حال حاضر، به دلیل کاهش تعداد افراد بالغ در بحرانی‌ترین وضعیت قرار دارد که این موضوع منجر به انقراض‌های محلی می‌شود (Dudu et al., 2014). شایان ذکر است، مولدین ماده فیل‌ماهی هر ساله تخم‌ریزی نمی‌کنند و بهینه عملکرد تولیدمثلی این ماهیان در سنی معادل با دو برابر اولین بلوغ جنسی اتفاق می‌افتد که این موضوع می‌تواند با توجه به کوچک شدن جمعیت‌های این گونه به عنوان یک عامل محدود کننده در بقاء آن در نظر گرفته شود. در حال حاضر، پراکندگی ماهی خاویاری بلوگا به چند منطقه شامل دریای سیاه، دریای آزوف، دریای کاسپین و شاخه‌های اصلی آنها (رودخانه‌های دانوب، دن و کوبان، ولگا و اورال) محدود می‌شود (Dudu et al., 2014; Boscari et al., 2021). حضور این گونه در دریای آدریاتیک و رودخانه Po تا ۶۰ سال پیش ثبت شده بود و اکنون منقرض شده، تلقی می‌شود (Antognazza, 2021). به طور کلی، عوامل مختلفی همچون صید بی‌رویه و صید

قاچاق برای فروش خاویار و گوشت آن، سدسازی‌ها، از دست رفتن مکان‌های تخم‌ریزی، آلودگی‌ها، گرمایش جهانی و کاهش ورودی آب شیرین از طریق رودخانه‌ها به دریاها، از مهم‌ترین عوامل کاهش جمعیت‌های وحشی ماهیان خاویاری در نظر گرفته می‌شوند. به دلیل چرخه عمر طولانی و وضعیت آنادرومی، ماهیان خاویاری بسیار مستعد بهره‌برداری بیش از حد، آلودگی و به ویژه تکه‌تکه شدن زیستگاه هستند (Friedrich et al., 2019). در میان ماهیان خاویاری، ماهی خاویاری بلوگا از طولانی‌ترین مسیر مهاجرت به بالادست برای زادآوری برخوردار است. در نتیجه، سدها و خاکریزها به‌شدت بر این گونه تأثیر گذاشته‌اند (Çiftci et al., 2013). به طوری که برای مثال، ۱۰ سال پس از ساخت سد در رودخانه Po، جمعیت این گونه به طور کامل از دریای آدریاتیک حذف شد (Freyhof et al., 2020). به منظور کاهش ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری در دریای کاسپین، از دهه ۵۰ شیلات ایران با صید مولدین وحشی و تکثیر آنها در محیط پرورشی و رهاسازی بچه ماهیان در اوزان پایین اقدام به بازسازی ذخایر وحشی این ماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر کرده، هر چند طی دهه گذشته میزان صید و تکثیر این گونه‌ها به‌خصوص فیل‌ماهی به‌شدت کاهش یافته است. از این‌رو، در بازسازی ذخایر و تولید به منظور آبی‌پروری وابستگی بیش از پیش به ذخیره نسل F0 مولدین موجود در مراکز جهت تکثیر و تولید بچه ماهی ایجاد گردیده است. این ذخیره عمدتاً در مراکز دولتی و بر اساس تعداد کمی تلاقی‌های تصادفی مولدین وحشی در دهه ۸۰ ایجاد شده‌اند. از این‌رو، نیاز است تا با استفاده از روش‌های نوین مولکولی و تهیه شناسنامه ژنتیکی در سطح ژنوم مولدین، در زمینه حفاظت ذخایر ژنتیکی و ارتقاء میزان تنوع ژنتیکی ذخایر بومی فیل‌ماهی حوضه جنوبی دریای کاسپین اقدام گردد. تنوع ژنتیکی بیان‌کننده تفاوت در تعداد و نوع آلل‌های موجود در لوکوس‌های کروموزومی است که به عنوان مبنای اصلی سازگاری گونه‌ها و جمعیت‌ها با شرایط محیطی متغیر نیز قلمداد می‌شود. به مدت بیش از چهار دهه ابزارهای ژنتیکی متنوعی مانند ریزماهورها و نشانگرهای mtDNA به منظور انجام مطالعات تکاملی و

## مواد و روش کار

### نمونه برداری، استخراج DNA و توالی یابی

قبل از نمونه گیری به منظور جلوگیری از ایجاد استرس، مولدین به مدت یک هفته قطع غذادهی شدند. بافت باله دمی از ۲۳ قطعه مولد فیل ماهی در بانک ژن زنده انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری نمونه برداری شد. به هر مولد یک تگ ترانسپوندر یکپارچه غیرفعال PIT<sup>۱</sup> با کد مخصوص به خود اختصاص یافت که در حین نمونه برداری ثبت گردید. نمونه ها در اتانول مطلق، ذخیره شده و به آزمایشگاه ژنتیک واقع در بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی به منظور استخراج DNA ژنومی منتقل شدند. به منظور استخراج DNA از روش فنول-کفرم با برخی اصلاحات جزئی (Jafari *et al.*, 2022) استفاده شد و کمیت و کیفیت DNAs استخراجی با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از کیفیت و کمیت DNAs استخراجی، در تیوپ های مخصوص استریل منتقل شده و پس از کددهی اختصاصی، نمونه ها برای توالی یابی ژنومی دو طرفه ۱۵۰ جفت باز با استفاده از دستگاه Illumina Novaseq 6000 به خارج از کشور (Novogene, China) ارسال شدند.

### تجزیه و تحلیل های ژنومی و پردازش داده ها

داده های حاصل از توالی یابی ژنومی به منظور بررسی کیفیت خوانش ها با استفاده از TrimGalore مورد بررسی قرار گرفتند (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\_galore/bowtie2). سپس خوانش ها به ژنوم مرجع فیل ماهی در محیط bowtie2 هم ردیف شده (Langmead and Salzberg, 2012) و در نهایت فراخوانی SNPs بر Stacks انجام گرفت. سپس از بسته Populations به منظور استخراج آماره های ژنتیکی در سطح ژنوم مانند تنوع نوکلئوتیدی، میزان درون آمیزی، تنوع ژنتیکی و غناء آلی استفاده شد (Catchen *et al.*, 2013). همچنین به منظور افزایش کیفیت داده ها، تنها پنجره هایی در مجموعه داده حفظ شدند که حداقل از کیفیت ۲۰ برخوردار بودند. پس از فراخوانی نشانگرها، فیلتر کردن فایل

شناسایی ساختارهای جمعیتی در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته اند (Robledo *et al.*, 2018). از مهم ترین مطالعات صورت گرفته بر گونه فیل ماهی در ایران می توان به استفاده از هشت جفت نشانگر ریزماهوره به منظور برآورد میزان تنوع ژنتیکی این گونه در مزارع پرورشی کشور اشاره کرد (Moghimi *et al.*, 2025). نتایج حاصل از چهار جفت نشانگر ریزماهوره حاکی از تمایز ژنتیکی پایین در دو گروه مولد پرورشی فیل ماهی بود (Farasati *et al.*, 2020) که این نتیجه در تناقض با میزان بالای تمایز ژنتیکی مورد مشاهده بین دو جمعیت پرورشی مورد بررسی از فیل ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین بود (Kazemi *et al.*, 2021). به رغم مزایای قابل توجه نشانگرهای ریزماهوره، پیشرفت های چشمگیر ایجاد شده در صنعت توالی یابی (NGS) با فراهم سازی غربالگری و پوشش حجم بالایی از ژنوم و همزمانی کشف هزاران نشانگر ژنتیکی و ژنوتایپینگ، امکان بررسی های دقیق، کامل و متنوع تری را در همه گونه ها حتی گونه های فاقد ژنوم مرجع فراهم می سازد (Sonah *et al.*, 2013; Andrews *et al.*, 2016; Barría *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). در مطالعه صورت گرفته بر گونه فیل ماهی از SNPs حاصل از توالی یابی GBS به منظور ایجاد یک معیار برای بازتعریفی جمعیت انقراض یافته محلی، از فیل ماهی دریای آدریاتیک استفاده شد (Boscari *et al.*, 2021). به رغم اهمیت بالای گونه فیل ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین و برای آبرزی پروری ماهیان خاویاری در ایران، تاکنون مطالعه جامعی با استفاده از روش های نوین مبتنی بر توالی یابی ژنومی برای شناسایی خزانه ژنی زیست توده موجود صورت نگرفته است. از این رو، در مقاله حاضر برای اولین بار در ایران، از تکنیک تعیین ژنوتیپ با استفاده از توالی یابی (GBS) در سطح ژنوم به منظور برآورد میزان تنوع ژنتیکی و شناسایی هسته های ژنتیکی احتمالی در ذخیره مولدین فیل ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری به عنوان یکی از مهم ترین مراکز توزیع بچه ماهی خاویاری در کشور استفاده گردید.

<sup>1</sup> Passive Integrated Transponder (PIT)

## نتایج

بررسی توالی‌ها نشانگر کیفیت بالای آنها با میانگین ۹۲/۵۵ بود. در مجموع، ۲۹۴Gb داده DNA حاصله از کتابخانه‌های GBS به طور میانگین حاوی ۴۱ درصد بازهای گوانین (G) و سیتوزین (C) در ژنوم فیل ماهی بودند. توالی یابی دو طرفه ژنومی باعث تولید ۲۶۱۹۷۴۴۵۹ خوانش گردید که میانگین همردیفی آنها به ژنوم مرجع ۹۰ درصد به دست آمد (جدول ۱).

نهایی بر اساس شاخص‌هایی مانند حداقل فراوانی آللی، تعادل هاردی واینبرگ و LD انجام پذیرفت. نحوه پراکنش مولدین با استفاده از دو مؤلفه اول آزمون PCA و در نرم افزار R به اجرا درآمد (Team, 2013). همچنین به منظور مصورسازی تنوع ژنتیکی و بررسی تعداد بهینه خوشه‌های ژنتیکی بر اساس روابط تباری، از Finestructure استفاده گردید (Malinsky *et al.*, 2018).

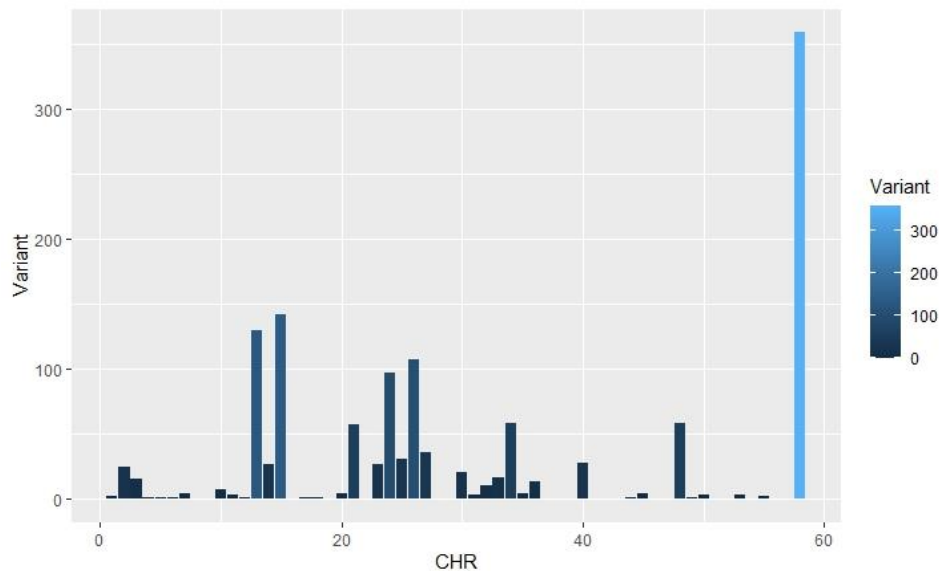
جدول ۱: خوانش‌های خام به دست آمده از توالی‌یابی GBS در گونه فیل ماهی

Table 1: Raw reads obtained from GBS libraries in *H. huso*

| Sample | Q30 (%) | GC (%) | Base number (b) | Read number |
|--------|---------|--------|-----------------|-------------|
| LWS-1  | 94.59   | 40.18  | 3156888872      | 10589391    |
| LWS-2  | 94.37   | 40.54  | 3367234649      | 11313069    |
| LWS-3  | 94.52   | 40.50  | 3101866023      | 10431469    |
| LWS-4  | 94.54   | 40.75  | 3640055055      | 12294239    |
| LWS-5  | 94.36   | 40.69  | 3335740768      | 11205311    |
| LWS-6  | 94.47   | 40.40  | 3519415167      | 11808156    |
| LWS-7  | 94.39   | 40.55  | 3469450674      | 11655005    |
| LWS-8  | 94.59   | 40.37  | 3222170766      | 10807715    |
| LWS-9  | 94.74   | 40.29  | 3836275808      | 12864342    |
| LWS-10 | 94.60   | 40.40  | 3336211305      | 11199876    |
| LWS-11 | 94.56   | 40.65  | 3547642492      | 11909925    |
| LWS-12 | 94.52   | 40.58  | 3493466981      | 11750308    |
| LWS-13 | 94.48   | 40.75  | 3381049835      | 11359683    |
| LWS-14 | 94.41   | 40.99  | 3673380587      | 12383783    |
| LWS-15 | 94.65   | 40.50  | 3664207000      | 12296679    |
| LWS-16 | 94.47   | 40.64  | 3130740829      | 10517162    |
| LWS-17 | 94.40   | 40.73  | 3468149234      | 11659250    |
| LWS-18 | 94.48   | 40.47  | 3310527674      | 11104526    |
| LWS-19 | 94.47   | 40.69  | 3282350356      | 11031335    |
| LWS-20 | 94.68   | 40.42  | 3163272069      | 10608266    |
| LWS-21 | 94.29   | 40.67  | 2963891418      | 9944608     |
| LWS-22 | 94.56   | 40.58  | 3552295775      | 11925479    |
| LWS-23 | 94.51   | 40.71  | 3371938129      | 11314882    |

بودند. بیشترین SNP بر کروموزوم شماره ۵۸ با تعداد ۳۵۹ نشانگر مشخص گردید. تعداد نشانگر SNP به ازاء هر کروموزوم در شکل ۱ نشان داده شده است.

میانگین تعداد خوانش حاصل از توالی DNA در هر مولد فیل ماهی حدود ۱۱ میلیون خوانش به دست آمد. نتایج حاصل از فراخوانی نشانگرها نشان داد که در مجموع، تعداد ۱۸۳۶ مارکر SNP از توالی یابی ژنومی در فیل ماهی فراخوانی گردید که از حداقل فراوانی آللی ۰/۰۵ برخوردار



شکل ۱: تعداد نشانگر SNP یافت شده بر کروموزوم‌های ژنوم فیل ماهی (محور X و Y به ترتیب بیانگر کروموزوم و تعداد نشانگر هستند).  
**Figure 1: Number of detected SNPs per each chromosome of *H. huso* (X and Y axes show the chromosomes and number of SNP variants, respectively)**

مؤلفه اول ۳۱/۸۹ درصد واریانس را به خود اختصاص دادند. نتایج حاصل از روابط تبارشناختی بر اساس اشتراک‌گذاری‌های ژنومی نیز نشان داد که مولدین مورد بررسی از فیل ماهی در دو گروه اصلی ژنتیکی قابل بررسی هستند (شکل ۳). بر این اساس خوشه اول ۶۱ درصد مولدین و خوشه دوم ۳۹ درصد مولدین را در خود جای داد.

بر اساس نتایج به دست آمده از SNPs حاصل از توالی‌یابی ژنومی، میزان تنوع ژنتیکی مورد مشاهده در ذخیره مولدین فیل ماهی ۰/۳۵ به دست آمد. همچنین میزان درون آمیزی و تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۲۸ محاسبه شد (جدول ۲). نحوه توزیع تنوع ژنتیکی در ذخیره مولدین فیل ماهی با استفاده از دو مؤلفه اول PCA در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCA دو

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی برخی آماره‌های ژنتیکی به دست آمده از داده‌های GBS در گونه فیل ماهی

**Table 2: Results of some genetic indices obtained from GBS in *H. huso***

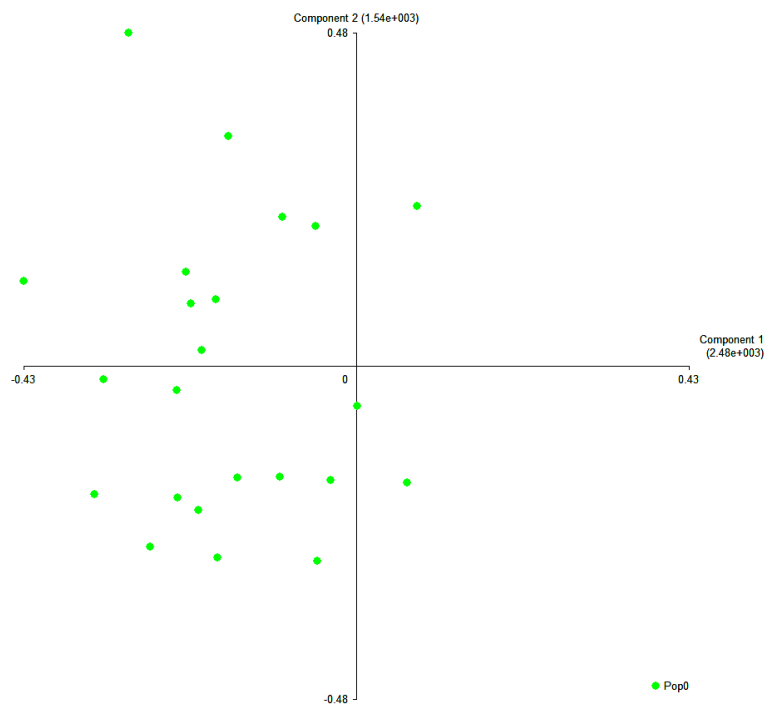
| Parameter       | Value |
|-----------------|-------|
| An              | 105   |
| He <sub>o</sub> | 0.36  |
| H <sub>o</sub>  | 0.64  |
| He <sub>E</sub> | 0.27  |
| H <sub>E</sub>  | 0.72  |
| $\pi$           | 0.28  |
| $F_{is}$        | 0.019 |

An: تعداد آلل، He<sub>o</sub>: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، H<sub>o</sub>: هموزایگوسیتی مشاهده شده، He<sub>E</sub>: هتروزایگوسیتی مورد انتظار، He: هموزایگوسیتی مورد

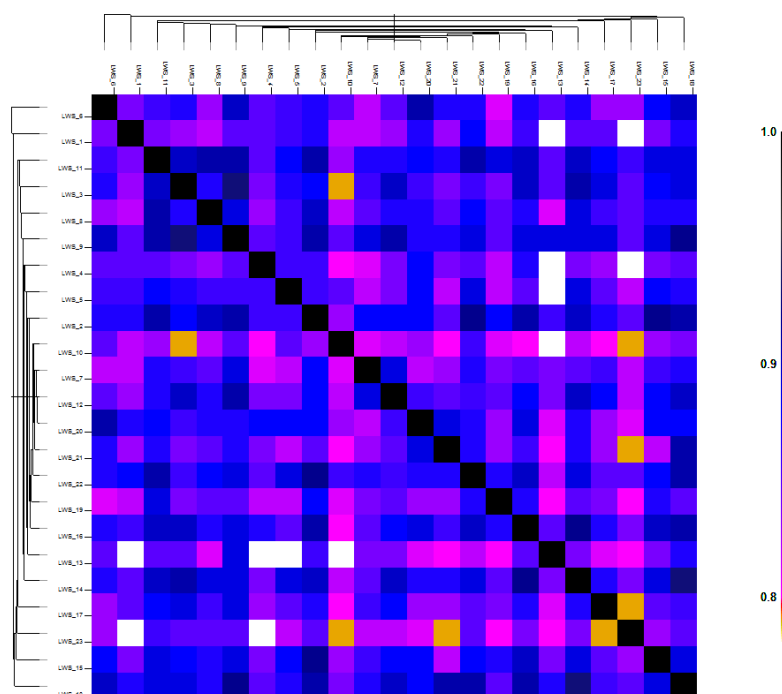
انتظار،  $\pi$ : تنوع نوکلئوتیدی،  $F_{is}$ : ضریب درون آمیزی

An: number of alleles, He<sub>o</sub>: observed heterozygosity, H<sub>o</sub>= Observed homozygosity, He<sub>E</sub>: Expected heterozygosity, H<sub>E</sub>: Expected homozygosity,  $\pi$ : Nucleotide diversity,  $F_{is}$ : Inbreeding coefficient.





شکل ۲: نمودار پراکنش مولدین فیلماهی مورد مطالعه بر اساس دو مؤلفه اول PCA  
Figure 2: PCA scatter plot of *H. huso* broodstock using the two first components.



شکل ۳: درخت فیلوژنی UPGMA بر اساس روابط والدینی در ذخیره مولدین فیلماهی مورد بررسی در انستیتو ماهیان خاویاری  
Figure 3: UPGMA phylogenetic tree based on co-ancestry relationships in broodstock of *H. huso* at ISRI

## بحث

شناسایی ذخایر ژنتیکی و حفظ تنوع ژنتیکی از مهم‌ترین اقدامات عملی در مدیریت ذخیره مولدین در یک فعالیت آبی‌پروری پایدار و نیز در برنامه‌های بازسازی ذخایر است. در صنعت پرورش ماهیان خاویاری، نگرانی ویژه‌ای در خصوص کاهش تنوع ژنتیکی در آبی‌پروری متراکم فیل‌ماهی وجود دارد. حفظ سطح مناسبی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت از اهمیت بالایی در کاهش میزان همخونی و رانش ژنتیکی برخوردار است. در تحقیق حاضر و برای اولین بار در ایران، شناسایی گروه‌های ژنتیکی در ذخیره مولدین گونه فیل‌ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری با استفاده از روش‌های نوین توالی‌یابی با تکیه بر روش GBS صورت پذیرفت. بر همین اساس ایجاد شناسنامه ژنتیکی با استفاده از ۱۸۳۶ نشانگر SNP حاصل از توالی‌یابی GBS بر ۲۳ مولد فیل‌ماهی با موفقیت به اجرا درآمد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از ۱۸۳۶ نشانگر SNP میزان هتروزیگوسیتی موردمشاهده در مولدین مورد بررسی از ذخیره فیل‌ماهیان موجود در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری ۰/۳۶ برآورد گردید. هتروزیگوسیتی موردمشاهده به عنوان اولین و یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در پایش گروه‌های ژنتیکی و نیز معیاری از سلامت ژنتیکی ذخایر آبیان در نظر گرفته می‌شود (Jafari et al., 2025). در بررسی انجام شده بر هشت جمعیت از مولدین فیل‌ماهی با استفاده از هشت جفت نشانگر ریزماهواره میزان تنوع ژنتیکی موردمشاهده در جمعیت انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، ۰/۶۷ گزارش گردید (Moghim et al., 2025). درک زیست‌شناسی تکثیر ماهیان خاویاری مانند رفتارهای مهاجرتی و تخم‌ریزی، از اهمیت بالایی در انتخاب مولدین برای پرورش در شرایط اسارت برخوردار است. این فرایند، انتخاب با هدف حفظ تنوع و غنی‌سازی خزانه ژنی از طریق جفت‌سازی‌های متنوع به منظور حفظ تنوع ژنتیکی صورت می‌پذیرد (Dudu et al., 2014). هتروزیگوسیتی موردمشاهده و به تبع آن تنوع ژنتیکی در ماهیان خاویاری تحت تأثیر چندین عامل مانند فشارهای انتخاب گر، مکان جغرافیایی، وضعیت اولیه ذخیره، روش‌های

تکثیر و جفت‌سازی و اختلاط ذخایر طبیعی و وحشی قرار دارد. کاهش تنوع ژنتیکی می‌تواند پتانسیل جمعیت را برای سازگاری با شرایط جدید مانند کمبود منابع یا تغییر اقلیم تحت تأثیر قرار دهد (Dudu et al., 2014; Wang et al., 2022). در واقع، کاهش تنوع ژنتیکی بیانگر احتمال از دست دادن پتانسیل ژنتیکی مورد نیاز برای سازگاری باشد. افراد هتروزیگوت، آلل‌های متنوعی را در خزانه ژنی حمل می‌کنند و با مشارکت مثبت در ایجاد تنوع و قابلیت سازگاری با شرایط محیطی مختلف، از نظر اقتصادی، مقاومت به بیماری‌ها و نرخ باروری بسیار حائز اهمیت هستند (Wang et al., 2022). هنگام بررسی جمعیت‌های ماهی‌ها به منظور حفاظت ژنتیکی ذخایر موجود، علاوه بر تنوع ژنتیکی، غناء آللی جمعیت‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا آلل‌های تخصصی به‌خصوص آلل‌های نادر از اهمیت بالایی در ایجاد تنوع ژنتیکی در نسل‌های بعدی برخوردارند (Jafari et al., 2025; Najafikhah et al., 2022). آلل‌های نادر، از فراوانی پایینی در جمعیت‌ها برخوردارند (کمتر از یک درصد) و در نتیجه، حذف این آلل‌ها تأثیر چشمگیری بر میزان تنوع ژنتیکی موردمشاهده نخواهد داشت. از این‌رو، هنگام مطالعه جمعیت‌ها، علاوه بر بررسی هتروزیگوسیتی موردمشاهده، غناء آللی جمعیت مورد مطالعه نیز باید مد نظر قرار گیرد. بر اساس نتایج حاصله در مطالعه حاضر، ۱۰۵ آلل تخصصی در ذخیره مولدین فیل‌ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری یافت شد این در حالی است که در مطالعه صورت گرفته با استفاده از هشت جفت نشانگر ریزماهواره، به طور میانگین تعداد ۷ آلل واقعی و ۴ آلل مؤثر در این ذخیره ثبت شده بود (Moghim et al., 2025). تفاوت موردمشاهده در تعداد آلل شناسایی‌شده در این دو مطالعه، می‌تواند به دلیل روش‌های مختلف ژنوتایپینگ و قابلیت بالای روش‌های نوین مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید در شناسایی پلی مورفیسم و کشف آلل‌ها را در سرتاسر ژنوم فیل‌ماهی ارائه دهد. فراوانی آللی بالای مولدین فیل‌ماهی موجود در انستیتو در این مطالعه و در مقایسه با سایر جمعیت‌های موردبررسی در ایران به‌وسیله نشانگرهای ریزماهواره می‌تواند گویای خزانه ژنی غنی فیل‌ماهی در انستیتو ماهیان خاویاری باشد که احتمالاً از

امکانات آزمایشگاهی به منظور اجرای پروژه حاضر، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G. and Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2): 81-92. DOI:10.1038/nrg.2015.28
- Antognazza, C.M., Vanetti, I., De Santis, V., Bellani, A., Di Francesco, M., Puzzi, C.M., Casoni, A.G. and Zaccara, S., 2021. Genetic investigation of four beluga sturgeon (*Huso huso*, L.) broodstocks for its reintroduction in the Po River basin. *Environments*, 8(4):1-13. DOI:10.3390/environments8040025
- Barría, A., Christensen, K.A., Yoshida, G.M., Correa, K., Jedlicki, A., Lhorente, J.P., Davidson, W.S. and Yáñez, J.M., 2018. Genomic predictions and genome-wide association study of resistance against *Piscirickettsia salmonis* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using ddRAD sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(4):1183-1194. DOI:10.1534/g3.118.200053
- Boscari, E., Marino, I.A., Caruso, C., Gessner, J., Lari, M., Mugue, N., Barmintseva, A., Suci, R., Onara, D., Zane, L. and Congiu, L., 2021. Defining criteria for the reintroduction of locally extinct populations based on contemporary and ancient genetic diversity: The case of the Adriatic Beluga sturgeon (*Huso huso*). *Diversity and Distributions*, 27(5):816-827. <https://doi.org/10.1111/ddi.13230>

جمعیت‌ها و مکان‌های جغرافیایی مختلف در این مجموعه تکثیر و نگهداری شده‌اند. در مطالعه‌ای که بر سه جمعیت فیل ماهی شامل دریای کاسپین، آزوف و دریای سیاه با استفاده از ۲۷ جفت نشانگر ریزماهواره و ۸۹۳ نشانگر SNP به اجرا در آمد که میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت دریای کاسپین به ترتیب ۰/۶۲ و ۰/۱۸ گزارش گردید (Boscari *et al.*, 2021). از این‌رو، مقایسه نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با سایر نتایج، به نوبه خود می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی بالاتر گونه فیل ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین باشد. نتایج حاصل از بررسی خوشه‌های ژنتیکی احتمالی در ذخیره مولدین فیل ماهی در انستیتو بر اساس روابط هم‌تباری، حاکی از ساختار جمعیتی مختلط بود، ولی نتایج نشان داد که مولدین فیل ماهی مورد بررسی در حداقل دو خوشه ژنتیکی اصلی قابل تقسیم‌بندی و ردیابی هستند به طوری که در خوشه اول ۱۴ مولد و در خوشه دوم، ۹ مولد قرار می‌گیرد. مشاهده ساختار مختلط به نوعی تأییدکننده نتایج یافت شده در مطالعه قبلی بر هشت ذخیره از این گونه بوده (Moghimi *et al.*, 2025) و به نظر می‌رسد، مزارع فیل ماهی در کشور از تنوع درون جمعیتی نسبتاً بالا و بر عکس تنوع بین جمعیتی پایینی برخوردار باشند. روش‌های نوین مبتنی بر توالی‌یابی ژنومی مانند GBS و whole genome sequencing قادرند تا تغییرات ژنتیکی را در ریزمقیاس، مورد بررسی قرار دهند و حتی زیر جمعیت‌های شکل گرفته درون هر جمعیت را با دقت و وضوح بیشتری نمایان سازند. از این‌رو، در مطالعه حاضر SNPs به دست آمده از GBS توانستند هاپلو تیپ‌های ژنتیکی موجود را در خزانه ژنی فیل ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین‌المللی، شناسایی کنند. این موضوع می‌تواند در حفظ و احیاء تنوع ژنتیکی ذخیره فیل ماهی موجود در انستیتو ماهیان خاویاری و برنامه‌ریزی تکثیر هدفمند بر اساس شناسنامه ژنومی تهیه شده، بسیار کاربردی باشد و پایه‌گذاری به‌گزینی را در ماهیان خاویاری با ایجاد لاین‌های ژنتیکی فراهم سازد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله، از مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و سازمان شیلات ایران برای حمایت مالی و فراهم سازی

- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. and Cresko, W.A., 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11):3124-3140. DOI:10.1111/mec.12354
- Çiftci, Y., Eroğlu, O. and Firidin, Ş., 2013. Mitochondrial cytochrome b sequence variation in three Sturgeon species (*A. stellatus* Pallas, 1771, *A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833, *H. huso* Linnaeus, 1758) from the Black Sea coasts of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(2). DOI:10.4194/1303-2712-v13\_2\_11
- Dudu, A., Georgescu, S.E. and Costache, M., 2014. Molecular analysis of phylogeographic subspecies in three Ponto-Caspian sturgeon species. *Genetics and Molecular Biology*, 37:587-597. DOI:10.1590/s1415-47572014000400016
- Farasati, S., Khoshkholgh, M. and Yarmohammadi, M., 2020. Genetic diversity of cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) brood stocks by using Microsatellite method. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 8(8):55-72. (in Persian)
- Freyhof, J., Bergner, L. and Ford, M., 2020. Threatened Freshwater Fishes of the Mediterranean Basin Biodiversity Hotspot: Distribution, extinction risk and the impact of hydropower. *EuroNatur and RiverWatch*, i-viii:1-348. DOI:10.7479/c6d4-2f73
- Friedrich, T., Reinartz, R. and Gessner, J., 2019. Sturgeon re-introduction in the Upper and Middle Danube River Basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(5):1059-1068. <https://doi.org/10.1111/jai.13966>
- IUCN, 2025. The IUCN red list of threatened species. Version 2025-1. Available at: <https://www.iucnredlist.org>. (accessed on 02.07.2025)
- Jafari, O., Zeinalabedini, M., Robledo, D., Fernandes, J.M., Hedayati, A.A. and Arefnezhad, B., 2022. Genotyping-by-sequencing reveals the impact of restocking on wild common carp populations of the Southern Caspian Basin. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10:872176. DOI:10.3389/fevo.2022.872176
- Jafari, O., Nasrolahpourmoghadam, M. and Zeinalabedini, M., 2025. 16S rRNA revealed a low rate of maternal genetic variations in *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 across the southern Caspian Sea. *International Journal of Aquatic Biology*, 13(1): 1-7. DOI:10.22034/ijab.v13i1.2184
- Kazemi, R., Yarmohammadi, M., Yousefi Jordehi, A. and Hassanzadeh saber, M., 2021. Genetic characterization of great sturgeon brood stocks- recommendations for the conservation management and aquaculture. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 9(1):61-70. (in Persian)
- Kottelat, M. and Freyhof, J., 2007. Handbook of European freshwater fishes (Vol. 13). Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 646 P.
- Langmead, B. and Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.

- Nature Methods*, 9(4):357-359.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Liu, S., Ferchaud, A.L., Grønkjær, P., Nygaard, R. and Hansen, M.M., 2018.** Genomic parallelism and lack thereof in contrasting systems of three-spined sticklebacks. *Molecular Ecology*, 27(23):4725-4743. DOI:10.1111/mec.14782
- Malinsky, M., Trucchi, E., Lawson, D.J. and Falush, D., 2018.** RADpainter and fineRADstructure: population inference from RADseq data. *Molecular Biology and Evolution*, 35(5):1284-1290. DOI:10.1093/molbev/msy023
- Moghim, M., Javanmard, A., Lolaei, F., Taghavi, M.J. and Bakhshalizadeh, S., 2025.** Nuclear multi-microsatellite marker profiling provides clues to molecular genetic diversity in culture-based Caspian Beluga Sturgeon (*Huso huso*) broodstocks: Ecological mirror for restoration. *Veterinary Medicine and Science*, 11(3):e70255. DOI:10.1002/vms3.70255
- Najafikhah, A., Jafari, O., Nasrolahpourmoghadam, M. and Zeinalabedini, M., 2025.** Molecular genetic assessments of the ongoing restocking activities on *Salmo caspius* Kessler, 1877. *Journal of Fish Biology*, 2025: 1-10. DOI:10.1111/jfb.70041
- Robledo, D., Palaikostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P. and Houston, R., 2018.** Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture*, 10(3):670-682. DOI:10.1111/raq.12193
- Sonah, H., Bastien, M., Iquira, E., Tardivel, A., Légaré, G., Boyle, B., Normandeau, É., Laroche, J., Larose, S., Jean, M. and Belzile, F., 2013.** An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping. *PloS one*, 8(1):e54603. DOI:10.1371/journal.pone.0054603
- Team, R.C., 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. 3946 P.
- Wang, J., Sun, Z., Jiang, L. and Hu, Y., 2022.** Developing microsatellite duplex PCR reactions for sterlet (*Acipenser ruthenus*) and their application in parentage identification. *Scientific Reports*, 12(1):12036. DOI:10.1038/s41598-022-16194-3