ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود با استفاده از روش توالی یابی DNA

فریدون چکمه دوز قاسمی[۱]•، محمد پورکاظمی[۳] مهتاب یارمحمدی[۲]، محمد حسن زاده صابر[۲]، احمد غرقی[۳]، لیلا عزیز زاده یرمهر[۲]
* chakmehdouz13@yahoo.com

۱- پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندر انزلی، بندر انزلی، صندوق پستی ۶۶
۲- موسسه تحقیقات تاسماهی ان دریای خزر، رشت، صندوق پستی ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵
۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران

تاریخ دریافت: تابستان ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش: تابستان ۱۳۹۳**

چکیده

هدف از این بررسی ارزیابی ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود با ناحیه کنترلی میتوکندریایی (ژن D-loop) و روش توالی یابی DNA ذخایر تاسماهیان سواحل جنوبی دریای خزر طی سال های ۱۳۹۱ – ۱۳۸۸ بود. روش کار شامل نمونه برداری توسط تور ترال کفی، استخراج DNA، واکنش های زنجیره ای پلیمراز و توالی یابی محصول PCR بود. شاخص های تنوع مولکولی، شاخص توزیع شکل گاما، شاخص F_{st} که نشاندهنده جدایی جمعیت ها می باشد، آزمون دقیق فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت ها، گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی با دو روش تست تاجیما و تست Fu F_S محاسبه، تجزیه و تحلیل و نتایج زیر بدست آمد: ۱۳ هاپلوتایپ، تنوع هاپلوتایپی یا ژنی۰/۱۰۱ ± ۰/۹۶۱، تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۱۵±۰/۰۳۸، شاخص توزیع شکل گاما ۰/۱۹، مقدار F_{st} یا فاصله جمعیتی در سطح احتمال ۰/۰۵ بین مناطق نمونه برداری اندک بود که پس از ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی فقط نمونه های سفیدرود با سایر نواحی نمو نه برداری اختلاف معنی دار داشت و آزمون تفاوت در داخل جمعیت ها این مسئله را مورد تأیید قرار داد. تاریخچه جمعیتی تاسماهی ایرانی غیر معین و شبیه به مدل بسط ناگهانی بود و مقدار کم شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱) آن را تأیید نمود. آزمون های بی طرفی تاجیما و شاخص Fu F_S بین مناطق به ترتیب ۰/۸۴- و ۰/۲۲۰- بود که هر دو شاخص منفی و معنی دار نبودند. نتایج نشان داد که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود جدا از سایر مناطق دیگر می باشد و با توجه به یکسان بودن جمعیت ها در مناطق دیگر، بایستی مدیریت ما هیگیری بمنظور افزایش تنوع ژنی و افزایش ذخایر جمعیت های مختلف این ماهیان با ارزش قبل از انقراض کامل آنها، اعمال گردد.

لغات کلیدی: تاسماهی ایرانی، ساختار ژنتیکی و جمعیتی، سواحل جنوبی دریای خزر، توالی یابی DNA

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

مقدمه

تاسماهیان (sturgeons) یکی از قدیمیترین و با ارزش ترین گروه ماهیان می باشند (به دلیل خاویار) که با توجه به قدمت ۲۰۰ میلیون ساله از زمان ژوراسیک تا زمان حال از آنها بعنوان فسیل های زنده نام می برند (Bemis *et al*., 1997) از ۲۷ گونه ماهیان خاویاری موجود در جهان (Raymarkers, 2002)، ۶ گونه از تاسماهیان متعلق به دو جنس *Acipenser* و *Huso* در دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن وجود دارند که امروزه قسمت اعظم خاویار تولیدی جهان را به خود اختصاص می دهند ولی بدلیل تاثیر عوامل انسانی از قبیل بهره برداری بیش از حد از ذخایر، تخریب زیستگاهها و افزایش عوامل آلودگی، تخریب مناطق تخمریزی و وجود موانع در مهاجرت آنها، جمعیت های این ماهیان در سراسر جهان منجمله ذخایر آنها در دریای خزر در معرض خطر انقراض قرار گرفته و سبب کاهش چشمگیر ذخایر تاسماهیان در این منبع آبی گردیده است (Pourkazemi, 2006). لذا اکثر تاسماهیان در لیست ماهیان درمعرض خطر اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت IUCN قرار گرفته اند (Dugo *et al*., 2004; Ludwig, 2008). در سالهای اخیر تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از مهمترین و اصلی ترین گونه های تکثیری در مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر در ایران بوده است و همه ساله تعداد زیادی از مولدین این گونه بصورت مصنوعی تکثیر و بچه ماهیان حاصله جهت بازسازی ذخایر به رودخانه های محل مهاجرت رهاسازی می شوند. در حال حاضر سهمیه صادرات خاویار کشورهای حاشیه دریای خزر بر اساس مصوبات کنوانسیون CITES ، منطبق بر انجام گشت های ارزیابی ذخایر و برآورد میزان تاسماهیان صید شده در هر منطقه می باشد. مطالعات مولکولی در زمینه ساختار ژنتیکی می تواند اطلاعات ارزشمندی را درخصوص شناخت جمعیت های احتمالی و به منظور کمک به تصمیمات مدیریت ما هیگیری و بقاء گونه های در معرض خطر را در اختیار مراجع ذیصلاح قرار می دهد (Rosenthal *et al*., 2006). هدف مدیریت ما هیگیری حفاظت و بهره برداری پایدار از ذخایر ماهیان می باشد که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از کیفیت و پراکنش ذخایر این ماهیان است. بنابراین قبل از اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی ضرورت دارد تا ساختار ژنتیکی جمعیتهای مربوطه را شناسایی و با روشهای مولکولی مورد ارزیابی قرار داد و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن تدوین و اعمال نمود (رضوانی گیل کلایی و همکاران،۱۳۸۰). ساختار ژنتیکی جمعیت تاسماهی ایرانی صید شده از گشت های ارزیابی ذخایر حوضه جنوبی دریای خزر تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و علیرغم تکثیر سالانه و رهاسازی بیش از دهها میلیون بچه تاسماهی ایرانی ، متاسفانه اطلاعات از ساختار ژنتیکی و جمعیتی این گونه در نواحی شیلاتی دریای خزر اندک بوده و این ماهیان بدون آگاهی از تنوع جمعیتی آنها مورد تکثیر قرار می گیرند که چه بسا ممکن است جمعیت یک منطقه در کارگاه بازسازی ذخایر منطقه دیگر مورد تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان حاصله قرار گیرند. بنابراین ضروری است قبل از انجام هر گونه برنامه های بازسازی ذخایر، به بررسی تنوع زیستی و جمعیتی آنها اقدام و با اطلاع از ساختار ژنتیکی آنها نسبت به تکثیر مصنوعی در جهت رهاسازی به همان منابع آبی در راستای افزایش ذخایر بومی اقدام نمود. در دهه های اخیر محققین علوم شیلاتی بمنظور شناسایی جمعیت های مختلف آبزیان و تعیین ساختار ژنتیکی آنها روش های نوین مولکولی نظیر PCR-RFLP، RAPD، AFLP، مایکروستلایت و توالی یابی DNA را جایگزین استفاده از روش های قدیمی مثل بررسی های مورفومتریک و مریستیک نموده اند. از بین این روش های مولکولی، توالی یابی DNA یکی از روش های نوین و دقیق مولکولی می باشد که در اکثر آزمایشگاههای شیلاتی و تحقیقاتی جهان بمنظور بررسی های خویشاوندی، جمعیتی و ساختار ژنتیکی انواع گونه های آبزیان مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این تحقیق، تعیین ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی با ژن D-loop میتوکندریایی و روش توالی یابی DNA در سطح مولکولی در رودخانه سفیدرود که یکی از اصلی ترین مکانهای مهاجرتی و تولید مثلی است و سواحل جنوبی دریای خزر بوده است. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

تاثیر قابل توجهی در بهبود و روند اجرایی سیاستهای مدیریت علمی ما هیگیری در بخش بازسازی ذخائر این گونه با ارزش سودمند واقع گردد.

مواد و روش ها

۵۸ نمونه تاسماهی ایرانی در اوزان مختلف از سواحل جنوبی دریای خزر (ناحیه دو شیلاتی ۱۲ نمونه، ناحیه سه شیلاتی ۲۴ نمونه، ناحیه چهار شیلاتی ۲۲ نمونه) با تورال ترال کفی توسط کشتی تحقیقاتی گیلان در اعماق بالای ۱۰ متر و لنج سی سرای ۲ در اعماق بایین ۱۰ متر (شکل ۱) صید و قسمتی از باله دمی آنها توسط قیچی بریده و داخل الکل ۹۶ درجه قرار گرفت و سپس به آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر منتقل شد.



شکل ۱ – نواحی شیلاتی نمونه برداری شده با تورال تور کفی

DNA ژنومی بافت باله دمی ۱۸ نمونه مناسب برای آنالیز داده ها (نواحی شیلاتی هر کدام ۵ نمونه و رودخانه سفیدرود ۳ نمونه) با روش استات آمونیوم (چکمه دوز قاسمی، ۱۳۸۴) استخراج و تمپلت DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. قبل از انجام PCR، کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و کمیت آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND1000 در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. از بانک ژن NCBI توالی ثبت شده ژنD-loop میتوکندریایی تاسماهی دریاچه ای انتخاب و یک جفت آغازگر به توالیTGG CAT CTG GTT CCT TC (forward) و GCA TGT GGG GGT AAT TGG AG (reverse) توسط نرم افزار Gene Runner سنتز شد. هر ویال از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) شامل ۱ میکرولیتر DNA ۱۰۰ نانوگرم، ۵ میکرولیتر PCR Buffer (10 X)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۳۰ پیکومول) و ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA polymerase پلیمراز با غلظت ۵u/µl (سیناژن، ایران) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) داخل دستگاه ترمال سایکلر BIOER مدل XP cycler (XP cycler gradient, 96 plus, Bioer, China) انجام شد و چرخه های حرارتی شامل: ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه (initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۱ درجه سانتیگراد برای اتصال (annealing)، ۴۵ ثانیه مرحله بسط (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط نهایی بود. برای اطمینان از عدم وجود آلودگی در واکنش PCR نمونه ها از یک ویال جداگانه کنترل منفی حاوی تمامی مواد بجزء تمپلت DNA استفاده شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه ها به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ باز(Fermentas GmbH, Germany) در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و بقیه آنها پس از ارسال به بخش مولکولی شرکت ماکروژن، خالص سازی (Purify) و به عنوان تمپلت DNA برای توالی یابی استفاده شدند. واکنش های توالی یابی DNA به همراه آغازگر forward ژن D-loop با بسته BigDye (BigDye kit v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) و

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

توسط دستگاه DNA analyzer مدل 3730XL (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

بازنگری توالی ها با نرم افزار Chromas 2.23 و ردیف خوانی آنها (Aligne) با نرم افزار Clustal W (Thompson *et al*., 1997) انجام شد. شاخص های تنوع مولکولی از قبیل تعداد هاپلوتایپ ها، مکان های چند شکلی (polymorphic sites)، جایگاههای انتقالی (transitions)، جایگاههای متقاطع (transversions)، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس آنها بر اساس مدل Nei, 1987 ، چند شکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism)، شاخص توزیع شکل گاما (gamma distribution shape parameter) به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان های مورد بررسی، واگرایی ژنتیکی بصورت جفتی داخل و بین مناطق نمونه برداری یا فاکتور F_{st} (Slatkin, 1991) که نشانه جدایی جمعیت ها می باشد با ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی بمنظور معنی دار یا عدم معنی دار بودن، فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت ها با استفاده از آزمون دقیق (exact test) بر اساس اختلاف هاپلوتایپی بین جمعیت ها، گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی (Historical demographic and spatial expansions) با دو روش ۱- تست تاجیما (D-test of Tajima, 1989) و تست Fu F_s (Fu, 1997)، با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 (Excoffier *et al*., 1992) و نرم افزار Dna SP (Rozas *et al*., 2003) محاسبه شد.

نتایج

توالی ۱۸ نمونه ژن D-loop تاسماهی ایرانی به اندازه ۳۱۵ باز (bp) ردیف خوانی (Aligne) شد و تمامی توالی ها در بانک ژن NCBI ثبت شد (JN646019 الی JN646036). سیزده هاپلوتایپ بدست آمد که ۹ هاپلوتایپ منحصر به فرد (unique) بود. هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین سه ناحیه شیلاتی و رودخانه سفیدرود وجود نداشت (جدول ۱).

شاخص توزیع شکل گاما بین مکان های مورد بررسی ۰/۱۹ محاسبه شد که نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه بود. نتایج تنوع مولکولی شامل ۲۶۳ جایگاه تک شکلی (مونومورف)، ۵۲ جایگاه ژنی چند شکلی (پلی مورف)، ۶۹ جایگاه انتقالی (transitions)، ۲۱ جایگاه متقاطع (transversions)، عدم مشاهده چند شکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism) و ۵۳ موتاسیون بود. میزان تنوع هاپلوتایپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) برای تمامی توالی ها به ترتیب ۰/۱۰۱ ± ۰/۹۶۱ و ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۳۸ بدست آمد. همچنین تنوع ژنتیکی هاپلوتایپ های به دست آمده در داخل هر جمعیت با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 محاسبه شد که این مقدار تنوع هاپلوتایپی (Hd) برای تمامی مناطق در حد بالا و در دامنه ۰/۱۰۱ – ۰/۹۰۰ الی ۰/۰۷۴ ± ۱ قرار داشت. مقدار تنوع نوکلئوتیدی (Pi) در بین مناطق نیز همانند تنوع هاپلوتایپی بالا و در دامنه ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۱۹ الی ۰/۰۳۳ ± ۰/۰۵۳ قرار داشت (جدول ۲). مقدار بالای محاسبه شده این دو شاخص می تواند نشان از وجود تنوع در این گونه با توجه به تاثیر عوامل انسانی در روند بازسازی ذخایر طبیعی و مصنوعی تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر باشد.

مقدار F_{st} محاسبه شده بین چهار جمعیت اندک بود بطوریکه کمترین فاصله جمعیتی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۴ شیلاتی (۰/۰۰۲-) و بیشترین فاصله جمعیتی بین ناحیه ۲ و ناحیه ۴ شیلاتی دیده شد (۰/۱۲۶). بر این اساس هرچند که میزان F_{st} بسیار اندک محاسبه گردید ولی در سطح احتمال ۰/۰۵ پس از ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی فقط نمونه های سفیدرود با سایر نواحی شیلاتی اختلاف معنی دار داشت ($p \leq$ ۰/۰۵) و سایر نواحی بصورت مقایسه جفتی اختلاف معنی دار نبود (جدول ۳).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

جدول ۱ – تعداد و پراکنش هاپلوتایپی ژن D-loop تاسماهی ایرانی

هاپلوتایپ / ناحیه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	جمع
۲		۱		۱	۱	۱	۱							۵
۳								۱	۱	۲	۱			۵
۴						۱		۱		۱		۱	۱	۵
سفیدرود	۱	۱	۱											۳
جمع	۱	۲	۱	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۳	۱	۱	۱	۱۸

جدول ۲ – اطلاعات تنوع ژنتیکی ژن D-loop تاسماهی ایرانی

ناحیه پارامتر	سفیدرود	۴	۳	۲
تعداد نمونه ها	۳	۵	۵	۵
جایگاه ها	۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵
تعداد جایگاه های چند شکل	۹	۱۸	۲۷	۳۴
چند شکلی اضافه و حذف(InDels)	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتایپ	۳	۵	۴	۵
تنوع نوکلئوتیدی (Pi)	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۱۸	۰/۰۴۰ ± ۰/۰۲۵	۰/۰۵۳ ± ۰/۰۳۳
تنوع هاپلوتایپی (Hd)	۱ ± ۰/۰۷۴	۱ ± ۰/۰۲۵	۰/۹ ± ۰/۱۰۱	۱ ± ۰/۰۳۶

جدول۳ - میزان F_{st} بر اساس فراوانی هاپلوتایپی (مثلث پایین) و میزان p-value (مثلث بالا) ژن D-loop تاسماهی ایرانی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	✸	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۳
۲	۰/۰۱۲	✸	۰/۲۵۳	۰/۱۲۳
۳	-۰/۱۶۶	۰/۰۷۰	✸	۰/۶۹۲
۴	-۰/۰۰۲	۰/۱۲۶	-۰/۰۴۹	✸

آزمون تفاوت جمعیت ها (non-differentiation exact p values) بین مناطق نمونه برداری در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد بین رودخانه سفیدرود و سایر نواحی شیلاتی معنی دار بود ($p \leq$ ۰/۰۵) و در بین سایر نواحی شیلاتی معنی دار نبود ($p\geq$ ۰/۰۵). این آزمون برای تمامی نمونه ها p = ۰/۷۷۰ محاسبه شد که معنی دار نبود. بر اساس فاکتور F_{st} و آزمون تفاوت محاسبه شده ژن D-loop بین جمعیت های تاسماهی ایرانی مناطق مورد مطالعه می توان بیان نمود که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود هنوز بعنوان یک جمعیت مستقل مطرح بوده که بایستی مدیریت شیلاتی مبنی بر بازسازی ذخایر آن بطور جدی اعمال گردد (جدول ۴) .

تاریخچه جمعیتی(demographic history) تاسماهی ایرانی با استفاده از آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی(mismatch distribution) که تفاوت ژنتیکی جفتی بین هاپلوتایپ ها می باشند و بر اساس بسط و گسترش ناگهانی (sudden expansion) غیر معین (unimodal) و شبیه مدل بسط ناگهانی بود (شکل ۲).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

جدول ۴ - میزان *p*-value آزمون تفاوت ژن D-loop تاسماهی ایرانی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	✸			
۲	۰/۰۱۴	✸		
۳	۰/۰۲۰	۰/۴۴۱	✸	
۴	۰/۰۳۳	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	✸



تصویر ۲ - تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن D-loop تاسماهی ایرانی

مقدار کم محاسبه شده شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱)، غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را مورد تایید قرار داد (جدول ۵). آزمون های بی طرفی (neutrality tests) تاجیما همانند شاخص Fu F_s برای ۱۸ توالی بین مناطق به ترتیب ۰/۸۴- و ۰/۹۹- محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی دار نبودند ($p\geq$ ۰/۰۱).

جدول ۵ - تست توزیع و پراکندگی عدم تطابق ژن D-loop تاسماهی ایرانی

منطقه	Tajima's D		Fu's F_S		Goodness-of-fit tests			
	P	*D*	*P*	F_S	Ragg✸ *P*	*P*	*SSD*
سفیدرود	۰/۷۳۰	۰/۰۰۰	۰/۴۲	۰/۵۸۷	۰/۸۷	۰/۴۴۴	۰/۱۸	۰/۲۱۵
ناحیه ۲	۰/۶۰۳	۰/۲۲۰	۰/۳۵	۰/۳۱۴	۰/۶۲	۰/۱۶۰	۰/۸۱	۰/۰۶۰
ناحیه ۳	۰/۴۹۴	-۰/۲۰۷	۰/۷۴	۱/۹۸۵	۰/۵۲	۰/۲۳۰	۰/۱۷	۰/۱۱۰
ناحیه ۴	۰/۵۶۱	۰/۱۳۶	۰/۲۲	-۰/۵۱۰	۰/۵۶	۰/۱۴۰	۰/۵۶	۰/۰۵۹
بین مناطق	۰/۵۹۷	۰/۰۳۷	۰/۴۲	۰/۵۹۴	۰/۸۰	۰/۰۶۱	۰/۴۳	۰/۱۱۱

✸ شاخص راجرز هارپندینگ، مجموع مربع انحرافات =*SSD*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

بحث

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقـاط جهـان بـا عث شده تا محققین علوم شیلاتی جهت مـدیریت ذخـایر آبزیان قبل از هر اقدام عملی به مطالعه و تعیـین سـاختار ژنتیکی گونه های با ارزش آن منطقه از طریـق روشـهای مولکولی روی آورند کـه در برنامـه هـای بهـره بـرداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبزی پـروری و برنامـه هـای اصلاح نژادی دارای اهمیت زیادی می باشد (Lin *et al*, 2002) و برای اینکار از داده های مربوط به تـوالی DNA استفاده می شود و از آنجاییکـه چنـین داده هـایی کمتـر تحت تاثیر شاخص انتخاب (Selection) قرارمی گیرنـد، بهتر می توانند سـاختار ژنتیکـی و جمعیتـی را مشـخص نمایند. ماهیان دریایی عموما بدلیل پراکنش زیاد در زمان لاروی یا بزرگسالی، عدم وجود موانـع فیزیکـی در مسـیر مهاجرت و عدم جدایی مکان های سطح اندکی از تمایز و اخـتلاف ژنتیکـی را دارا مـی باشـند (Hewitte, 2000). بیشترین پراکنش تاسماهی ایرانی در قسمت خزر جنوبی است بطوریکه گونه غالب را در بـین سـایر تاسـماهیان در این نواحی دارا بوده و در سال های اخیر بیشترین میـزان صید و استحصال خاویار از دریـا و نیـز مـدیریت شـیلاتی مراکز بازسازی ذخایر مبنـی بـر تکثیـر و رهاسـازی بچـه ماهیـان خاویـاری مخـتص تاسـماهی ایرانـی بـوده اسـت (Pourkazemi, 2006). با توجه به تخریب رودخانه های محـل مهـاجرت و تخمریـزی، عـدم تکثیـر طبیعـی در رودخانه ها، آلودگی های نفتی، رونـد افزایشـی صـید بـی رویه در سواحل جنوبی دریای خزر احتمال تکثیر مولدین بدون اطلاع از ساختار ژنتیکـی و جمعیتـی آنهـا همـواره وجود دارد که می تواند سبب افزایش ضریب همخونی در جمعیت های آن گردد. این رونـد در درازمـدت تـأثیرات سویی به دنبال دارد و به صورت تدریجی می تواند سـبب تخریب ذخایر ژنتیکی و نابودی تدریجی خزانه ژنی گونـه ها و جمعیت ها گردد که از عوارض آن می توانـد کـاهش سرعت رشد، کاهش میـانگین طـول، کـاهش درصـد هـم آوری و افزایش لاروهای نـاقص الخلقـه در یـک دوره ۲۵ الی ۴۰ ساله باشد (پورکاظمی، ۱۳۷۹). زمانیکه یک گونه خاص از ماهیان قرار است بـه عنـوان یـک منبـع حیـاتی مـدیریت شـود توانـایی ارزیـابی ژنتیکـی و دسترسـی بـه ساختار ژنتیکی جمعیت آنها می تواند بعنـوان یـک ابـزار قدرتمند در حفظ تولیدات شیلاتی آنها بکار گرفتـه شـود (Seeb *et al*.,1990). بنابراین اطلاع و آگاهی از سـاختار ژنتیکی و جمعیتی تاسـماهی ایرانـی در سـواحل جنـوبی دریای خزر قبل از هر گونه اقدام عملی در راستای ازدیـاد ذخایر آن ضروری و هدف از مطالعه حاضر بررسی ساختار ژنتیکی و جمعیتـی تاسـماهی ایرانـی طـی گشـت هـای ارزیابی ذخایر سـال هـای ۱۳۹۱ – ۱۳۸۸ بـا اسـتفاده از روش تـوالی یـابی DNA و ژن D-loop میتوکنـدریایی بود.

تعداد موتاسیون مشاهده حاصل از ۳۱۵ باز ردیف شده برای ژن D-loop تاسماهی ایرانی در بین جمعیت های مناطق مورد مطالعه و مقدار شاخص توزیع شکل گاما نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه بود. Grunwald و همکاران (۲۰۰۲) معتقدند که تنوع هاپلوتایپی ژن D-loop در ماهیان دریایی مخصوصا تاسماهیان از مقدار متوسط تا بالا و این مقدار برای تنوع نوکلئوتیدی از کم تا متوسط می باشد. ایشان میزان تنوع هاپلوتایپی ژن D-loop را برای تاسماهی پوزه کوتاه *Acipenser brevirostrum* ۰/۶۴۱ الی ۰/۸۱۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲۲ الی ۰/۰۰۵۷ را بدست آوردند هر چند که این مقدار برای تاسماهی آتلانتیک *A.oxyrinchus oxyrinchus* بسیار کمتر محاسبه شده بود (Wirgin *et al*., 2000). در این بررسی بر اساس اختلاف نوکلئوتیدی ۱۳ هاپلوتایپ، تنوع ژنتیکی بر اساس میزان تنوع هاپلوتایپی (Hd) ۰/۹۶۱ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۸ بدست آمد. Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بررسی ساختار جمعیتی و ژنتیکی تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود و سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از ژن D-loop، تعداد ۶ هاپلوتایپ، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بین مناطق را به ترتیب (۰/۰۲۸ ±۰/۶۴۰) و (۰/۰۱۱ ± ۰/۰۴۴) محاسبه نمودند. ایشان بر اساس شاخص F_{st} عنوان کردند که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود با سه ناحیه آستارا، نوشهر و بندر ترکمن دارای

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

اختلاف معنی دار بوده و یک جمعیت مجزا می باشد و سه ناحیه دیگر با یکدیگر دارای اختلاف جمعیتی نمی باشند. هاپلوتایپ های مختلف بدست آمده در چهار منطقه مورد مطالعه این بررسی و عدم اشتراک همگی آنها نشان از وجود تنوع در تاسماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود و با توجه به تمامی عوامل طبیعی و انسانی صورت گرفته در سالهای گذشته می تواند باشد. در این بررسی میزان تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی ژن D-loop برای تاسماهی ایرانی کمی بیشتر از نتایج سایر محققین بود ولی نتایج تنوع ژنتیکی بدست آمده از این ژن مشابه سایر گونه های تاسماهیان می باشد (Zhang *et al*., 2003; Wirgin *et al*., 2000; Quattro *et al*., 2002). ساختار ژنتیکی جمعیت ها مداوما در حال تغییر و تحول می باشد که این تغییر بستگی به میزان تولید مثل بین جمعیت ها دارد. جمعیت کارگاههای تکثیر بزرگترین عامل تغییر ساختار ژنتیکی نسبت به جمعیت رودخانه ها بوده و معمولا از لحاظ اندازه کوچکتر از جمعیت رودخانه می باشند. کاهش اختلاف ژنتیکی از طریق آمیزش خویشاوندی و رانش ژنتیکی در بین جمعیت های کارگاه های بازسازی ذخایر امری متداول می باشد. شاخص F_{st} بر اساس تست AMOVA به روشنی نشان داد که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود مستقل از جمعیت سایر نواحی شیلاتی می باشد درحالیکه اختلاف آماری معنی داری بین نمونه های سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس این شاخص بدست نیامد و این مسئله نیز توسط آزمون دقیق(exact test) جمعیتی مورد تائید قرار گرفت. مقدار p معنی دار نبود ولی در تایید فاکتور F_{st} این آزمون بین رودخانه سفیدرود و سه منطقه دیگر دارای اختلاف معنی دار بود و در مجموع این دو آزمون نشان دادند که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود هنوز به عنوان یک جمعیت مستقل و بومی سواحل جنوبی دریای خزر بوده و بایستی مدیریت شیلاتی مبنی بر بازسازی ذخایر این جمعیت با ارزش اعمال و در برنامه های تاسماهی پروری در اولویت قرار گیرد. آزمون های بی طرفی ($P\geq$ ۰/۰۵، $P\geq$ ۰/۰۱; Fs= -۰/۱۶۰، D= -۰/۵۱) هر دو منفی، غیر معنی دار، غیر معین و شبیه مدل بسط ناگهانی راجرزهارپندینگ بودند و نشان دادند که یک بسط و گسترشی در تاسماهی ایرانی و در مناطق مورد مطالعه صورت گرفته است و این می تو اند بدلیل اجرای سیاستهای بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی و یا جابجایی مولدین در زمان تولید مثل بین کارگاههای بازسازی ذخایر بوده باشد. در حقیقت وجود تنوع ژنتیکی و هتروزایگوسیتی بالا در این گونه بین دو حوزه آبریز رودخانه های سفیدرود و گرگانرود، به احتمال اجرای همین سیاستها و روند تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان به رودخانه های محل مهاجرت عنوان شده بود (Chakmehdouz *et al*., 2011). بر اساس نتایج حاصل از توالی ژنD-loop این بررسی می توان اذعان داشت که با توجه به بسط و گسترش جمعیت های تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر، هنوز تنوع ژنتیکی و مولکولی در این گونه وجود دارد ولی به سبب بسط جمعیت ها در اثر فعالیت های انسانی و در یک دوره زمانی کوتاه مدت که درسال های گذشته اتفاق افتاده زمان برای رسیدن جمعیت های تاسماهی ایرانی به تعادل ژنتیکی کافی نبوده است.

در مجموع نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک جمعیت مجزا از سه ناحیه شیلاتی دیگر میباشد و جمعیت های این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر یکی می باشند ولی نتیجه گیری نهایی در این باره منوط به بکارگیری سایر ژن های میتوکندریایی در کنار سایر روش های مولکولی نظیر مایکروستلایت، RFLP، AFLP می باشد ارزیابی نتایج این بررسی و بکارگیری نتایج آن درآینده می تواند راهگشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح جمعیت های تاسماهی ایرانی که گونه غالب صید تاسماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر می باشد بخصوص جمعیت رودخانه سفیدرود و ذخایر این گونه با ارزش گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می دانند تا از سهراب دژندیان، محمدرضا بهروز خوشقلب، علی حلاجیان

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

و محمود توکلی به جهت جمع آوری نمونه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

پورکاظمی، م.، ۱۳۷۹. مدیریت و بازسازی ذخایر پایدار. مجموعه مقالات بازسازی ذخایر. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج. تهران. ص ۳۰ – ۱۷.

چکمه دوز قاسمی، ف.، ۱۳۸۴. مقایسه روشهای استخراج DNA در آبزیان و دستورالعمل کاربردی آن. پایان نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان (رشت). ۵۳ صفحه.

رضوانی گیل کلایی، س.، بابایی، س.ع. و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن DNA control region sequences. Molecular Ecology, 11: 1885-1898.

Hewitt G.M., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature, 405: 907–913.

Khoshkholgh M., Pourkazemi M., Nazari S., Azizzadeh Pormehr L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser percicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. Caspian Journal of Environmental Science, 9:(1)17-25.

Lin Y.S., Poh Y.P., Lin S.M., Tzeng C.S., 2002. Molecular techniques to identify freshwater Eels. Zoological Studies 41(4):421-430.

Ludwig A., 2008. Identification of Acipenseriformes species in trade. Journal of Applied Ichthyology, 24:2–19.

سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲: ۳۰ – ۱۵.

Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L., 1997. An overview of Acipenseriformes. Environmental Biology of Fish, 48: 25-71.

Chakmehdouz Ghasemi F., Pourkazemi M., Tavakolli M., Yarmohammadi M., Hassanzadeh Saber M., Baradaran Noveiri S., 2011. Application of microsatellite markers to determine populations of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the South of Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(4): 596-606.

Dugo M.A., Kreiser B.R., Ross S.T., Slack W.T., Heise R.J., Bowen B.R., 2004. Conservation and management implications of fine-scale genetic structure of Gulf sturgeon in the Pascagoula river, Mississippi. Applied Ichthyology, 20: 243-251.

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M . ,1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131:479–49.

Fu Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality Of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147:915–925.

Grunwald C., Stabile J., Waldman J.R., Gross R., Wirgin I., 2002. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Pourkazemi M., 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past, present and future. Applied Ichthyology, 22 (Suppl. 1): 12-16.

Quattro J.M., Greig T.W., Coykendall D.K., Bowen B.W., Baldwin J. D., 2002. Genetic issues in aquatic species mangement: the shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) in the southerneastern United states. Conservation. Genetic, 3:155–166.

Raymarkers C., 2002. Conservation and broodstock management. International trade in sturgeon and paddlefish species, The effect of CITES listing. International Reviews in Hydrobiology, 87(5-6): 525-537.

Rosenthal H., Pourkazemi M., Bruch R., 2006. The 5th International Symposium on Sturgeons: a conference with major emphasis on conservation, environmental mitigation and sustainable use of the sturgeon resources. Applied Ichthyology 22 (Suppl. 1):1-4.

Rozas J., Sa´nchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496–2497.

Seeb L.W., Seeb J.E., Polovina J.J., 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirus marginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. Fish Bulletin, 88:713–718.

Slatkin M., Hudson R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129: 555–562.

Tajima F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutationhypothesis by DNA polymorphism. Genetics, 123: 585–595.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid. Researches, 24: 4876–4882.

Wirgin I., Waldman J.R., Rosko L., Gross R., Collins M.R., Rogers S.G., Stabile J., 2000. Genetic structure of Atlantic sturgeon populations based on mitochondrial DNA control region sequences. Transactions of the American Fisheries Society, 129: 476-486.

Zhang S.M., Wang D.Q., Zhang Y.P., 2003. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. Conservation Genetic, 4: 673–683.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]

Population genetic structure of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) between South Caspian Sea and Sefidrud River using DNA sequencing method

Chakmehdouz Ghasemi F. [(1)]* ; Pourkazemi M.[(3)]; Yarmohammadi M.[(2)]; Hasanzadeh Saber M.[(2)]; Ghoroghi A. [(3)] ; Azizzadeh Pormehr L.[(2)]

chakmehdouz13@yahoo.com

1- Inland Aquaculture Research Institute, P.O.Box: 66 Anzali Port, Iran
2- International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran
3- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14965/149 Tehran, Karaj, Iran

Key words: *Acipenser persicus*, population genetic structure, South Caspian Sea, DNA sequencing

Abstract

The goal of this study was to analyse the population genetic structure of the Persian sturgeon **(***Acipenser persicus***)** between South Caspian Sea and Sefidrud River with mtDNA control region (D-loop gene) and DNA sequencing method during 2010 – 2012 sturgeon stock assessment project. Fish speciemns were collected by bottom trawl net. Extraction of DNA, PCR and DNA sequencing were carried out. Diversity index, the gamma distribution shape parameter for the rate heterogeneity among sites and nucleotide sequence, F_{st} index, exact test, the historical demographic pattern using neutrality tests and mismatch distribution analysis (D test of Tajima and Fs test of *Fu*) were analysed. Thirteen haplotypes were obtained, average (±SD) for haplotype diversity was 0.961 ± 0.101, nucleotide diversity was 0.038 ± 0.015, the gamma distribution shape parameter was 0.19, F_{st} index revealed little genetic structure between populations and the significant F_{st} value was seen by 10000 permutation only between Sefidrud River and Other Areas ($P \leq 0.05$) and was confirmed by exact test of population differentiation. Mismatch distribution for *Acipenser persicus* appeared to be unimodal, which closely matched the expected distributions under the sudden expansion model and supported by the low Harpending's Raggedness index (0.061). Tajima's D and Fu's *Fs* statistics were -0.84 and -0.220, respectively, and was not significant. The results of this study showed that the population of *Acipenser persicus* in Sefidrud River were genetically differentiated from South Caspian Sea and three other areas represented a single panmictic populations. Therefore, fisheries managements of this valuable species should be directed towards conservation of gene pools and increasing different populations.

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.1.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686]