(DOI): 10.22092/ISFJ.2025.134491 34(4) 19-28 Iranian Scientific Fisheries Journal

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

Jafari O.[1*]; Karamirad N.[2]; Golshan M.[3]; Sarpanah A.[1]; Zeinalabedini M.[4]; Abdollahzadeh E.[1]; Hassanzadeh Saber M.[1]; Nasrolahpourmoghadam M.[2,5]; Shakouri M.[2]; Mohseni M.[1]

[*]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 nudiventris 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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

decades ago and stablished 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; Barría *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/) 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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

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 coancecstry 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.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

مجله علمی شیلات ایران ۲۸-۱۹ (٤) ٣٤ (DOI): 10.22092/ISFJ.2025.134491

مقاله علمی – پژوهشی:

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

امید جعفری*[۱]، ناصر کرمی راد[۲]، مهدی گلشن[۳]، علی‌نقی سرپناه[۱]، مهرشاد زین‌العابدینی[٤]، اسماعیل عبداله‌زاده[۱]، محمد حسن‌زاده صابر[۱]، مریم نصراله پورمقدم[۵،۲]، مهدی شکوری[۲]، محمود محسنی[۱]

*Jaafari.omid@yahoo.com

۱- انستیتو تحقیقات بین المللی 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

٤- پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: تیر ١٤٠٤ تاریخ پذیرش: شهریور ١٤٠٤ تاریخ چاپ: آبان ١٤٠٤

چکیده

فیل‌ماهی 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[۱] به منظور برآورد تنوع ژنتیکی و تهیه شناسنامه مولکولی مبتنی بر ژنوم از ذخیره مولدین فیل‌ماهی 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[۲] در ژنوم فیل‌ماهی شد که بیشترین تعداد آن بر کروموزوم شماره ۵۸ مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل SNPs کشف‌شده نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی موردمشاهده در ذخیره مولدین فیل‌ماهی موجود در انستیتو، ۰/۳۵ است. همچنین ۱۰۵ آلل در ذخیره مولدین مورد بررسی یافت شد که بیانگر تنوع آللی 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 فیل‌ماهی در انستیتو در دو خوشه ژنتیکی، قابل تقسیم بندی هستند. میزان همخونی در مولدین فیل‌ماهی 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 تک‌نوکلئوتیدی، خزانه ژنی، درون‌آمیزی، 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/).

[1] Genotyping-by sequencing
[2] Single nucleotide polymorphism (SNP)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

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 به‌طوری‌که با توجه به گونه ممکن است سن بلوغ حداکثر تا ۲۰ سال به‌طول 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*)، شیپ (*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) به‌طوری‌که 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 آبزی‌پروری 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 ریزماهواره‌ها و نشانگرهای mtDNA به منظور انجام مطالعات تکاملی و

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

شناسایی ساختارهای جمعیتی در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Robledo *et al.,* 2018). از مهم‌ترین مطالعات صورت گرفته بر گونه فیل‌ماهی در ایران می‌توان به استفاده از هشت جفت نشانگر ریزماهواره به منظور برآورد میزان تنوع ژنتیکی این گونه در مزارع پرورشی کشور اشاره کرد (Moghim *et al.,* 2025). نتایج حاصل از چهار جفت نشانگر ریزماهواره حاکی از تمایز ژنتیکی پایین در دو گروه مولد پرورشی فیل‌ماهی بود (Farasati *et al.,* 2020) که این نتیجه در تناقض با میزان بالای تمایز ژنتیکی موردمشاهده بین دو جمعیت پرورشی مورد بررسی از فیل‌ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین بود (Kazemi *et al.,* 2021). به رغم مزایای قابل‌توجه نشانگرهای ریزماهواره، پیشرفت‌های 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 بررسی‌های دقیق، کامل و متنوع‌تری را در همه گونه‌ها حتی گونه‌های فاقد ژنوم مرجع فراهم می‌سازد (Sonah *et al.,* 2013; Andrews *et al.,* 2016; Barría *et al.,* 2018; Liu *et al.,* 2018). در مطالعه صورت گرفته بر گونه فیل‌ماهی از SNPs حاصل از توالی‌یابی GBS به منظور ایجاد یک معیار برای بازتعریفی جمعیت انقراض یافته محلی، از فیل‌ماهی دریای آدریاتیک استفاده شد (Boscari *et al.,* 2021). به رغم اهمیت بالای گونه فیل‌ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین و برای آبزی‌پروری ماهیان خاویاری در ایران، تاکنون مطالعه جامعی با استفاده از روش‌های نوین مبتنی بر توالی یابی ژنومی برای شناسایی خزانه ژنی زیست توده موجود صورت نگرفته است. از این‌رو، در مقاله حاضر برای اولین بار در ایران، از تکنیک تعیین ژنوتیپ با استفاده از توالی‌یابی (GBS) در سطح ژنوم به منظور برآورد میزان تنوع ژنتیکی و شناسایی هسته‌های ژنتیکی احتمالی در ذخیره مولدین فیل‌ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری به عنوان یکی از مهم‌ترین مراکز توزیع بچه ماهی خاویاری در کشور استفاده گردید.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری، استخراج DNA و توالی‌یابی

قبل از نمونه‌گیری به منظور جلوگیری از ایجاد استرس، مولدین به مدت یک هفته قطع غذادهی شدند. بافت باله دمی از ۲۳ قطعه مولد فیل‌ماهی در بانک ژن زنده انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری نمونه‌برداری شد. به هر مولد یک تگ ترانسپوندر یکپارچه غیرفعال PIT[1] با کد مخصوص به‌خود اختصاص یافت که در حین نمونه‌برداری ثبت گردید. نمونه‌ها 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-کلفرم با برخی اصلاحات جزیی (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، DNAs در تیوپ‌های مخصوص استریل منتقل شده و پس از کددهی اختصاصی، نمونه‌ها برای توالی‌یابی ژنومی دو طرفه ۱۵۰ جفت باز با استفاده از دستگاه Illumina Novaseq 6000 به خارج از کشور (Novogene, China) ارسال شدند.

تجزیه‌وتحلیل‌های ژنومی و پردازش داده‌ها

داده‌های های حاصل از توالی یابی ژنومی به منظور بررسی کیفیت خوانش‌ها با استفاده از TrimGalore مورد بررسی قرار گرفتند (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). سپس خوانش‌ها به ژنوم مرجع فیل‌ماهی در محیط bowtie2 هم‌ردیف شده (Langmead and Salzberg, 2012) و در نهایت فراخوانی SNPs بر Stacks انجام گرفت. سپس از بسته Populations به منظور استخراج آماره‌های ژنتیکی در سطح ژنوم مانند تنوع نوکلئوتیدی، میزان درون‌آمیزی، تنوع ژنتیکی و غناء آللی استفاده شد (Catchen *et al.,* 2013). همچنین به منظور افزایش کیفیت داده‌ها، تنها پنجره‌هایی در مجموعه داده حفظ شدند که حداقل از کیفیت ۲۰ برخوردار بودند. پس از فراخوانی نشانگرها، فیلتر کردن فایل

[1] Passive Integrated Transponder (PIT)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

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 نرم‌افزار 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).

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 فیل‌ماهی بودند. توالی یابی دو طرفه ژنومی باعث تولید ۲۶۱۹۷۴۴۵۹ خوانش گردید که میانگین همردیفی آن‌ها به ژنوم مرجع ۹۰ درصد به‌دست آمد (جدول ۱).

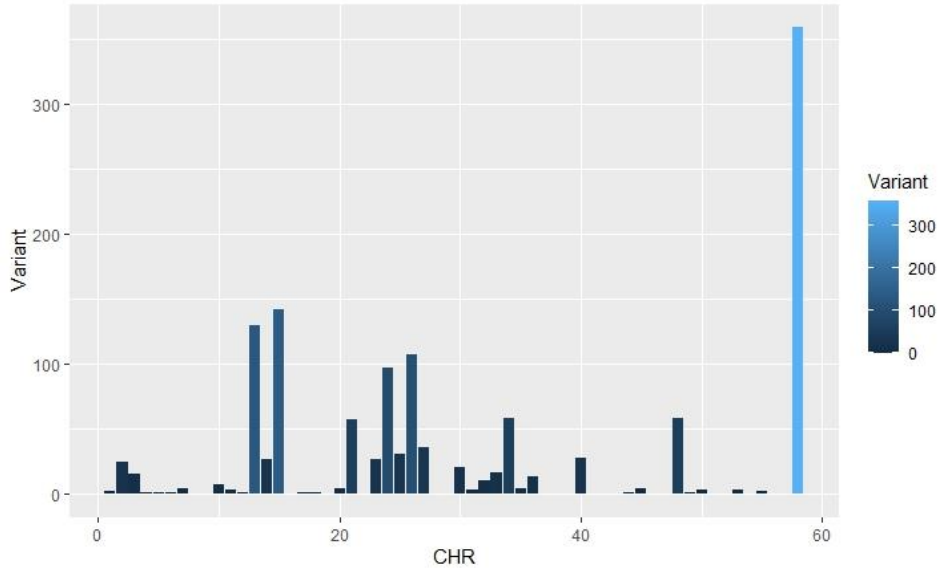
جدول ۱: خوانش‌های خام به‌دست آمده از توالی‌یابی GBS در گونه فیل‌ماهی

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

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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]



شکل ۱: تعداد نشانگر SNP یافت شده بر کروموزوم‌های ژنوم فیل‌ماهی (محور X و Y به‌ترتیب 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)

بر اساس نتایج به‌دست آمده از SNPs حاصل از توالی‌یابی ژنومی، میزان تنوع ژنتیکی مورد مشاهده در ذخیره مولدین فیل‌ماهی ۰/۳۵ به‌دست آمد. همچنین میزان درون‌آمیزی و تنوع نوکلئوتیدی به‌ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۲۸ محاسبه شد (جدول ۲). نحوه توزیع تنوع ژنتیکی در ذخیره مولدین فیل‌ماهی با استفاده از دو مؤلفه اول PCA در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCA دو مؤلفه اول ۳۱/۸۹ درصد واریانس را به‌خود اختصاص دادند. نتایج حاصل از روابط تبارشناختی بر اساس اشتراک‌گذاری‌های ژنومی نیز نشان داد که مولدین مورد بررسی از فیل‌ماهی 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.

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی برخی آماره‌های ژنتیکی به‌دست آمده از داده‌های GBS در گونه فیل‌ماهی

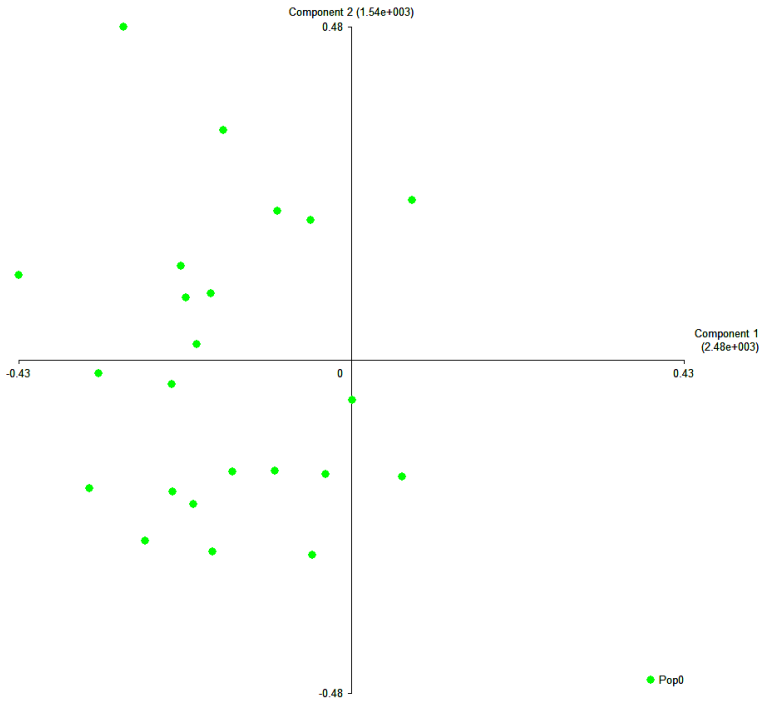
Table 2: Results of some genetic indices obtained from GBS in *H. huso*

Parameter	Value
An	105
He_o	0.36
H_o	0.64
He_E	0.27
H_E	0.72
π	0.28
F_{is}	0.019

An: تعداد آلل، He_o: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_o: هموزیگوسیتی مشاهده شده، He_E: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، H_E: هموزیگوسیتی مورد انتظار، π: تنوع نوکلئوتیدی، F_{is}: ضریب درون آمیزی

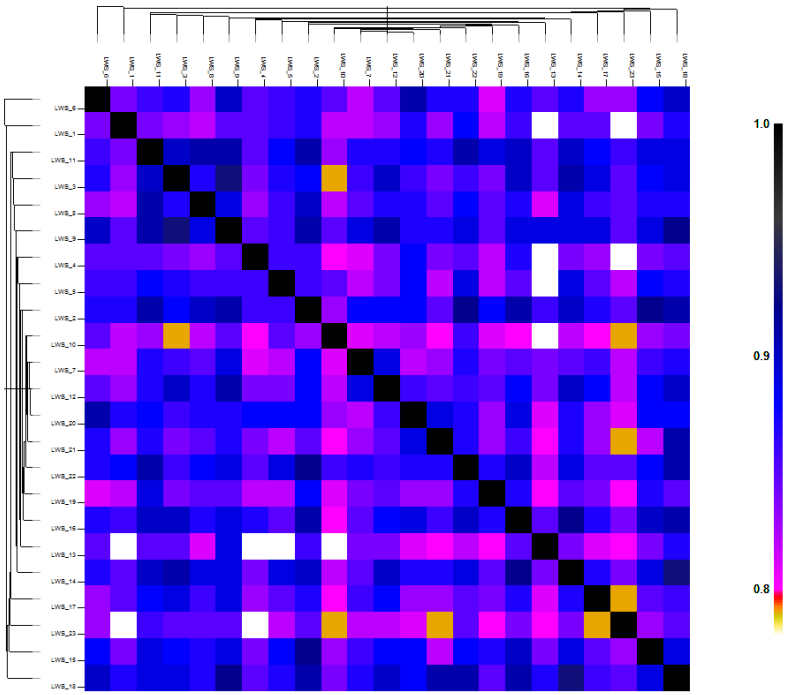
An: number of alleles, He_o: observed heterozygosity, H_o= Observed homozygosity, He_E: Expected heterozygosity, H_E: Expected homozygosity, π: Nucleotide diversity, F_{is}: Inbreeding coefficient.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]



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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

بحث

شناسایی ذخایر ژنتیکی و حفظ تنوع ژنتیکی از مهم‌ترین اقدامات عملی در مدیریت ذخیره مولدین در یک فعالیت آبزی‌پروری پایدار و نیز در برنامه‌های بازسازی ذخایر است. در صنعت پرورش ماهیان خاویاری، نگرانی ویژه‌ای در خصوص کاهش تنوع ژنتیکی در آبزی پروری 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 بین المللی 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 توالی یابی 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 آبزیان 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 بین المللی 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.,* 2022; Najafikhah *et al.,* 2025). 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 توالی یابی 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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

جمعیت‌ها و مکان‌های جغرافیایی مختلف در این مجموعه تکثیر و نگه‌داری شده‌اند. در مطالعه‌ای که بر سه جمعیت فیل‌ماهی 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 به‌ترتیب ۰/۶۲ و ۰/۱۸ گزارش گردید (Boscari *et al.,* 2021). از این‌رو، مقایسه نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر با سایر نتایج، به‌نوبه خود می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی بالاتر گونه فیل‌ماهی در حوضه جنوبی دریای کاسپین باشد. نتایج حاصل از بررسی خوشه‌های ژنتیکی احتمالی در ذخیره مولدین فیل‌ماهی در انستیتو بر اساس روابط هم‌تباری، حاکی از ساختار جمعیتی مختلط بود، ولی نتایج نشان داد که مولدین فیل‌ماهی مورد بررسی در حداقل دو خوشه ژنتیکی اصلی قابل تقسیم‌بندی و ردیابی هستند به‌طوری‌که 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 (Moghim *et al.,* 2025) و به‌نظر می‌رسد، مزارع فیل‌ماهی در کشور از تنوع درون جمعیتی نسبتاً بالا و بر عکس تنوع بین‌جمعیتی پایینی برخوردار باشند. روش‌های نوین مبتنی بر توالی یابی 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 به‌دست آمده از GBS توانستند هاپلوتیپ‌های ژنتیکی موجود را در خزانه ژنی فیل‌ماهی موجود در انستیتو تحقیقات بین‌المللی، شناسایی کنند. این موضوع می‌تواند در حفظ و احیاء تنوع ژنتیکی ذخیره فیل‌ماهی موجود در انستیتو ماهیان خاویاری و برنامه‌ریزی تکثیر هدفمند بر اساس شناسنامه ژنومی تهیه‌شده، 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 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., Suciu, 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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

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.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]

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., Palaiokostas, 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

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-27]