

بررسی کاربرد توالی یابی ناحیه کنترلی DNA (D loop) میتوکندریایی در مطالعه تنوع ژنتیکی جمیعت‌های تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) دریای خزر

سجاد نظری^{*}^۱، محمد پورکاظمی^۲، مجید رضا خوش خلق^۳

s.nazary@areeo.ac.ir

- ۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردا آبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- ۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران، صندوق پستی ۱۱۴۴

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی تعیین ساختار ژنتیک جمیعت تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) دریای خزر با روش توالی یابی قطعه ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی بود. برای این منظور، تعداد ۴۵ نمونه باله تاسماهی ایرانی از آبهای ساحلی مناطق مختلف دریای خزر جمع‌آوری گردید. ناحیه کنترلی با استفاده از روش PCR تکثیر و توالی یابی با استفاده از روش استاندارد انجام پذیرفت. تعداد ۱۲ هاپلوتایپ متفاوت در بین نمونه‌های بررسی شده، مشاهده گردید. تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در نمونه‌ها به ترتیب برابر با 0.037 ± 0.0046 و 0.0046 ± 0.00042 بود. بیشترین تعداد هاپلوتایپ (۷ عدد) در بین نمونه‌های رودخانه سفیدرود بود که از این تعداد ۳ هاپلوتایپ A، B و E اختصاصی بوده و در سایر مناطق مشاهده نشدند. نتایج تجزیه و تحلیل شاخص ثبتیت (F_{ST}) بر اساس روش دوپارامتری و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که نمونه‌های رودخانه سفیدرود با نمونه‌های مناطق روسیه و آذربایجان اختلاف معنی‌داری دارند ($P < 0.001$) و در نهایت وجود سه جمیعت شناسایی گردید. با توجه به تنوع بالای موجود در ناحیه کنترلی، توالی این ناحیه می‌تواند به عنوان یک نشانگر مناسب برای شناسایی و تعیین واحدهای حفاظتی و مدیریتی ذخایر جمیعت‌های احتمالی تاسماهی ایرانی به کار گرفته شود و همچنین می‌تواند اطلاعات ارزشمندی از کاربرد روش‌های مولکولی را به منظور ژنتیک حفاظت این گونه ارائه نماید.

لغات کلیدی: تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus*، توالی یابی، DNA میتوکندریایی، دریای خزر

*نویسنده مسئول

مقدمه

تاکنون چندین مطالعه در خصوص ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی ایرانی دریای خزر با استفاده از روش‌های مختلف فیزیولوژیک و شاخص‌های سرم خون (پروانه، بیک دوردی، ۱۳۷۶؛ بیک دوردی، ۱۳۷۳؛ پورکاظمی، ۱۳۸۷؛ Moghim *et al.*, 2012) برای مثال، عطائی (۱۳۸۱)، Khoshkholgh *et al.*, 2013; Rezvani Gilkolaei and Skibinski, 1999 توالی‌یابی (چکمه دوز قاسمی و همکاران، ۱۳۹۳) و ریزماهواره^۲ انجام پذیرفته است (خوش خلق، ۱۳۸۵؛ Vecsei and Artyukhin, 2001). در حال حاضر، با توجه به ذخایر مشترک تاسماهی ایرانی و اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی نژاد بومی ایران و همچنین موضوع تجارت بین‌المللی خاويار زیر نظر کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های در حال انقراض^۱، ضروری است تا نشانگر مولکولی تفکیک جمعیت‌های احتمالی این گونه با ارزش برای هر یک از رودخانه‌های مهم حاشیه خزر بویژه در سفیدرود و نمونه‌های محدوده آبهای روسیه، آذربایجان و قراقستان مورد بررسی قرار گیرد (Vecsei and Artyukhin, 2001).

نشانگرهای mtDNA به دلایل متعددی از جمله کوچک بودن اندازه، ژن‌های حفاظت شده و جهش بالا به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیکی جمعیت جانوران بکار برد می‌شوند. همچنین به دلیل اینکه mtDNA هاپلوتئید بوده و از یک والد به ارث می‌رسد، اندازه جمعیت آن یک Johnson *et al.*, 2018; Khoshkholgh and Nazari, 2019 مطالعات گسترده‌ای با استفاده از منطقه کنترلی (D) mtDNA loop در تاسماهیان مختلف منتشر شده و نشان داده‌اند، ساختارهای شجره‌شناسی جغرافیایی (فیلوژنتیک) گونه‌های نزدیک به یکدیگر و همچنین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف ماهیان را می‌توان به Roques *et al.*, 2018; Waldman *et al.*, 2019

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

بافت نرم باله دمی و پشتی (۳-۴ گرم) ۴۵ تاسماهی ایرانی از مناطق مختلف جنوبی، میانی و شمالی خزر (۱۳۸۲-۸۷)

² Microsatellite

¹ Convention of International Trade Endangered Species Fauna and Flora (CITES)

ایجاد باند قوی وضوح بالا و همچنین باندهای بدون اسمر، آلودگی و شکستگی انجام پذیرفت. برای تعیین کمیت DNA نمونه‌ها پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفوتومتری (مدل ND1000) با آب مقطر استریل، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت A_{2۶۰/۲۸۰} به کمک برنامه Nanodrop اندازه‌گیری و ثبت گردید.

شرایط PCR

برای بهینه کردن واکنش ابتدا PCR طبق مراحل ذیل انجام گرفت و سپس با توجه به ارزیابی محصول اقدام به تغییر شرایط گردید. در مرحله اول با مشخص نمودن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال (Annealing) آغازگرها به رشتہ الگو بدست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف باندهای اضافی، غلظت مناسب DNA $MgCl_2$ ژنومی، آغازگر و dNTPs (تهیه شده از شرکت ژن فناوران) بکار گرفته شد. پرایمرهای اختصاصی به کمک نرمافزار Gene Runner نسخه ۴.۵.۴۳ از توالی ثبت شده ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی تاسماهی (Pourkazemi, 1996) ایرانی در بانک ژن NCBI (Pourkazemi, 1996) طراحی گردید. توالی‌های مربوط به پرایمرهای طراحی شده قطعه حلقه D به شرح ذیل ارائه شده است:

۵'-CCATTAGATGATATACACCA-3' (GC% = 35; T_m = 55 °C) پرایمر ۱

۵'-ATGTCGATGACAAACG-3' (GC% = 43, T_m = 59 °C) پرایمر ۲

(دستگاه ترمال سایکلر^۱ ساخت شرکت Eppendorf آلمان) به این صورت تعیین شد که واسرشته سازی^۲ اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. محصول PCR در ژل آگارز ۰/۸ درصد با نقطه جوش پایین خالص‌سازی شد و به شرکت ژن فناوران و

استفاده شده است. نمونه‌های بافت باله تاسماهیان بالغ صید شده در بخش جنوبی خزر از صیدگاههای شیلات استان گلستان (ناحیه چهار، ۵ نمونه)، استان مازندران (ناحیه سه و پنج، ۵ نمونه)، استان گیلان (ناحیه یک، ۶ نمونه و رودخانه سفیدرود، ۷ نمونه) جمع‌آوری و سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶٪ فیکس شده و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر منتقل شدند. نمونه‌های مناطق آذربایجان (۶ نمونه)، قزاقستان (۵ نمونه) و آبهای روسیه (۶ نمونه) نیز در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی موسسه موجود بودند و در روش توالی‌بایی منطقه کنترلی میتوکندریایی استفاده گردید.

DNA استخراج

در این بررسی روش استات آمونیوم برای استخراج DNA ژنومی طبق روش استاندارد استفاده گردید (Pourkazemi *et al.*, 2012). کیفیت DNA استخراج شده با روش الکتروفورز افقی (Sambrook *et al.*, 1989) بر ژل آگارز (۰/۹ درصد) و میزان فلورسانس ترکیب اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) جذب شده بوسیله DNA تعیین شد. کیفیت DNA نمونه‌ها با

ت انجام مراحل PCR و تکثیر قطعه مورد نظر، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده، ۱/۲ میکرولیتر از آغازگرها (۲۰ پیکومول)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، به همراه ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک DNA پلیمراز (۵U/μ)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR و ۱/۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار) استفاده و در نهایت حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR

¹ Thermal cycler

² Denaturation

Mont-Carlo و آزمون مربع کای^۳ طبق روش UPGMA با ۱۰۰۰ بار تکرار مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

در این بررسی محصول PCR قطعه ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی تاسماهی ایرانی، بر زل آگارز ۸٪ به همراه نشانگرهای ۵۰ جفت بازی، نشاندهنده تکثیر قطعه واحدی به طول حدود ۵۰۰ bp. محصول PCR که برای توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت، دارای باندهای قوی و بدون باندهای غیر اختصاصی، دایمر^۴ و اسمیر^۵ بودند. از مجموع ۵۰ جفت نوکلئوتید همتراز شده نمونه‌های مناطق مختلف، ۴۴ جایگاه متغیر در همه توالی‌ها مشاهده گردید. همه جانشینی بازها از نوع انتقالی بودند و هیچگونه حذف یا الحاق^۶ مشاهده نشد. ۱۲ ترکیب ترکیب هاپلوتاپ در بین نمونه‌های تاسماهی ایرانی مناطق مختلف دریایی خزر مشاهده گردید. تمامی هاپلوتاپ‌ها که بخشی از توالی قطعه ناحیه کنترلی تاسماهی ایرانی بودند، در بانک اطلاعاتی NCBI (FJ364156–FJ364162) ثبت گردیدند.

در بین نمونه‌های مناطق جنوبی دریایی خزر و رودخانه سفیدرود ۶ هاپلوتاپ مشخص گردید. تعداد ۵ هاپلوتاپ در نمونه‌های رودخانه سفیدرود مشاهده شدند که از بین آنها سه هاپلوتاپ A، B و E در دیگر مناطق جنوبی دریایی خزر مشاهده نشدند. در بین نمونه‌های سه منطقه مرکزی و شمالی دریایی خزر نیز تعداد ۶ هاپلوتاپ مشاهده شدند که از این تعداد ۵ هاپلوتاپ تنها در نمونه‌های مناطق روسیه، آذربایجان و قزاقستان مشاهده شد که از بین آنها هاپلوتاپ J بین مناطق مذکور مشترک بود و بیشترین فراوانی (۱۱/۱ درصد) را در مناطق خزر میانی و شمالی داشت (جدول ۱).

تکاپوزیست برای تعیین توالی ارسال گردیدند (تعیین توالی توسط نماینده شرکت ABI در آلمان صورت پذیرفت). به این ترتیب DNA به طور مستقیم در تکه‌های ذوب شده طبق روش استاندارد (Kretz and Brein, 1993)^۷ با ³⁵S o'cyclist Taq DNA و پرایمر ۱ به عنوان پرایمر توالی‌یابی در دمای الحاق ۵۵ درجه سانتی‌گراد بکار گرفته شد.

آنالیز آماری

توالی‌های قطعه ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی نمونه‌ها با استفاده از برنامه Clustal W 1.8 همتراز^۸ شدند. هاپلوتاپ‌های مربوط به قطعه D DNA میتوکندریایی با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مشخص گردیدند. تنوع هاپلوتاپی جمعیت‌ها با استفاده از شاخص Tajima Nei و (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. شاخص تشییت (Weir and Cockerham, 1984) F_{ST} بین هاپلوتاپ‌ها (Nei, 1972) بر اساس روش دوپارامتری (PHYLIP 3.56C; Felsenstein 1995) Kimura MEGA version 4.1 محاسبه گردید. برنامه آماری (Kumar et al., 2008)، برای ایجاد ماتریس فاصله انشعاب توالی بین هاپلوتاپ‌ها بکار گرفته شد و همچنین برای ایجاد درخت فیلوجنی به روش UPGMA از مدل جانشینی نوکلئوتیدی Jukes-Cantor استفاده گردید. میزان کل نسبت جایگزینی انتقالی/امتقاطع^۹ (R) بر اساس روش Kumar و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از فرمول ذیل بدست آمد:

$$R = [A^*G^*k_1 + T^*C^*k_2]/[(A+G)^*(T+C)]$$

k_1 : میزان احتمال جانشینی باز پورین و k_2 : میزان احتمال جانشینی باز پیریمیدین الگوی ساختار جغرافیایی با استفاده از AMOVA (آنالیز واریانس مولکولی) برآورد گردید (Excoffier et al., 1992). ساختار جمعیت به وسیله درخت فیلوجنی

^۳ Chi-square analysis

^۴ Dimer

^۵ Smear

^۶ Insertion/Deletion

^۷ Align

^۸ Transition/transversion

جدول ۱: توزیع هاپلوتایپ‌های قطعه ناحیه کنترلی نمونه‌های تاسماهی ایرانی در دریای خزر

Table 1: Distribution of mitochondrial haplotypes in the Persian sturgeon collections analyzed.

شماره هاپلوتایپ	مناطق / هاپلوتایپ	مجموع	آستانه آستارا	آذربایجان	روسیه	قزاقستان	ناحیه ۳	ناحیه ۴	ناحیه ۵	سفیدرود	ناحیه ۱
۱	A	۱					۱				
۳	B	۲					۳				
۱	C	۳		۱							
۱۱	D	۴	۲	۲	۳		۱				
۱	E	۵		۱							
۸	F	۶	۳	۱	۲	۲					
۴	G	۷	۱	۲		۱					
۱	H	۸			۱						
۴	I	۹			۳	۱					
۵	J	۱۰			۱	۱	۳				
۳	K	۱۱			۱	۲					
۳	L	۱۲			۳						
۴۵	مجموع	۱۲	۶	۵	۵	۶	۵	۵	۵	۶	۶

نتایج بررسی شاخص ثبت (F_{ST}) بر اساس روش دوپارتی Kimura (Kimura, 1995) نشان داد بین نمونه‌های تاسماهی ایرانی از ۸ منطقه مختلف دریای خزر تنوع ژنتیکی قابل قبولی وجود دارد و اختلاف معنی‌داری در برخی مناطق مشاهده گردید ($P < 0.001$). بعد از انجام تست ضریب تصحیح Bonferroni ($P = 0.003$) نیز برخی از اختلافات موجود بین مناطق نیز معنی‌دار نبودند ولی اختلاف بین نمونه‌های مناطق رودخانه سفیدرود، روسیه، آذربایجان معنی‌دار باقی ماند ($P < 0.05$). بین سایر مناطق، قبل و بعد از تست Bonferroni هیچگونه اختلافی مشاهده نگردید (جدول ۳).

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تاسماهی ایرانی در بعضی از مناطق دریای خزر وجود دارد ($P < 0.001$) بطوریکه ۶۵/۳۹٪ از درصد واریانس در بین نمونه‌های مناطق مختلف بود ($P < 0.001$) در حالیکه واریانس بین نمونه‌ها و درون جمعیت‌ها ۰/۰۴۳۲٪ و ۰/۰۳۸٪ ($P = 0.001$) و ۰/۰۲۳٪ نیز در بین جمعیت‌ها بود ($P < 0.001$).

آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت

نتایج نشان دادند که بیشترین تنوع هاپلوتایپی مربوط به رودخانه سفیدرود 0.944 ± 0.077 و ناحیه روسیه 0.936 ± 0.047 بودند (جدول ۲). فراوانی هاپلوتایپی نمونه‌های تاسماهی ایرانی رودخانه سفید رود با سایر نمونه‌ها از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.001$). آنالیز مربع کای با روش Mont-Carlo و اختلاف فراوانی هاپلوتایپ‌های ناحیه کنترلی mtDNA نیز این مسئله را تایید می‌نماید. بیشترین اختلاف فراوانی هاپلوتایپی نمونه‌های رودخانه سفید رود در ناحیه جنوبی دریای خزر با ناحیه ۳ (ایزده) بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.001$) ($\chi^2 = 42/86$) (جدول ۳). نتایج همچنین نشان دادند که نمونه‌های منطقه روسیه نیز اختلاف فراوانی هاپلوتایپی زیادی با سایر نمونه‌های سایر مناطق دارد و این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$) که بیانگر این است که نمونه‌های این منطقه نیز همانند رودخانه سفیدرود از جمعیت‌های متمايز یافته تاسماهی ایرانی هستند و آنالیز مربع کای این مسئله را تایید می‌کند.

جدول ۲: سطوح تنوع ژنتیکی نمونه‌های تاسماهی ایرانی (تنوع هاپلوتاپی $h \pm S.D.$ و تنوع نوکلئوتیدی $\pi \pm S.E.$).Table 2: Levels of genetic diversity within the samples of the Persian sturgeon (h , haplotype diversity; π , nucleotide diversity. Data shown as mean \pm standard error.

h	π	تعداد	تعداد	مناطق
۰/۷۲۳ \pm ۰/۰۲۷	۰/۰۰۵۹ \pm ۰/۰۰۴۴	۳	۶	آستارا
۰/۹۴۴ \pm ۰/۰۷۷	۰/۰۱۰۲ \pm ۰/۰۰۵۱	۵	۷	سفیدرود
۰/۶۹۶ \pm ۰/۰۲۵	۰/۰۰۵۲ \pm ۰/۰۰۴۸	۲	۵	ناحیه ۳ (ایزد)
۰/۷۸۹ \pm ۰/۰۳۴	۰/۰۰۶۲ \pm ۰/۰۰۵۶	۳	۵	ناحیه ۴ (بندرترکمن)
۰/۷۰۴ \pm ۰/۰۲۷	۰/۰۰۵۷ \pm ۰/۰۰۴۶	۲	۵	ناحیه ۵ (شیروود)
۰/۸۷۴ \pm ۰/۰۳۹	۰/۰۰۹۲ \pm ۰/۰۰۴۳	۴	۶	آذربایجان
۰/۹۳۶ \pm ۰/۰۴۷	۰/۰۰۹۸ \pm ۰/۰۰۴۹	۴	۶	روسیه
۰/۷۰۱ \pm ۰/۰۲۷	۰/۰۰۵۱ \pm ۰/۰۰۳۵	۲	۵	قراقتستان

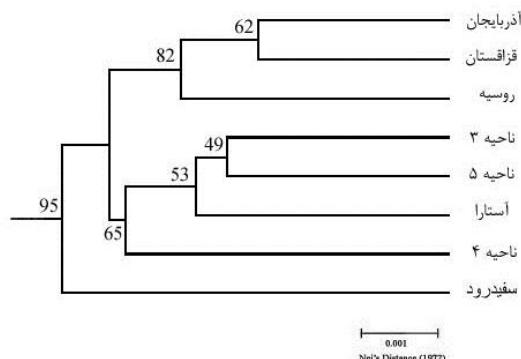
جدول ۳: مقایسه شاخص F_{ST} (مثلث بالا) سطح معنی‌داری مربع کای (مثلث پایین) در فراوانی هاپلوتاپهای ناحیه کنترلی mtDNA در تاسماهی ایرانیTable 3: Comparison of pairwise F_{ST} values (above diagonal) and pairwise chi-square values (below diagonal) between collections of *A. persicus* examined. Significant numbers were shown with an asterisk.

قراقتستان	روسیه	آذربایجان	۵ ناحیه	۴ ناحیه	۳ ناحیه	۲ سفیدرود	۱ آستارا	منطقه
۰/۱۸۲	۰/۲۵۱	۰/۱۷۱	۰/۰۳۵	۰/۰۵۴	۰/۰۹۷	۰/۲۵۱	-	آستارا
۰/۳۴۲	۰/۳۱۱	۰/۲۶۸	۰/۱۹۲	۰/۲۱۲	۰/۲۹۵	-	۳۵/۶۰*	سفیدرود
۰/۱۱۷	۰/۲۲۸	۰/۱۳۵	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	-	۴۲/۸۶*	۸/۳۴ (۰/۱۰۷۳)	ناحیه ۳
۰/۱۱۳	۰/۲۲۳	۰/۱۷۸	۰/۰۲۱	-	۲/۸۶ (۰/۱۶۲۴)	۱۹/۶۵*	۷/۲۱ (۰/۱۱۵۶)	ناحیه ۴
۰/۰۹۱	۰/۲۴۳	۰/۱۸۰	-	۴/۱۲ (۰/۱۵۸۹)	۷/۶۵ (۰/۱۲۲۰)	۲۵/۱۰*	۵/۳۶ (۰/۱۴۵۶)	ناحیه ۵
۰/۱۱۴	۰/۱۶۹	-	۱۲/۶۸ (۰/۰۵۱۰)	۲۱/۱۸*	۲۵/۱۰*	۳۸/۱۵*	۱۴/۲۴ (۰/۰۴۳۱)	آذربایجان
۰/۱۴۱	-	۲۴/۱۵*	۳۳/۱۳*	۲۹/۱۱*	۳۷/۲۰*	۵۵/۱۴*	۳۴/۴۱*	روسیه
۱۸/۱۹	۹/۸۴	۱۱/۲۱	۹/۹۸	۱۲/۱۴	۶۷/۳۳*	-	۱۴/۱۱ (۰/۰۶۱۰)	قراقتستان
(۰/۰۰۰۶)	(۰/۰۹۹۴)	(۰/۰۶۸۶)	(۰/۰۹۰۹)	(۰/۰۵۱۴)				

اعداد معنی دار با علامت (*) مشخص شده است.

قرار گرفته است. منطقه آذربایجان، قراقتستان و روسیه در یک خوش و نمونه‌های مناطق شیلاتی جنوبی دریای خزر نیز در خوش جدگانه ولی جزء زیر خوش نمونه‌های سفیدرود قرار گرفتند (شکل ۱).

همچنین ساختار جمعیت به وسیله درخت UPGMA، با ۱۰۰۰ بار مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج بدست آمده از AMOVA را تایید می‌نماید (شکل ۱). با توجه به درخت فیلوزنوتیک مشخص می‌شود که نمونه‌های رودخانه سفیدرود در ناحیه جنوبی دریای خزر در یک خوش جدگانه



شکل ۱: دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei, 1972) منطقه کنترلی mtDNA در نمونه‌های تاسماهی ایرانی.

Figure 1: An UPGMA tree of the population genetic distances (Nei, 1972) for the mtDNA control region sequence data from Persian sturgeon.

(Cathryn *et al.*, 2005; Barshad *et al.*, 2018) یافته‌های این بررسی نشان داد که فراوانی هاپلوتایپ‌های بدست آمده در مناطق مختلف اختلاف دارند که می‌تواند نشان‌دهنده وجود جمعیت‌های مختلف اکولوژیک این گونه باشد. نتایج آنالیز الکتروفورز سرم خون تاسماهی ایرانی (بروانه، ۱۳۷۳، بیک دوردی، ۱۳۷۶) و همچنین مطالعات Khoshkholgh *et al.*, ۱۳۸۷ DNA هسته‌ای (پورکاظمی، ۱۳۸۷؛ Moghim *et al.*, 2012) نیز وجود این اختلافات را تایید می‌نمایند. یافته‌های این مطالعه موافق با مطالعات چرخه زیستی این گونه بوده که در بررسی‌های (Putilina, 1985; Lagunova, 2001) محققین در نمونه‌های شمال دریای خزر نیز، and Artyukhin 1985) به لحاظ مورfolوژیک و پارامترهای مختلف چرخه زیستی نظری سن رسیدگی بلوغ، اندازه ماهیان مولد و زمان مهاجرت به رودخانه به منظور تخم‌ریزی (لاوئی، ۱۳۷۵) ممکن است از لحاظ ژنتیکی، جمعیت‌های مختلفی از تاسماهی ایرانی در شمال دریای خزر وجود داشته باشد.

بحث

نتایج بررسی توالی‌یابی ناحیه کنترلی mtDNA تاسماهی ایرانی وجود تنوع نوکلئوتیدی بالایی را در قسمت توالی‌های محافظت شده^۱ (CSBs) و همچنین نواحی با جهش‌های نوکلئوتیدی بالا^۲ (HVS1 و HVS2) نشان داد. محققین دیگری نیز برای شناسایی جمعیت‌های احتمالی ماهیان خاویاری استفاده از این نواحی را در قطعه ناحیه کنترلی پیشنهاد نمودند (Shedko, 2019; Wirgin *et al.*, 2018) بررسی حاضر وجود ۴۴ جایگاه متغیر و چندشکلی را مشخص نمود و تاکنون نتایج مطالعات ژنتیک جمعیت تاسماهیان نیز مقادیر بالایی از تعداد جایگاه‌های چندشکلی را در ژنوم mtDNA به اثبات رسانده‌اند (جدول ۴). همچنین با مقایسه نتایج مطالعات مختلف نشان داده می‌شود که هر چه طول توالی قطعه منطقه کنترلی بیشتر باشد، میزان نوکلئوتیدهای پلی‌مورفیک نیز بیشتر است.

در این بررسی هیچگونه حذف یا الحاق در توالی‌های ناحیه کنترلی مشاهده نگردید و انتقال بازهای پورین و پیریمیدین به یکدیگر به صورت C - T ↔ G - A بود. این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده خصوصیات ساختاری-عملکردی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندریالی باشد

¹ Conserved Sequence Blocks

² Hypervariable segment

جدول ۴: مطالعات جمعیتی انجام شده تاسماهیان با استفاده از قطعه D loop

Table 4: Population genetic studies of sturgeons using mtDNA D loop region.

منبع	تعداد نمونه	نوع روش	گونه
	اندازه جفت باز		
Grunwald <i>et al.</i> , 2002	۴۴۰	توالی‌یابی	<i>Acipenser brevirostrum</i>
Wirgin <i>et al.</i> , 2009	۵۵۰	توالی‌یابی	<i>A. brevirostrum</i>
Pourkazemi <i>et al.</i> , 1999	۱۰۰۴	RFLP	<i>A. gueldenstaedtii</i>
Ong <i>et al.</i> , 1996	۲۰۳	توالی‌یابی	<i>A. oxyrinchus</i>
Stabile <i>et al.</i> , 1996	۲۲۰	توالی‌یابی /	<i>A. oxyrinchus</i>
Waldman <i>et al.</i> , 2002	۲۴۵	توالی‌یابی	<i>A. oxyrinchus</i>
Grunwald <i>et al.</i> , 2008	۵۸۰	توالی‌یابی	<i>A. oxyrinchus</i>
Zhang <i>et al.</i> , 2003	۴۱۹	توالی‌یابی	<i>A. sinensis</i>
Shedko <i>et al.</i> , 2015	۷۹۶	توالی‌یابی	<i>A. schrenckii</i>
Cvijanovic <i>et al.</i> , 2015	۲۵۷	توالی‌یابی	<i>A. ruthenus</i>
Shedko, 2019	۸۱۲	توالی‌یابی	<i>A. schrenckii</i>
چکمه دوز قاسمی و همکاران، بررسی حاضر	۳۱۵	توالی‌یابی	<i>A. persicus</i>
	۵۰۰	توالی‌یابی	<i>A. persicus</i>

ناحیه جنوبی دریای خزر بعد از انجام تست ضربه Bonferroni تصحیح نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل استفاده از نمونه‌های کمتر و یا وجود جریان ژنی به دلیل شرایط یکنواخت سواحل جنوبی (Pourkazemi *et al.*, 1999) باشد. یافته‌های سایر محققین مشخص نمود که توالی‌یابی برآورد دقیق‌تری برای مشخص نمودن تغییرات احتمالی بین نوکلئوتیدهای ناحیه کنترلی می‌باشد. همچنین با نشان دادن چندشکلی‌های موجود در این ناحیه با استفاده از توالی‌یابی منطقه کنترلی mtDNA مشخص می‌گردد که روش بکار گرفته شده در بررسی حاضر، روشی قوی برای بررسی ساختار جمعیتی در سطوح درون‌گونه‌ای تاسماهی ایرانی می‌باشد و نتایج سایر محققین نیز یافته‌های این بررسی را برای تاسماهیان تایید می‌نماید (Wirgin *et al.*, 2009; Waldman *et al.*, 2019) در مطالعه هضم آنزیمی قطعه D loop (عطائی، ۱۳۸۱، میزان F_{ST} در ۳ جمعیت از تاسماهیان ایرانی جنوب دریای خزر، 0.0837 ± 0.0008 بدست آمد که در مقایسه با بررسی حاضر تمایز ژنتیکی کمتری وجود داشت و نشان‌دهنده سطح بالای تمایز ژنتیکی ناحیه کنترلی در روش

بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه کنترلی در نمونه‌های مورد مطالعه ۱۲ هاپلوتاپ را بر اساس تنوع نوکلئوتیدی مشخص نمود. چکمه دوز قاسمی و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای وجود ۱۳ هاپلوتاپ با میزان تنوع 0.961 ± 0.0008 را در ۱۸ نمونه تاسماهی ایرانی مشخص نمود. تحقیق حاضر تعداد جایگاههای با تنوع^۱ بیشتری را در ناحیه کنترلی تاسماهی ایرانی نسبت به مطالعه چکمه دوز قاسمی و همکاران (۱۳۹۳) مشاهده گردید. همچنین اندازه بزرگتر نمونه‌های بکار گرفته شده در بررسی حاضر می‌تواند بر تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتاپی تاثیرگذار باشد. این مسئله می‌تواند به دلیل اختلاف در اندازه توالی بکار گرفته شده و همچنین جایگاهی از ناحیه کنترلی مورد استفاده برای مطالعه جمعیتی باشد.

مقایسه دو به دوی شاخص F_{ST} ، آنالیز واریانس مولکولی و همچنین دندروگرام UPGMA بر اساس فاصله ژنتیکی (شکل ۱)، نمونه‌های تاسماهی ایرانی مناطق رودخانه سفیدرود، روسیه و آذربایجان با سایر مناطق جنوب دریای خزر نشان‌دهنده وجود سه جمعیت مستقل از گونه مزبور در دریای خزر می‌باشد. در نمونه‌های تاسماهی ایرانی در

¹ Variable sites

کارشناسان محترم آن بخش به دلیل حمایت‌های ارزنده‌شان در طول انجام این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

- بیک دوردی، پ.، ۱۳۷۶. شناسایی پروتئین‌های سرم خون ماهی قره برون و تعیین درصد آلبومین و گلوبولین‌های آن با استفاده از روش الکتروفورز با استات سلولز. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده علوم دریایی نور، ۱۰۶ صفحه.
- پروانه، ا.، ۱۳۷۳. تعیین نژادهای مختلف تاسماهی ایرانی با استفاده از الکتروفورز سرم خون. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران، ۱۱۴ صفحه.
- پورکاظمی، م.، ۱۳۸۷. طرح جامع ارزیابی ساختار ژنتیکی تاسماهیان دریای خزر. گزارش نهایی پروژه موسسه تحقیقات شیلات ایران. انتستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، ۳۵۴ صفحه.
- توكلی، م.، پرافکنده حقیقی، ف.، خوشقلب، م.، کیمرام، ف. و تقوی، ا.، ۱۳۸۹. ارزیابی ذخایر تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در حوضه جنوبی دریای خزر طی سالهای ۸۷-۸۸. مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۱): ۱-۸. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110278
- چکمه دوز قاسمی، ف.، پورکاظمی، م.، یارمحمدی، م.، حسن زاده صابر، م.، غرقی، ا. و عزیززاده، ل.، ۱۳۹۳. ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی (جنوبی) (*Acipenser persicus*) سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود با استفاده از روش توالی یابی DNA. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۲): ۲۱-۱۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103686
- خوش خلق، م.، ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی و روسی (*Acipenser* و *Acipenser persicus*) دریای خزر با استفاده از روش مایکروستلاستیت. پایان نامه دکترای تخصصی شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۵۰ صفحه.

توالی یابی می‌باشد. اگرچه برآورد میزان تمایز ژنتیکی بین نشانگرهای مولکولی متفاوت است ولی این مطالعه مشخص می‌سازد که تنوع موجود در بین نمونه‌های تاسماهی ایرانی باید مورد توجه قرار گیرد. این مطالعه و همچنین نتایج حاصل از PCR-RFLP و توالی یابی ناحیه کنترلی (عطائی، ۱۳۸۱؛ چکمه دوز قاسمی و همکاران، ۱۳۹۳) مشخص می‌سازد که حفاظت ژنتیکی جمیت تاسماهی رودخانه سفیدرود به رغم دخالت‌های انسانی که بر این رودخانه اعمال شده است، لازم می‌باشد. همچنین وجود ساختار جمعیتی بدست آمده در این بررسی در نمونه‌های مناطق آذربایجان و روسیه باید در مدیریت شیلاتی تاسماهی ایرانی مد نظر قرار گیرد و با توجه به اینکه جمعیت‌های مناطق خزر شمالی و مرکزی این گونه بشدت کاهش یافته است، باید در مطالعات آینده منشاء این جمعیت‌ها مشخص گردد.

یافته‌های این بررسی بر ضرورت تعیین منشاء ژنتیکی نمونه‌های تاسماهی ایرانی از مناطق دریای خزر در مطالعات آینده با استفاده از ترکیبی از روش‌های توالی یابی نسل جدید^۱ (NGS) و شناسایی نشانگرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی^۲ (SNP) تاکید می‌نماید. علاوه بر این، پیشنهاد می‌گردد که به منظور تفکیک بهتر جمعیت‌های تاسماهی ایرانی دریای خزر نمونه‌برداری از هر یک از رودخانه‌های کشورهای حاشیه دریای خزر انجام شود و با توجه به اهمیت گونه در معرض خطر تاسماهی ایرانی، مطالعات مشترک با کشورهای حاشیه دریای خزر صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان بر خود لازم می‌دانند از موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر و دانشگاه گیلان به جهت حمایت‌های علمی، اجرایی و مالی این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از مدیریت محترم بخش ژنتیک مولکولی جناب آقای دکتر نوروز فشامی و

¹ Next Generation Sequencing

² Single Nucleotide Polymorphism

- Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle.
- Grunwald, C., Maceda, L., Waldman, J.R., Stabile, J. and Wirgin, I., 2008.** Conservation of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*: delineation of stock structure and distinct population segments. *Conservation Genetics*, 9:1111–1124. DOI: 10.1007/s10592-007-9420-1.
- Johnson, B., Kemp, B. and Thorgaard, G., 2018.** Increased mitochondrial DNA diversity in ancient Columbia River basin Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *PLoS ONE*, 13: e0190059. DOI: 10.1371/journal.pone.0190059
- Khoshkholgh, M., Nazari, S. and Pourkazemi, M., 2013.** Population structure of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) populations in the southern part of Caspian Sea. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 9(1): 29–39. DOI:10.22067/ijab.v9i1.33304.
- Khoshkholgh, M. and Nazari, S., 2019.** The genetic diversity and differentiation of narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidea: Astacidae) in the Caspian Sea Basin, Iran as determined with mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Journal of Crustacean Biology*, 39 (2): 112–120. DOI: 10.1093/jcobi/ruy113.
- Kretz, K.A., and O'Brien, J.S., 1993.** Direct sequencing of polymerase chain reaction products from low melting temperature agarose. *Methods in Enzymology*, 218:72–79. DOI: 10.1016/0076-6879(93)18009-2.
- عطایی، ف. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۵۷ صفحه.
- لالویی، ف. ۱۳۷۵. بررسی چگونگی مهاجرت ماهیان خاویاری به رودخانه های تجن و گرگانرود. مجله علمی شیلات ایران، ۴ (۵): ۱۷-۳۰. DOI:10.22092/ISFJ.1996.116083
- Barshad, G., Marom, S., Cohen, T. and Mishmar, D., 2018.** Mitochondrial DNA transcription and its regulation: an evolutionary perspective. *Trends in Genetics*, 34:682–692. DOI: 10.1016/j.tig.2018.05.009.
- Billard, R., and Lecointre, G., 2001.** Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 355–392. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Cvijanovic, G., Adnadevic, T.B., Lenhardt, M.B. and Maric, S., 2015.** New data on sterlet (*Acipenser ruthenus*) genetic diversity in the Middle and Lower Danube sections, based on mitochondrial DNA analyses. *Genetika*, 47: 1051-1062. DOI: 10.2298/GENS1503051C.
- Excoffier, L., Smouse P.E. and Quattro, J.M., 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491. DOI: 10.1371/journal.pone.0226326.
- Felsenstein, J., 1995.** PHYLIP, Phylogeny inference package, version 3.57c.

- Kumar, S., Tamura, K. and Nei M., 2008.** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5: 150–163. DOI: 10.1093/bib/5.2.150.
- Lagunova, V.S., 2001.** Natural reproduction of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the lower Volga river. In: "Problems of research and sustainable use of marine natural resources". Astrakhan. P.118-124.
- Moghim, M., Heist, E.J., Tan, S.G., Pourkazemi, M., Siraj, S.S., Panandam, J.M., Pourgholam, R., Kor, D., Laloei, F. and Taghavi, M.J., 2012.** Isolation and characterization of microsatellite loci in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin, 1897) and cross-species amplification in four commercial sturgeons from the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(3): 548-558.
- Nei, M., 1972.** Genetic distance between population. *American Naturalists*, Pp: 283-242.
- Nei, M. and Tajima, F., 1981.** DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetic*, 97: 145-163.
- Ong, T.L., Stabile, J., Waldman, J.R. and Wirgin, I., 1996.** Genetic divergence of Atlantic and Gulf of Mexico sturgeon based on sequence analysis of the mtDNA control region. *Copeia*, 1996: 464–469. DOI: 10.2307/1446867.
- Pourkazemi, M. 1996.** Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian sea. Ph. D. thesis. University of Wales. Swansea, UK
- Pourkazemi, M., Nazari, S., Khoshkhogh, M.R. and Azizzadeh, L., 2012.** Genetic Relationships among Populations of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in the south Caspian Sea Detected by Mitochondrial DNA–Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 10(2): 215-226.
- Pourkazemi, M., Skibinski, D. O and Bearmore, A., 1999.** Application of mtDNA D-Loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 23-28. DOI: 10.1111/j.1439-0426.1999.tb00199.
- Putilina, L.A. and Artyukhin, E.N., 1985.** Some features of Persian sturgeon migration in the lower Volga River. *Ibid*, pp. 32-34.
- Rezvani Gilkolaei, S. and Skibinski, D.O.F., 1999.** Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon *Acipenser persicus* from the southern Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 1: 23-34. DOI: 10.22092/IJFS.2018.114874.
- Roques, S., Berrebi, P., Rochard, E., and Accolas, M., 2018.** Genetic monitoring for the successful restocking of species with low diversity: The case of the critically endangered European sturgeon, *Acipenser*

- sturio. Biological Conservation*, 221: 91–102. DOI: 10.1002/ece3.5268.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shedko, S. V., 2019.** Causes of the Excess of Frequency of SCH34 Mitotype in Population of Amur Sturgeon *Acipenser schrenckii* (Acipenseridae) Based on the Analysis of Complete Mitochondrial Genomes. *Russian Journal of Genetics*, 55(7): 922–926. DOI: 10.1134/S102279541502012X.
- Shedko, S.V., Miroshnichenko, I.L. and Nemkova, G.A., 2015.** Mitochondrial DNA sequence variation, demographic history, and population structure of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869. *Russian Journal of Genetics*, 51(2): 169–183.
- Vecsei P. and Artyukhin E., 2001.** Threatened fishes of the world: *Acipenser persicus* Borodin, 1897 (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes*, 61: 160. DOI: 10.1023/A:1011046303819.
- Waldman, J., Alter, S.E. and Peterson, D., 2019.** Contemporary and historical effective population sizes of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*. *Conservation Genetics*, 20: 167–184. DOI: 10.1007/s10592-018-1121-4.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370. DOI: 10.2307/2408641.
- Wirgin, I., Grunwald, C., Stabile, J., and Waldman, J., 2009.** Delineation of discrete population segments of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequence analysis. *Conservation Genetics*, 11:1011–1024. DOI: 10.1007/s10592-009-9840-1.
- Wirgin, I., Roy, N.K., Maceda, L., and Mattson, M., 2018.** DPS and population origin of sub-adult Atlantic sturgeon in the Hudson River. *Fisheries Research*, 207:165–170. DOI: 10.1016/j.fishres.2018.06.004.

Application of mitochondrial DNA sequences of the control region in genetic variability of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) Populations from the Caspian Sea

Nazari S.^{1*}; Pourkazem M.²; Khoshholgh M.R.³

*s.nazary@areeo.ac.ir

- 1- Shahid Motahary Cold-water Fishes Genetic and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Yasouj, Iran
- 2- Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran
- 3- Department of Fisheries, School of Natural Resources, University of Guilan, P.O. Box 1144 Sowmehsara, Iran

Abstract

Direct mitochondrial DNA (mtDNA) control region sequencing analysis was used to investigate population genetic structure of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the Caspian Sea. A total of 45 specimens were collected from different locations of the Caspian Sea. mtDNA control region was amplified using PCR. Direct sequencing was performed according to a standard method. The results showed that 12 haplotypes were observed among 45 samples in the method. The highest numbers of haplotypes were observed in the Sefidrud River in which 3 haplotypes A, B and E among them were specific for the river and were not observed in the other locations. The average haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were 0.795 ± 0.037 and 0.0062 ± 0.0046 , for control region sequencing, respectively. The results of F_{st} based on kimura- 2 parameters method and analysis of molecular variance (AMOVA) demonstrated that most variations occurred among the samples, and between samples of the Sefidrud and Russia and Azerbaijan are statistically significant ($P < 0.0001$). Therefore, three distinct populations including Sefidrud, Russia and Azerbaijan were identified. As mtDNA control region is a highly variable segment, it may be used as a potential marker for identifying populations and for determining their management and conservation units, leading to the useful application of molecular markers in investigating conservation genetics of the Persian sturgeon.

Keywords: *Acipenser persicus*; mitochondrial DNA; genetic variation, Caspian Sea

*Corresponding author