بررسی ساختار ژنتیکی ماهی ازون‌برون (*Acipener stellatus pallas*, 1771) در رودخانه‌های اورال، سفیدرود و گرگان‌رود به روش مولکولی میکروستلایت

*مهرنوش نوروزی[۱]، محمد پورکاظمی[۲] و احمد قاسمی[۳]

[۱]عضو هیأت علمی گروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، [۲]انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، [۳]گروه بیوتکنولوژی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۷

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی اوزون‌برون در شمال دریای خزر (رودخانه اورال) و جنوب دریای خزر (دهانه سفیدرود و گرگان‌رود) انجام شد. در کل ۱۳۸ نمونه ماهی بالغ از این سه منطقه، جمع‌آوری شد. در مجموع از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت که برای تاس‌ماهی دریاچه (*Acipenser fulvescens*) و پارو پوزه‌ماهی (*Scaphirhynchus platorynchus*) طراحی شده بود، بر روی DNA ژنومی بالـه دمی ماهی ازون‌برون استفاده گردید. محاسبات ژنتیکی شامل فراوانی اللی، الل‌های اختصاصی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، تعادل هاردی- واینبرگ، میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، شاخص R_{ST}، F_{ST}، جریان ژنی براساس آزمون AMOVA با استفاده از نرم‌افزار Biocapt و GenAlex انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که ۱۰ جفت از پرایمرها چندشکلی (پلی‌مورف) داشتند و ۱۰ جایگاه ژنی تولید نمودند، ۱ جفت تک‌شکل (مونومورف) و ۴ جفت آن در طی واکنش PCR تکثیر نشدند. میانگین اللی محاسبه شده براساس الگوهای باندی چندشکلی، ۱۲/۷ (دامنه آن از ۱۸-۸ در هر لوکوس در مناطق) و همه مناطق دارای الل اختصاصی بودند. میانگین هتروزایگوسیتی قابل انتظار و مشاهده شده به‌ترتیب ۰/۸۵۵ و ۰/۶۵۱ در مناطق نمونه‌برداری به‌دست آمد. در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) همه مناطق در بیش‌تر لوکوس‌ها خارج از تعادل بودند ($P\leq$۰/۰۰۱). دامنه F_{ST} براساس آزمون AMOVA، ۰/۰۵۸-۰/۰۴۸ به‌دست آمد و بین مناطق نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<$۰/۰۱). میانگین فاصله ژنتیکی براساس شاخص Nei (۱۹۷۲)، (±۰/۰۸)۰/۴۲۱ بین جمعیت‌ها محاسبه شد که نشان‌دهنده متمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مطالعه شده است. نتایج به‌دست آمده از این بررسی به همراه وجود اختلاف معنی‌دار R_{ST} بین مناطق نمونه‌برداری نشان‌دهنده وجود جمعیت‌های ژنتیکی متفاوت در دریای خزر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ماهی اوزون‌برون، ژنتیک جمعیت، دریای خزر، مارکر میکروستلایت

*مسئول مکاتبه: mnoroozi@tonekaboniau.ac.ir

مقدمه

استفاده اصولی و پایدار از ذخایر ارزش‌مند تاس‌ماهیان به‌خصوص در دریای خزر که به‌صورت مشترک توسط کشورهای حاشیه آن مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، در درجه اول نیازمند شناخت کامل از ذخایر و جمعیت‌های موجود این ماهیان می‌باشد. این آگاهی می‌تواند راه‌گشای برنامه‌ریزی برای مسئولان مربوطه و همه عوامل بهره‌بردار در جهت کمک به حفظ ذخایر موجود، کاهش فشار صید، رهاسازی اصولی بچه‌ماهیان تکثیر شده در مراکز مربوطه و گسترش فعالیت‌های تکثیر و پرورش مصنوعی تاس‌ماهیان دریای خزر باشد (Pourkazemi، ۲۰۰۶).

در طول قرن گذشته پراکنش و فراوانی اندازه جمعیت بسیاری از گونه‌ها به‌شدت تحت‌تأثیر از فعالیت‌های انسانی قرار داشته است. انقراض گونه‌ها، تکثیر مصنوعی و یا حمل انواع گونه‌ها به محل دیگر ساختار جمعیت‌ها را تحت‌تأثیر قرار داده می‌تواند سبب یکسان‌سازی ژنتیکی شود، بنابراین شناخت جمعیت‌های بومی و ساختار ژنتیکی جمعیت هر گونه امری مهم است (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵).

ماهی اوزون‌برون از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین گونه‌های تاس‌ماهیان دریای خزر محسوب می‌گردد و دارای دو نژاد می‌باشد که شامل اوزون‌برون خزر شمالی (*Acipener stellatus pallas*، ۱۷۷۱) و اوزون‌برون خزر جنوبی (*Acipener stellatus natio cyrensis*) است و به‌علت نبود اختلاف مورفومتریک و مریستیک تفکیک این دو از نظر ظاهری امکان‌پذیر نیست (کیوان، ۱۳۸۲). اوزون‌برون یک ماهی رود کوچ به رودخانه‌های بزرگ از جمله رودخانه‌های اورال (قزاقستان)، سفیدرود و گرگان‌رود (ایران) برای تخم‌ریزی است (کیوان، ۱۳۸۲) علل عمده کاهش تدریجی ذخایر این ماهیان آلودگی آب‌ها، احداث سدها بر روی رودخانه‌های ویژه مهاجرت تولیدمثلی آن‌ها، تخریب بسترهای تخم‌ریزی آن‌ها در رودخانه‌ها و از همه مهم‌تر صید بی‌رویه این ماهیان بوده است. بالا بودن سن بلوغ و تاخیر در تولیدمثل دوباره آن‌ها را نیز باید اضافه کرد (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵) بنابراین تکثیر طبیعی این ماهیان از جمله در حوزه جنوبی دریای خزر به حداقل خود رسیده است و مراکز تکثیر نیز مولدین مورد نیاز خود را از صیدگاه‌های حاشیه رودخانه‌ها و از دریا تامین می‌کنند در حالی‌که بر خلاف هزینه‌های بالای بازسازی ذخایر مشخص نیست که مولدین تکثیر شده مولدین بومی آب‌های ایران می‌باشند یا ماهیان حوزه شمالی هستند که برای تغذیه به جنوب دریای خزر مهاجرت نموده‌اند (Shabani و همکاران، ۲۰۰۶).

پیشرفت علم، استفاده از مارکرهای مولکولی که متأثر از فاکتورهای محیطی نمی‌باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان‌پذیر کرده است. از جمله این مارکرها، میکروستلایت می‌باشد که قادر است سطوح بالایی از پلی‌مورفیسم را نشان دهند (Zhao و همکاران، ۲۰۰۵؛ Chistiakov و همکاران، ۲۰۰۵). طبیعت چندالی میکروستلایت‌ها، توراث هم‌بارز، پوشش ژنومی وسیع و فراوانی بالا در تعیین رابطه خویشاوندی و توارث‌پذیری موجب شده که میکروستلایت‌ها کاربری موفقی با تنوع بالا در رشته‌های مختلف تحقیقی و عملی داشته باشند (Sekar و همکاران، ۲۰۰۹). از جمله مطالعات انجام شده بر روی این ماهی با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان به Pourkazemi (۱۹۹۹) و Shabani و همکاران (۲۰۰۶) اشاره کرد، البته هیچ‌یک از این بررسی‌ها نتوانست جمعیت‌های مختلف این ماهی را در آب‌های خزر جنوبی از هم تفکیک نماید.

هدف این پژوهش، شناسایی جمعیت‌های مختلف ماهی اوزون‌برون دریای خزر در مناطق نمونه‌برداری، تعیین میزان تنوع و فاصله ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های مختلف و احتمال یافتن مارکرهای مولکولی برای هر یک از جمعیت‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: تعداد ۱۳۸ نمونه ماهی بالغ صید شده از شمال دریای خزر شامل ۴۳ نمونه از رودخانه اورال، ۴۳ نمونه از سفیدرود و ۵۲ نمونه از گرگان‌رود جمع‌آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله دمی و پشتی جدا و سپس در الکل اتانول ۹۶ درصد نگهداری گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در جوار سد سنگر رشت منتقل شد.

استخراج DNA: استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم (Hillis و Moritz، ۱۹۹۰) تعدیل شده برای ماهیان خاویاری (Pourkazemi، ۱۹۹۹) با دستورالعمل زیر انجام گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید (Pourkazemi، ۱۹۹۹).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای بررسی ساختار ژنتیکی ماهی اوزون‌برون از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای جنس‌های *Acipenser* و *Scaphirhynchus* استفاده شد (McQuown و همکاران، ۲۰۰۰، *Spl-104, 105, 113, 163, 168, 170, 173*) و (May و همکاران، ۱۹۹۷، *LS-19, 34, 39, 54, 57, 62, 68, 69*).

محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گرفت. تصویر ژل‌های تهیه شده توسط دستگاه مستندسازی ژل[1] ساخت شرکت Vilber lourmant همراه با برنامه نرم‌افزاری Biocapt تهیه گردید.

آنالیز آماری: فراوانی اللی[2]، تعداد اللی (Na) و تعداد الل‌های مؤثر (Ne) در جایگاه‌های میکروستلایتی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، مقادیر RST و FST، ماتریس شباهت[3] و فاصله ژنتیکی[4] براساس Nei (۱۹۷۲) و تعادل هاردی واینبرگ براساس X^2، تنوع ژنتیکی براساس تست *AMOVA*[5] در سطح احتمال ۰/۰۱ در نرم‌افزار Gene Alex (Peakall و Smouse، ۲۰۰۵) محاسبه گردید.

نتایج

در این مطالعه از ۱۵ لوکوس مورد بررسی چهار تا از آن‌ها تکثیر نشده (69، 57، LS-62 و Spl-168) و یکی از لوکوس‌ها مونومورف نشان داد (LS-39). در هنگام شمارش الگوی باندی در تمامی جایگاه‌ها دو باند و در برخی موارد یک باند ضخیم دیده می‌شد که از دو باند دیگر تیره‌تر بود که از خصوصیات الگوی دیپلوئید است. در نهایت ۱۰ جفت آن تکثیر شده و پلی‌مورف (چندشکلی) بودند.

1- Gel Documentation
2- Allel Frequency
3- Genetic Identity
4- Genetic Distance
5- Analysis of Molecular Variance

جدول ۱- مقادیر تعداد آللی (Na)، آلل‌های مؤثر (Ne)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزایگوسیتی قابل انتظار (He)، تعادل هاردی واینبرگ (ns معنی‌دار نیست، *** P<۰/۰۰۱، ** P<۰/۰۱ و * P<۰/۰۵) در سه منطقه نمونه‌برداری ماهی ازون‌برون با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره

اندازه باند (جفت باز)	میانگین	گرگان‌رود	سفیدرود	اورال
دمای الصاق (درجه سانتی‌گراد)/		۵۲	۴۳	۴۳
تعداد چرخه				
LS-19				
	۱۳/۶۶	۱۵	۱۲	۱۴
۱۳۲-۲۱۳	۰/۹۶۶	۰/۹۲۳***	۱***	۰/۹۷۷***
۵۶ °C/35	۰/۸۸۲	۰/۸۷۹	۰/۸۸۸	۰/۸۸۱
LS-34				
	۰/۹۳۳	۱۱	۹(۱)	۸
۱۳۲-۱۸۰	۰/۶۱۴	۰/۶۳۵***	۰/۷۶۷***	۰/۴۴۲***
۵۸ °C/35	۰/۷۶۶	۰/۶۵۳	۰/۸۱۲	۰/۸۳۳
LS-54				
	۱۲	۱۵	۱۰	۱۱
۱۵۲-۲۲۴	۰/۵۶۳	۰/۵۹۶***	۰/۶۰۵***	۰/۴۸۸***
۵۹ °C/35	۰/۸۰۸	۰/۸۳۹	۰/۷۸۳	۰/۸۰۴
LS-68				
	۱۱/۶۶	۱۱	۱۲	۱۲
۱۰۴-۱۶۰	۰/۶۴۴	۰/۶۵۴***	۰/۵۸۱n.s	۰/۶۹۸***
۶۱/۲ °C/35	۰/۸۵۱	۰/۸۶۲	۰/۸۰۱	۰/۸۹۱
Spl104				
	۱۳/۶۶	۱۳	۱۴	۱۴
۱۸۴-۲۴۸	۰/۸۰۴	۰/۸۰۸*	۰/۸۶۰***	۰/۷۴۴n.s
۵۷ °C/25	۰/۸۹۵	۰/۸۸۰	۰/۹۰۵	۰/۹۰۰
Spl105				
	۱۰/۳۳	۱۲	۸(۲)	۱۱
۱۰۴-۱۸۰	۰/۴۵۲	۰/۶۳۵***	۰/۳۴۹***	۰/۳۷۲***
۵۹ °C/25	۰/۸۳۲	۰/۸۴۹	۰/۷۸۵	۰/۸۶۴
Spl113				
	۱۵/۳۳	۱۸	۱۱	۱۷
۲۶۰-۳۴۸	۰/۴۷۸	۰/۴۸۱***	۰/۴۶۵***	۰/۴۸۸***
۵۶ °C/35	۰/۸۸۲	۰/۸۸۳	۰/۸۶۹	۰/۸۹۵
Spl163				
	۱۳/۳۳	۱۵	۱۱	۱۴(۲)
۱۶۰-۲۴۴	۰/۶۸۸	۰/۵۷۷***	۰/۵۳۵***	۰/۹۵۳***
۵۸ °C/35	۰/۸۷۲	۰/۸۹۸	۰/۸۳۳	۰/۸۸۵
Spl170				
۵۸ °C/35	۱۴	۱۵	۱۳	۱۴(۳)
Alleles each Locus (private alleles)				
۲۰۰-۲۶۴	۰/۷۶۹	۰/۸۶۵***	۰/۹۷۷***	۰/۴۶۵***
	۰/۸۹۵	۰/۸۶۹	۰/۸۸۸	۰/۹۰۳
Spl173				
۵۸/۵ °C/30	۱۴	۱۵(۲)	۱۳	۱۴
۱۷۶-۲۹۶	۰/۵۳۳	۰/۵۷۷***	۰/۵۸۱***	۰/۴۴۲***
	۰/۸۶۷	۰/۸۷۵	۰/۸۵۷	۰/۸۷۰
تعداد کل اللی (الل اختصاصی)		۱۴۰(۲)	۱۱۳(۳)	۱۲۹(۵)
Ne		۷/۵۵	۶/۸۶	۸/۲۲
میانگین اللی				
	۱۲/۷۳	۱۴	۱۱/۳	۱۲/۹
Ho	۰/۶۵۱	۰/۶۷۵	۰/۶۷۲	۰/۶۰۷
He	۰/۸۵۵	۰/۸۵۱	۰/۸۴۲	۰/۸۷۳

در این بررسی، میانگین الل‌های مشاهده شده ۱۲/۷ و دامنه آن در لوکوس‌ها از ۸ (LS-34) تا ۱۸ (Spl-113) بود. دامنه تعداد کل الل مشاهده شده در مناطق نمونه‌برداری ۱۱۳ (سفیدرود)، ۱۲۹ (اورال) و ۱۴۰ (گرگان‌رود) بود. در مجموع از ۱۴۰ الل مشاهده شده ۷۰ الل آن در فراوانی بالاتر از ۰/۰۵ قرار داشتند. در همه مناطق نمونه‌برداری الل اختصاصی دیده شد. در مجموع ۱۰ الل اختصاصی یافت شد که حداکثر آن در نمونه‌های منطقه اورال ۵ عدد بود (جدول ۱). بیش‌ترین الل اختصاصی در لوکوس Spl-173، ۳ عدد و کم‌ترین آن در لوکوس LS-34 یک عدد بود. دامنه فرکانس الل‌های اختصاصی مشاهده شده از ۰/۵۸–۰/۷۰ بود.

به‌عنوان مثال در رودخانه اورال لوکوس Spl-163 دو الل اختصاصی نشان داد (یکی در فرکانس ۰/۱۵۱ و دیگری در فرکانس ۰/۱۱۶) و لوکوس Spl-170 نیز ۳ الل اختصاصی نشان داد (در فرکانس‌های ۰/۷۰۰، ۰/۱۱۶ و ۰/۱۷۰)؛ در منطقه سفیدرود لوکوس Spl-105 دو الل اختصاصی (یکی با فرکانس ۰/۲۷۶ و دیگری ۰/۰۵۸) و لوکوس LS-34 با یک الل اختصاصی (با فرکانس ۰/۱۷۴) شناسایی کرد. در منطقه گرگانرود، لوکوس Spl-173 با دو الل اختصاصی (یکی در فرکانس ۰/۲۲۱ و دیگری ۰/۰۵۸) نشان داد.

میانگین هتروزایگوسیتی قابل انتظار و هتروزایگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب ۰/۸۵۵ و ۰/۶۵۱ در مناطق نمونه‌برداری محاسبه شد. دامنه هتروزایگوسیتی مشاهده شده از ۰/۶۰۷ در اورال تا ۰/۶۷۵ در گرگان‌رود بود (جدول ۱). در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) همه مناطق در بیش‌تر لوکوس‌ها خارج از تعادل بودند ($P\leq$۰/۰۰۱). به‌جز LS-68 در سفیدرود و Spl-104 در اورال (جدول ۱).

نتایج آنالیز واریانس تمایز ژنتیکی، بین جمعیت‌ها در مناطق ۰/۰۴۲ و بین افراد داخل گروه‌ها ۰/۰۴۴ بود ($P=$۰/۰۱). میزان F_{ST} و R_{ST} براساس تست *AMOVA* بین مناطق نمونه‌برداری معنی‌دار بود ($P\leq$۰/۰۱). بنابراین هر یک از مناطق نمونه‌برداری دارای جمعیت‌های مجزایی می‌باشد. به‌طور معمول مقادیر F_{ST} و R_{ST} با یکدیگر متفاوت است (Balloux و همکاران، ۲۰۰۲) و مقدار R_{ST} بیش‌تر از میزان F_{ST} می‌باشد (جدول ۲) اما تفاوت بین این دو معنی‌دار نبود. میانگین فاصله ژنتیکی براساس Nei (۱۹۷۲)، (±۰/۰۸) ۰/۴۲۱ بین جمعیت‌ها محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۲– تمایز ژنتیکی در سه منطقه نمونه‌برداری ماهی ازون‌برون با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره شامل مقدار F_{ST} (در قسمت بالا) و R_{ST} (در قسمت پایین) و جریان ژنی (N_m) داخل پرانتز. مقادیر F_{ST} و R_{ST} براساس تست AMOVA ($P\leq$۰/۰۱) می‌باشد

	نمونه‌ها	Fst (Nm)		
		اورال	سفیدرود	گرگان‌رود
Rst (Nm)	اورال	–	۰/۰۵۳(۴/۴۸۲)	۰/۰۴۷(۵/۰۴۱)
	سفیدرود	۰/۴۳۳ (۰/۳۲۸)	–	۰/۰۵۸(۴/۰۷۸)
	گرگانرود	۰/۴۸۴ (۰/۲۶۶)	۰/۴۶۱(۰/۲۹۲)	–

بحث

در این بررسی به‌منظور جداسازی و تکثیر ژن موردنظر ماهی ازون‌برون از ۱۵ جفت پرایمر میکروستلایت طراحی شده برای تاس‌ماهی سبز و پاروپوزه ماهیان استفاده شد (McQuown، ۲۰۰۰؛ May و همکاران، ۱۹۹۷) و از آنجایی‌که میکروستلایت‌ها می‌توانند مناطق مشابهی را در سایر گونه‌ها تکثیر نمایند از این پرایمرها استفاده گردید. اما از کل پرایمرهای مورد استفاده فقط ۱۰ جفت آن در PCR تکثیر شدند. با وجود این‌که میکروستلایت‌ها را می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک که از جد مشترکی باشند در بیش‌تر موارد با موفقیت استفاده کرد، اما با افزایش فاصله فیلوژنتیکی میزان موفقیت کاهش می‌یابد و علت آن قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری میکروستلایت‌هاست که محل باند شدن با پرایمرها می‌باشد (Cui و همکاران، ۲۰۰۵).

مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی ماهی اوزون‌برون دریای خزر بسیار محدود است. Pourkazemi (۱۹۹۹) با استفاده از روش RFLP، تشخیص ندادن جمعیت این ماهیان را جریان بالای ژنی، حساسیت پایین روش به‌کار رفته، تعداد کم نمونه و مناسب نبودن ژن مورد مطالعه عنوان کرد. همچنین Shabani و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی دو ژن D-LOOP و ND5/6 میتوکندری توانست اوزون‌برون ولگا و حوزه جنوبی دریای خزر را از هم جدا کند. اما هیچ‌یک از مطالعات بالا قادر به تفکیک جمعیت‌ها در حوضه خزر جنوبی نبودند.

در این بررسی، اگرچه جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری را در میزان هتروزایگوسیتی و تعداد اللی در هر لوکوس نشان ندادند، اما تفاوت معنی‌داری در تمایز ژنتیکی نشان دادند. متأسفانه، بیش‌تر ماهیان بالغ صید شده برای تولید خاویار استفاده می‌شوند (Abdolhay و Baradaran Tahori، ۲۰۰۶)، طبق شواهد و اطلاعات موجود در سواحل جنوبی دریای خزر امکان تکثیر طبیعی این ماهی بسیار پایین است و به‌طور عمده تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر ماهیان خاویاری با تعداد کم مولدین و ادغام تخمک‌ها و اسپرم‌ها انجام شده و این امر موجب کاهش اختلاف اللی می‌شود که ناشی از تأثیر جمعیت مؤسس و رانش ژنتیکی است. از طرف دیگر وجود الل‌های زیاد با فراوانی پایین نشان‌دهنده تنگناهای ژنتیکی یا اثرات آمیزش خویشاوندی است (Alarcon و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین احتمال از دست رفتن تعدادی از الل‌ها به‌علت وجود شیوه‌های موجود در هچری‌ها همانند نمونه‌گیری‌های غیرتصادفی و ادغام گامت‌ها برای لقاح و افزایش سطح آمیزش خویشاوندی، موجب از دست دادن مقداری از تنوع ژنتیکی می‌شود. باید توجه داشت کاهش تنوع ژنتیکی، آمادگی برای بیماری و سایر فاکتورهای انتخابی را افزایش می‌دهد (Shen و Gong، ۲۰۰۴).

هترزایگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختارجمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین‌کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به‌عنوان پاسخی به سازش‌پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت‌تأثیر آن است (Beardmore و همکاران، ۱۹۹۷).

در این بررسی پایین بودن میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده نشان‌دهنده کاهش تنوع ژنتیکی است که این امر در تمامی مولدین با گذر از تنگناهای ژنتیکی و جمعیت مؤسس کوچک واقع می‌شود (Xia و همکاران، ۲۰۰۵) و در این گونه تنگناهای ژنتیکی به‌خاطر وجود

افزایش فشار صید، از دست دادن زیستگاه‌های طبیعی و تکثیر مصنوعی با تعداد مولد کم و اندازه کوچک جمعیت است و احتمالاً از افراد خویشاوند در یک محل، نمونه‌برداری شده است. به‌نظر می‌رسد که پایین بودن الل‌های اختصاصی در جنوب دریای خزر به‌علت وجود افراد مهاجر از دیگر جمعیت‌ها می‌باشد.

در منطقه اورال تعداد الل‌های اختصاصی به‌دست آمده بالاتر از سایر مناطق بود که این امر نشان‌دهنده مناسب بودن وضیت تاس‌ماهیان این رودخانه است که جمعیت در حال توسعه بوده و الل‌های جدید در میان جهش‌های جدید برخاسته‌اند. وجود الل‌های اختصاصی به مرور زمان می‌تواند به‌عنوان یک مدل قوی برای شناسایی جمعیت در هر یک از مناطق اکولوژیکی جدید تبدیل شود (Norris و همکاران، ۱۹۹۹؛ Koljonen و همکاران، ۲۰۰۲). اما پایین بودن هتروزایگوسیتی در نمونه‌های اورال را چنین می‌توان تفسیر کرد که از آنجایی‌که الل‌های کمیاب نسبت به الل‌های معمولی در هتروزایگوسیتی کم‌تر شرکت می‌کنند (Norris و همکاران، ۱۹۹۹؛ Koljonen و همکاران، ۲۰۰۲)، بنابراین کاهش هتروزایگوسیتی در نتیجه فشاری است که بر جمعیت این ماهیان بر اثر فشار صید و از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی به‌علت منحرف کردن مسیر این رود برای مصارف کشاورزی، وارد شده است.

کاهش هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار نشان‌دهنده کاهش در تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌ها است. همان‌طورکه گفته شد علت آن می‌تواند به‌خاطر استرس وارده به جمعیت رودخانه ناشی از صید بی‌رویه و زوال تولید مثل در زیستگاه‌های طبیعی و در نتیجه کاهش توان باشد. برای مثال صید ماهی مولد در طول فصل تولید مثل به‌وسیله صیادان محلی و غیرمجاز موجب کاهش تخم‌گشایی در هر سال می‌شود. کاهش باروری و بلوغ جنسی با تاخیر، آسیب‌پذیری این گونه را بیش‌تر کرده و ذخایر آن را در معرض تهدید قرار داده است.

در این بررسی بر روی ماهی اوزون‌برون، بیش‌تر مناطق در بیش‌تر لوکوس‌ها خارج از تعادل هاردی- واینبرگ بودند ($P\leq ۰/۰۰۱$). در لوکوس‌هایی که انحراف از تعادل دیده شد میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده پایین‌تر از هتروزایگوسیتی مورد انتظار بود. چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی وجود الل‌های نول یا خنثی باشد. در واقع وجود الل‌های نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است و بسیاری از محققان وجود الل‌های نول را در توارث میکروستلایت در تاس‌ماهیان مانند تاس‌ماهی سفید و تاس‌ماهی دریاچه تأیید کرده‌اند (Rodzen و May، ۲۰۰۲؛ McQuown و همکاران، ۲۰۰۳؛ Karrigan Börk و همکاران، ۲۰۰۸؛ Welsh و May، ۲۰۰۶). در این بررسی به‌نظر می‌رسد، تکثیر مصنوعی و مهاجرت بین مناطق نمونه‌برداری و اختلاط جمعیت‌ها مهم‌ترین عاملی است که سبب می‌گردد تعادل هاردی- واینبرگ برقرار نباشد.

R_{ST} و F_{ST} به‌طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند (Balloux و Lugan، ۲۰۰۲). در این مطالعه، میزان F_{ST} در تمامی مناطق نمونه‌برداری پایین اما معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$)، از این‌رو به‌نظر می‌رسد که حداقل ۳ جمعیت مختلف از نظر ژنتیکی وجود داشته باشد. پایین بودن مقدار F_{ST} به‌علت اثر پلی‌مورفیسم بالا (ناشی از جهش) در میکروستلایت‌ها و مهاجرت در این ماهی است که به‌طور مؤثری میزان F_{ST} را کاهش می‌دهند (Balloux و Lugan، ۲۰۰۲). به‌طورکلی مهاجرت زیاد از جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها

جلوگیری می‌کند و ماهی اوزون‌برون قادر است نه تنها از مقطع عرضی دریا عبور کند بلکه مسافت‌های طولانی از جنوب به طرف شمال را نیز بپیماید (کیوان، ۱۳۸۲). در ماهیان بین مقدار F_{ST} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (Waples، ۱۹۸۷). طبق این فرضیه و وجود استعداد پراکنش بالا که احتمالاً ناشی از نبود موانع فیزیکی یا اکولوژیکی برای این ماهیان است، ارتباط زیاد در هنگام مهاجرت در زیرجمعیت‌ها ایجاد می‌شود که علت وجود ساختار جمعیتی پایین این گونه است. Shaklee و همکاران (۱۹۸۲)، Thorpe و Sol-Cave (۱۹۹۴) میزان فاصله ژنتیکی (Nei، ۱۹۷۲) برای جدایی جمعیت‌ها را به‌طور میانگین ۰/۳ (دامنه آن از ۰/۶۱-۰/۰۳) ذکر کرده‌اند که با فاصله ژنتیکی مشاهده شده در این بررسی مطابقت دارد (۰/۴۲۱) و نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مشاهده شده است.

این بررسی دلایل و نتایج اولیه برای وجود جمعیت‌های متمایز ماهی ازون‌برون در دریای خزر را نشان می‌دهد. نگرانی اصلی در تکثیر مصنوعی این ماهی در حفاظت از اختلاف ژنتیکی و توجه به بیولوژی خود گونه است. در کارگاه‌های تکثیر از ذخایر موجود بدون هیچ‌گونه راهنمایی ژنتیکی از ماهیان تخم‌کشی می‌کنند. در بیش‌تر موارد تخمک و اسپرم از تعداد کم مولدین صید شده از مناطق مختلف بدون توجه به پیشینه، منشاء، اندازه، ترکیب میزان جنسیت ذخایر با یکدیگر ترکیب می‌شوند بدون این‌که آمیزش‌های خویشاوندی کنترل شود. اضافه شدن چنین افرادی به‌طور مرتب موجب افزایش آسیب‌پذیری جمعیت می‌شود. استفاده از تعداد کم مولدین در تکثیر مصنوعی، جمعیت را به‌سمت آمیزش خویشاوندی هدایت می‌کند. برای ایجاد تنوع بالای ژنتیکی باید از تعداد زیادی مولد استفاده گردد اما هنگامی‌که تعداد مولدین استفاده شده کم باشند اختلاف ژنتیکی به‌دست آمده نیز کم خواهد بود. با وجود فشار وارده به ساختار جمعیت این گونه، ماهی اوزون‌برون در دریای خزر حداقل دارای سه جمعیت در مناطق نمونه‌برداری است. این بررسی، دلایل و نتایج اولیه وجود جمعیت‌های متمایز را نشان می‌دهد که برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن‌ها ضروری است توجه و اقدام جدی صورت پذیرد.

منابع

۱- کیوان، الف.، ۱۳۸۲. ماهیان خاویاری ایران، انتشارات نقش مهر، ۴۰۰ ص.

2.Abdolhay, H.A., and Baradaran Tahori, H., 2006. Fingerling production and Release for stock enhancement of sturgeon in the Southern Caspian Sea: an overview. J. Appl. Ichthyol. 22, 125-131.

3.Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., and Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Aquaculture, 230, 65-80.

4.Balloux, F., and Lugon-Moulin, N., 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers, Mol. Ecol. 11, 155-165.

5.Beardmore, J.A., Mair, G.C., and Lewis, R.I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. Aquaculture. Res. 28, 829-839.

6.Chistiakov, D.A., Hellemans, B., and Volckaert, F.A.M., 2005. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Review. Aquaculture. AQUA-626814; 29p.

7.Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yang, G.P., Gong, Q.L., and Gu, Q.Q., 2005. Characterization of

microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus* . Aquaculture, 250, 129-137.
8. Hillis, D., and Moritz, M.C., 1990. Molcular taxonomi. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
9. Karrigan Börk, A., Drauch, J.A., Israel, J., Pedroia, J., Rodzen, J.A., and May, B., 2008. Development of new microsatellite primers for green and white sturgeon, Conservation Genetics, Technical Note, 9 (4), 973-979.
10. Koljonen, M.L., Tahtinen, J., Saisa, M., and Koskiniemi, J., 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. Aquaculture, 212, 69-92.
11. McQuown, E., Sloor, B.L., Sheehen, R.J., and May, B., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon:new primer sequences for *Scaphyrhinchus* and *Acipenser*, Am. Fish. Society, 129, 1380-1388.
12. McQuown, E., Krueger, C.C., Kincaid, H.L., Gall, A.E., and May, B., 2003. Genetic comparison of Lake Sturgeon population: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci. J. Great Lake Res. 29, 3-13.
13. May, B., Charles, C., Krueger, C., and Kincaid, L., 1997. Genetic variation at Microsatellite loci in sturgeon primer sequence homology in Acipenser and Scaphirhenchus. Can. J. Fish. Aquaculture. Sci. 54, 1542-1547.
14. Nei, M., 1972. Genetic distance between populations, American Naturalist, 106, 283-292.
15. Norris, A.T., Bradley, D.G., and Cunningham, E.P., 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture, 180, 247-264.
16. Peakall, R., and Smouse, P.E., 2005. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. Available at: http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/.
17. Pourkazemi, M., 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries past, present and future. J. Appl. Ichthyol. 22 (1), 1-4.
18. Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F., and Beardmore, J.A., 1999. Application of mtDNAd-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian sea. J. Appl. Ichthyol. 15, 23-28.
19. Rodzen, J.A., and May, B., 2002. Inheritance of microsatellite loci in the polyploidy white sturgeon (Acipenser transmontanus). Genome. 54, 1064-1076.
20. Sekar, M., Suresh, E., Kumar, N.S., Nayak, S.K., and Balakrishna, C., 2009. Microsatellite DNA markers a fisheries perspective Part 1: The nature of microsatellites. Genetics and Biodiversity, pp. 27-29.
21. Shabani, A., Pourkazemi, M., and Rezvani, S., 2006. Study of mtDNA variation of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) population from the north (Volga River) and South (Sefidrud River) Caspian Sea using RFLP analysis of PCR Amplified ND 5/6 gene regions. J. Agric. Scl. Natur. Resour. (English Abstract), 12 (6), 195-204.
22. Shaklee, J.B., Tamaru, C.S., and Waples, R.S., 1982. Speciationand evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science, 36, 141-157.
23. Shen, X.Y., and Gong, Q.L., 2004. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus*. Using RAPD and microsatellite technique. Oceanol. Limnol. Sin. 35, 332-341.
24. Thorpe, J.P., and Sole-Cava, A.M., 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics . Zoologica Scripta, 23, 3-18.
25. Waples, R.S., 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes, Evol. 41, 385-400.
26. Welsh, A., and May, B., 2006. Development and standardization of disomic microsatellite

markers for lake sturgeon genetic studies. J. Appl. Ichthyol. 22, 337-344.
27. Xia, J., Zheng, J., and Wang, D., 2005. Ex situ conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) as measured from microsatellites and mtDNA diversity. ICES J. Marine Sci. 62, 1711-1716.
28. Zhao, N., Ai, W., Shao, Z.L., Zhu, B., Brosse, S., and Chang, J., 2005. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis gray*) genetic variability. J. Appl. Ichthyol. 21, 7-13.

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 6, No. 2, July 2012

Population genetic structure of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in Ural, Sefidrud and Gorganrud Rivers using microsatellite markers

***M. Norouzi[1], M. Pourkazemi[2] and A. Ghasemi[3]**
[1]Faculty of Member, Dept. of Marine Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran,
[2]International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran, [3]Persian Gulf Research and Studies Center, Persian Gulf University, Boushehr, Iran

Abstract

This study represents a larg-scale population genetic analysis of the stellate sturgeon in the Northern (Ural River) and Southern Caspian Sea (estuary of Sefidrud and Gorganrod Rivers-Iran). Totally, 138 individuals of adult stellate sturgeon from three regions were sampled. Fifteen sets of microsatellite primers were developed from lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*) tested on genomic DNA of stellate sturgeon. Allele frequencies, private alleles, observed and expected heterozygosity, Hardy-Wienberg Equilibrium, genetic similarity and distance, F_{ST} and R_{ST} based on AMOVA were calculated using the Gene Alex software. At this point, the ten successfully used primer sets should be mentioned and polymorphism was observed, while one locus was monomorph and four sets didnt. Analyses revealed that average of alleles per locus was 12.7 (range 8 to 18 alleles per locus in regions). All sampled regions contained private alleles. Average observed and expected heterozygosity were 0.651 and 0.85 respectively. Basis on AMOVA for all F_{ST} values among pairs of collections ranged between 0.047 to 0.058 and indicated a significant difference between the three geogeraphic regions ($P<0.01$). The genetic distance between populations based on Nei (1972) index, was 0.421 (±0.08), which indicates that the genetic difference among populations is pronounced. These results together with highly significant R_{ST} of genotypic differences between these pairs of collections support the existence of different genetic populations along the Caspian Sea coast.

Keywords: *Acipenser stellatus*; Genetic population; Caspian Sea; Microsatellite marker

*- Corresponding authors; mnoroozi@tonekaboniau.ac.ir