

## بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris* Lovetzky) در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از میکروستلایت‌ها<sup>۱</sup>

\* رقیه صفری<sup>۱</sup>، محمد پورکاظمی<sup>۲</sup>، سهراب رضوانی<sup>۳</sup> و علی شعبانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۲</sup>دانشیار انیستیتو تحقیقات ماهیلن خاویاری دکتر دادمان رشت، <sup>۳</sup>دانشیار مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، <sup>۴</sup>استادیار گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان  
تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۳۰

### چکیده

ماهی شیپ یکی از گونه‌های مهم اقتصادی و در معرض خطر انقراض دریای خزر می‌باشد که کمترین فراوانی را در بین ماهیان خاویاری مهاجر دارد. تنوع ژنتیکی ماهی شیپ در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از روش میکروستلایت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۹۵ نمونه ماهی از ۶ منطقه از ۳ ناحیه نمونه‌برداری (ناحیه اول مناطق کیشهر، انزلی و سفیدرود؛ ناحیه دوم مناطق بابلسر و نوشهر؛ ناحیه سوم منطقه گرگان) جمع‌آوری و با استفاده از ۴ جفت پرایمر میکروستلایتی مورد بررسی قرار گرفتند. ۴ جفت پرایمر مورد استفاده در ۵ جایگاه ژنی تولید باند دی ان آ نمودند که از بین آنها ۳ جایگاه پلی مورف بود. رنج هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب (۱-۰/۵) با میانگین ۰/۷۵ و (۱-۰/۴۷) با میانگین ۰/۷۳ به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی بیشترین اختلاف را بین نمونه‌های هر منطقه ۹۲ درصد ( $p \leq 0/02$ ) و اختلاف بین مناطق را ۸ درصد ( $p \leq 0/02$ ) نشان داد ولی اختلافی بین نواحی نمونه‌برداری نشان نداد ( $p \leq 0/93$ ). بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، علیرغم فشار صید و کاهش شدید ذخایر این گونه هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی در حد بالایی وجود دارد و برای حفظ این تنوع باید اقدامات لازم انجام گیرد و به نظر می‌رسد بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که باید در بازسازی ذخایر مد نظر قرار گیرد. همچنین نتایج نشان داد که روش مایکروستلایت از توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در ماهی شیپ برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: میکروستلایت، ماهی شیپ، تنوع ژنتیکی

## مقدمه

تاسماهیان از قدیمی‌ترین ماهیان غضروفی استخوانی می‌باشند که حدود ۲۵۰ میلیون سال پیش تکوین یافته‌اند (لودویگ، ۲۰۰۱). از بین ۲۷ گونه تاسماهیان و پاروپوزه ماهیان ۶ گونه در دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن زندگی می‌کنند که حدود ۹۰ درصد کل ذخایر ماهیان خاویاری جهان را تشکیل می‌دهند (پورکاظمی، ۱۹۹۶). امروزه ذخایر ماهیان خاویاری دریای خزر به واسطه پاره‌ای از عوامل بیولوژیکی (سن بلوغ بالا و زمان طولانی بین دو دوره تخم‌ریزی) و عوامل انسانی (بهره‌برداری و صید بی‌رویه مختل کردن مهاجرت ماهیان، تخریب زیستگاه‌های آنها و افزایش آلودگی‌های مختلف در آب‌ها) در معرض خطر نابودی می‌باشند (ماکوان، ۲۰۰۰). لذا نام کلیه ماهیان خاویاری دریای خزر از جمله ماهی شیپ در لیست ماهیان در معرض خطر اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت<sup>۱</sup> و کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های در جریان انقراض<sup>۲</sup> قرار گرفته است. در سواحل ایران صید شیپ کمتر از ۳ درصد کل صید را تشکیل می‌دهد (مقیم، ۲۰۰۲). بررسی و ساختار جمعیت‌های مختلف با کمک صفات مورفولوژیک از دیرباز معمول بوده است. با پیشرفت علم روش‌های جدیدی چون نشانگرهای پروتئینی (ایزوزایم و...) و مولکولی دی ان ا<sup>۳</sup> (آر اف ال پی<sup>۴</sup>، ریپید<sup>۵</sup>، میکروستلایت و...) که نسبت به روش‌های قدیم از قابلیت بالاتری برخوردار بوده و تحت تأثیر محیط و اثراتی همچون پلیوتروپی<sup>۶</sup> و اپیستازی<sup>۷</sup> و دوره رشد موجود نبوده روی کار آمدند. اگر چه همه نشانگرهای مولکولی در جای خود سودمند می‌باشند. ما خصوصیات همچون تنوع زیاد قابلیت رتبه دهی آسان همباز بودن و پراکنندگی در سراسر ژنوم از دلایل عمده گسترش نشانگرهای میکروستلایتی در حل مشکلات بیولوژیکی

تجزیه و تحلیل‌های جمعیتی، مطالعات اکولوژیکی، بررسی رفتارهای تولیدمثلی، تشخیص نژادهای پرورشی از طبیعی، تشخیص پلی پلوئیدی‌ها و... محسوب می‌شود. قاسمی (۲۰۰۳) به مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش ارف ال پی پرداخت و توانست جمعیت رودخانه اورال را از جمعیت سواحل جنوبی دریای خزر جدا کند ولی نتوانست جمعیت‌های احتمالی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris Lovetzky*) در سواحل جنوبی دریای خزر را تشخیص دهد. زو و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis Gray*) از ۲۵ جفت پرایمر میکروستلایتی تاسماهی دریاچه‌ای استفاده کردند که ده جفت از آنها تنوع را به خوبی نشان دادند و روش میکروستلایت را نسبت به آلوزایم‌ها ورپید به‌عنوان روش مناسب‌تری در مطالعه تنوع تاس ماهی چینی در جمعیت رودخانه یانگ تسه دانستند. ویندهیا و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ساختار جمعیتی کپور ماهی هندی (*Labeo doro Hamilton Buchanan*) ضمن مشاهده تنوع ژنتیکی، اختلاف معنی‌داری در کپور ماهیان هندی رودخانه‌های سانلوج، یامونا و گانگا مشاهده کردند. یون و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه آنالیز میتوکندریایی و میکروستلایتی جمعیت‌های (*Oncorhynchus keta* Walbaum) تنوع ژنتیکی بالاتری را در روش میکروستلایت نسبت به روش دی ان ا میتوکندریایی مشاهده و اعلام نمودند بهتر است در مطالعه ساختار جمعیتی از هر دو مارکر استفاده گردد. در این مطالعه با هدف مشخص نمودن تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای شیپ در سواحل جنوبی دریای خزر برای اولین بار در ایران از روش میکروستلایت استفاده گردید.

- 1- IUCN
- 2- CITES
- 3- DNA
- 4- RFLP
- 5- RAPD
- 6- Poliotropy
- 7-Epistazi

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری به میزان ۲ گرم از بافت باله دمی ۹۵ ماهی شپ صید شده از صیدگاه‌های جنوبی دریای خزر، انزلی (۱۰ عدد)، کیشهر (۱۰ عدد)، سفیدرود (۱۱ عدد)، نوشهر (۱۱ عدد)، بابلسر (۲۱ عدد) و گرگان (۳۳ عدد) طی پاییز ۸۲ تا بهار ۸۴ انجام و تا زمان مطالعه بر روی آنها در الکل ۹۵ درصد قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در بافر استاندارد تی ای اس<sup>۱</sup> به همراه پروتیناز کا<sup>۲</sup> به مدت ۲۴ ساعت هضم و سپس دی آن ژنومی آنها با استفاده از روش فنل-کلروفورم (پورکاظمی، ۱۹۹۶) استخراج گردید و با استفاده از الکل اتانول رسوب داده شد. پس از خشک شدن دی آن آ، حدود ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به دی آن آ، اضافه گردید و جهت حل شدن کامل دی آن آ یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. جهت سنجش کمیت و کیفیت دی آن آ از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. تکثیر جایگاه‌ها توسط واکنش پی سی آر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، ۰/۲ میکرومولار از هر پرایمر میکروستلایتی (۴ جفت پرایمر میکروستلایتی ال اس ۱۹، ال اس ۵۷، ال اس ۶۲ و ال اس ۶۸<sup>۳</sup> ساخت شرکت امرشام که می و همکاران (۱۹۹۷) آنها را جهت بررسی تاسماهی دریاچه‌ای اسم علمی بکار بردند)، ۰/۲ میلی مولار نوکلئوتیدها، یک واحد بین‌المللی تک دی آن آ پلیمراز، ۵۰ نانوگرم دی آن آ، ۲/۵ میلی مولار بافر پی سی آر (۱۰X) و آب مقطر تا رسیدن به حجم در دستگاه ترمو سایکلر (گرادیانت اپندورف) با برنامه دمایی ۶۴ درجه به مدت ۴ دقیقه (مرحله واسرشته شدن اولیه)، ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته شدن)، ۶۴-۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه به مدت ۳۰

ثانیه (بسط) و یک بسط نهائی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول پی سی آر بر روی ژل اکریل آمید ۶ درصد (غیر دناتوره) جداسازی و پس از تهیه تصویر با استفاده از دستگاه مستند سازی ژل، طول قطعات توسط نرم افزار بیوکپت (ویلبرت و مارنی، ۱۹۹۹) محاسبه گردید. تعداد ال‌ها، تعداد ال‌های مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، مشاهده شده، شاخص شانون و تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون کای اسکوآر شباهت و فاصله ژنتیکی (نی، ۱۹۷۸) و تست آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از نرم افزار ژن الکس (پیکال و اسموس، ۲۰۰۵) مورد آنالیز قرار گرفت.

## نتایج

در مجموع ۴ پرایمر میکروستلایتی بررسی شده ۵ جایگاه ژنی تولید نمودند. که از بین آنها ۳ جایگاه پلی‌مورف و ۲ جایگاه مونومورف بود. بدین ترتیب با در نظر گرفتن ۶ منطقه نمونه‌برداری در ۳ جایگاه پلی‌مورف فوق‌الذکر نتایج براساس ۱۸ ترکیب جایگاه-منطقه به شرح زیر بدست آمد. بیشترین و کمترین تعداد ال مشاهده شده به ترتیب در جایگاه‌های U72736 و U72739 مربوط به مناطق گرگان (۱۵ ال) و کیشهر (۷ ال) بدست آمد. بیشترین و کمترین تعداد ال مؤثر نیز در جایگاه U72739 به ترتیب در مناطق بابلسر (۱۱/۰۲) و سفید رود (۴/۷۴) تعیین گردید. دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار در بین ترکیبات جایگاه-منطقه ۱-۰/۴۷ با میانگین (۰/۷۳) می‌باشد که بیشترین و کمترین مقدار آن به ترتیب در مناطق نوشهر (۱) و سفیدرود (۰/۴۷) و در جایگاه U72736 مشاهده گردید. دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز ۱-۰/۵ با میانگین (۰/۷۵) محاسبه گردید که بیشترین مقدار آن (۱) در مناطق کیشهر و انزلی در جایگاه U72730 و نوشهر در جایگاه U72736 و کمترین مقدار آن (۰/۵) در جایگاه U72739 در منطقه کیشهر به دست آمد (جدول ۲).

1- TES  
2- Proteinaz K  
3- LS 19, LS 57, LS 62, LS 68

جدول ۱- جایگاهها و توالی پرایمرهای میکروستلایت مورد استفاده در بررسی ماهی شیب (حرف P معرف پلی مورفی و حرف M معرف مونومورفی).

نتیجه	توالی پرایمر 3' → 5'	دمای اتصال درجه سانتی گراد	توالی تکراری	Locus
P*	TTATTGGATGGTGTAGCTAAAC AGCCCAACACACGAATATC	61/5 <sup>oC</sup>	(GATA)13	LS-68
P	GATCAGGAGCGACVAAC CCCTGGATTTGAATTAACAG	62 <sup>oC</sup>	(GAA)29	LS-57
M*	GATCAGGAGGGGCAGAGNAAC CCCTGGATTTGAATTAACAG	57 <sup>oC</sup>	(GACA) <sub>7</sub>	LS-62
M, P	GCTTGGTTGCTAGTTTGC GTACAGATGACCAGAGGA	61/5 <sup>oC</sup>	(TTG) <sub>9</sub>	LS-19

× مصرف پلی مورفی × مصرف مونومورفی

جدول ۲- خصوصیات و نتایج به دست آمده از جایگاههای پلی مورف.

locus	سواحل گیلان			سواحل مازندران		سواحل گلستان
	انزلی	کیاشهر	رودخانه سفید رود	نوشهر	بابلسر	گرگان
<b>U72739</b>						
N	۱۰	۱۰	۱۱	۱۱	۲۱	۳۳
Na	۱۰	۷	۹	۱۳	۱۴	۱۴
Ne	۶/۲۵	۵/۵	۴/۷۴	۸/۰۶	۱۱/۰۲	۹/۸
I	۲/۰۵۹	۱/۸۱	۱/۸۴	۲/۳۵	۲/۴۹	۲/۴۳
Ho	۰/۷	۰/۵	۰/۶۳۶	۰/۸۱۸	۰/۶۱۹	۰/۷۸
He	۰/۸۴	۰/۸۲	۰/۷۸۹	۰/۸۷۶	۰/۹	۰/۸۹
Fis	۰/۱۶۷	۰/۳۹	۰/۱۹۴	۰/۰۶۶	۰/۳۱۹	۰/۱۲۳
pHw	۰/۴۲۶	۰/۰۸۸	۰/۲۷۷	۰/۷۵۵	۰/۰۰***	۰/۰۱۴*
<b>U72730</b>						
N	۱۰	۱۰	۱۱	۱۱	۲۱	۳۳
Na	۸	۱۰	۸	۱۲	۱۳	۱۲
Ne	۵/۵۵	۷/۴	۵,۹	۹/۶۸	۸/۳۲	۸/۹۶
I	۱/۸۷	۲/۱۳	۱/۸۹	۲/۳۷	۲/۳۱	۲/۳
Ho	۱	۱	۰/۶۳۶	۰/۸۱۸	۰/۹۵	۰/۸۷۹
He	۰/۸	۰/۸۶	۰/۸۳۱	۰/۸۹۷	۰/۸۸	۰/۸۸۸
Fis	-۰/۲۲	-۰/۱۵۶	۰/۲۳۴	۰/۰۸۸	-۰/۰۸۲	۰/۰۱۱
pHw	۰/۲۲۴	۰/۱۹۵	۰/۲۵۴	۰/۳۵۵	۰/۰۴*	۰/۰۳۶*
<b>U72736</b>						
N	۱۰	۱۰	۱۱	۱۱	۲۱	۳۳
Na	۱۰	۱۲	۹	۸	۱۱	۱۵
Ne	۸/۳۳	۹/۵۲	۶/۵	۶/۲	۷/۷۳	۹/۰۷
I	۲/۲	۲/۳۷	۲/۰۲	۱/۹۳	۲/۱۷	۲/۴۳
Ho	۰/۶	۰/۶	۰/۹۰۹	۱	۰/۹	۰/۶
He	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۴۷	۱	۰/۸۷	۰/۸۹
Fis	۰/۳۱۸	۰/۳۳	-۰/۰۷	-۰/۱۹۲	-۰/۰۳۹	۰/۳۱۹
pHw	۰/۱۲۴	۰/۰۱۷۷*	۰/۲۸۵	۰/۲۹	۰/۸۴	۰/۰۰***

مقادیر N: تعداد نمونه، Na: تعداد الل، Ne: تعداد الل مؤثر، I: شاخص شانون

He: هتروزیگوسیتی، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، Fis: (Fixation index)

pHw: احتمال در در تعادل هاردی واینبرگ ترکیبات مختلف جایگاه-منطقه (P<۰/۰۵)\*; P<۰/۰۰۱ (\*\*\*)

محاسبه مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در سطح جایگاه‌ها در کل مناطق بیشترین (۰/۸۷) و کمترین (۰/۸۵۵) هتروزیگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب در جایگاه‌های U72736 و U72739 و بیشترین (۰/۸۸۱) و کمترین (۰/۶۷۷) هتروزیگوسیتی مشاهده شده را به ترتیب در جایگاه‌های U72730 و U72739 نشان داد (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون در جایگاه U72739 به ترتیب در مناطق بابلسر (۲/۴۹) و کیشهر ۱/۸۱ محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۳- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) در سطح جایگاه‌ها برای کل مناطق.

	U72739	U72730	U72736
He	۰/۸۵۵	۰/۸۶۳	۰/۸۷
Ho	۰/۶۷۷	۰/۸۸۱	۰/۷۷

در بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی ترکیبات مختلف جایگاه- منطقه با کمک آزمون کای اسکوار نمونه‌های منطقه گرگان در تمامی جایگاه‌ها در سطح ۹۹ و ۹۵ درصد نمونه‌های منطقه بابلسر در جایگاه U72739 در سطح ۹۹ درصد و در جایگاه U72730 در سطح ۹۵ درصد انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را نشان دادند. در نمونه‌های سایر مناطق انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ مشاهده نگردید (جدول ۲). ماتریس فواصل شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (نی،

۱۹۷۸). بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی را به ترتیب بین نمونه‌های مناطق گرگان و نوشهر (۰/۷۷۱) و نمونه‌های مناطق انزلی و نوشهر (۰/۳۰۱) و در تأیید آن بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی را بین نمونه‌های مناطق انزلی و نوشهر (۱/۲) و بین نمونه‌های مناطق گرگان و نوشهر (۰/۲۶) نشان داد (جدول ۴). نتایج به دست آمده از تست آر اس تی برای تعیین اختلاف بین مناطق نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار نمونه‌های منطقه گرگان در سطح ۹۹ و ۹۵ درصد با سایر مناطق و اختلاف نمونه‌های منطقه سفید رود نیز در سطح ۹۹ و ۹۵ درصد با سایر مناطق به جز با نمونه‌های منطقه نوشهر را نشان داد. نمونه‌های منطقه کیشهر به استثنای مناطق انزلی و بابلسر و نمونه‌های منطقه انزلی به استثنای نمونه‌های مناطق بابلسر و کیشهر با سایر مناطق و نمونه‌های منطقه نوشهر به جز با نمونه‌های منطقه سفیدرود اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۶). در مطالعه حاضر با در نظر گرفتن ۳ ناحیه نمونه‌برداری ناحیه اول مناطق کیشهر، انزلی و سفیدرود، ناحیه دوم مناطق بابلسر و نوشهر، ناحیه سوم منطقه گرگان اختلافی بین نواحی نمونه‌برداری مشاهده نگردید (۰/۹۳ <math>p</math>) ولی اختلاف بین مناطق ۸ درصد (۰/۰۲ <math>p</math>) و بین نمونه‌های هر منطقه ۹۲ درصد (۰/۰۱ <math>p</math>) تخمین زده شد (جدول ۷).

جدول ۴- ماتریس فواصل (زیر قطر) و شباهت (بالای قطر) ژنتیکی (نی، ۱۹۷۸).

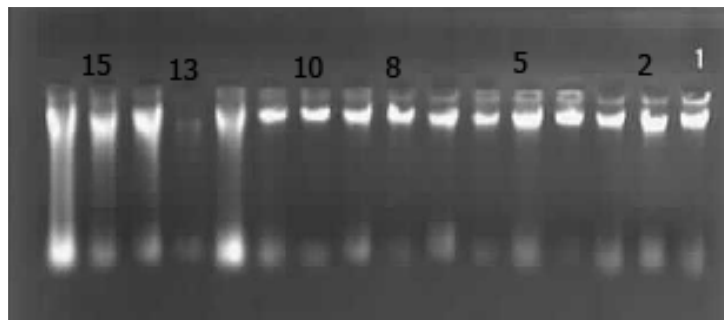
مناطق نمونه‌برداری	گرگان	بابلسر	نوشهر	رودخانه سفیدرود	کیشهر	انزلی
انزلی	۰/۶۰۹	۰/۵۴۲	۰/۳۰۱	۰/۴۷۳	۰/۷	
کیشهر	۰/۶۴۵	۰/۵۲۶	۰/۴۶۷	۰/۴۸		۰/۳۵۷
رودخانه سفید رود	۰/۶۸۳	۰/۷۱۴	۰/۵۹۵		۰/۷۳۳	۰/۷۴۹
نوشهر	۰/۷۷۱	۰/۶۲۲		۰/۵۲	۰/۷۶۱	۱/۲
بابلسر	۰/۷۶۱		۰/۴۷۴	۰/۳۳۷	۰/۶۴۲	۰/۶۱۳
گرگان		۰/۲۷۳	۰/۲۶	۰/۳۸۱	۰/۴۳۸	۰/۴۹۷

جدول ۵- میزان آر. اس. تی محاسبه شده برای مناطق نمونه برداری (اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان می دهند).

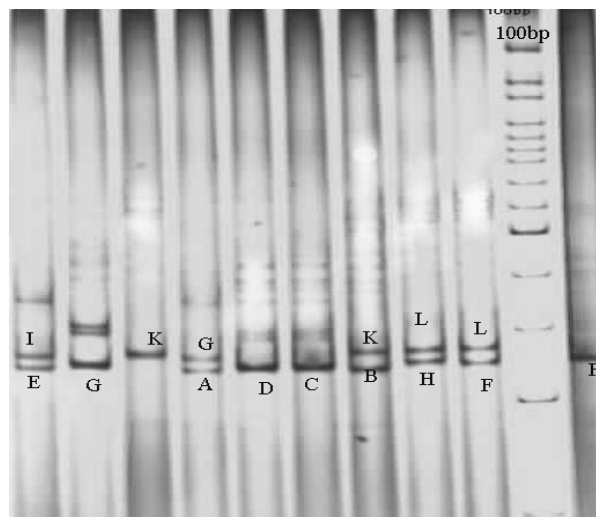
مناطق نمونه برداری	گرگان	بابلسر	نوشهر	رودخانه سفید رود	کیاشهر	انزلی
انزلی	۰/۰۴۵	۰/۴۲۶	۰/۰۶۷	۰/۰۰۶	۰/۳۹	
کیاشهر	۰/۰۴۱	۰/۱۵۳	۰/۰۷۷	۰/۰۰۹		۰/۰۰۱
رودخانه سفید رود	۰/۰۰۶	۰/۰۱۷	۰/۴۰۷		۰/۱۴۴	۰/۱۴۴
نوشهر	۰/۰۱۱	۰/۰۴		۰/۰۰	۰/۰۵۶	۰/۰۷
بابلسر	۰/۰۱۷		۰/۰۶۴	۰/۰۷۸	۰/۰۳۱	۰/۰
گرگان		۰/۰۴۷	۰/۰۸۳	۰/۱۰۸	۰/۰۶	۰/۰۵۶

جدول ۶- آنالیز واریانس مولکولی اختلاف میان نواحی نمونه برداری و مناطق نمونه برداری و داخل مناطق.

تنوع ژنتیکی	درصد	احتمال
بین نواحی نمونه برداری	۰	۰/۹۳
بین مناطق هر ناحیه	۸	۰/۰۲
داخل منطقه	۹۲	۰/۰۱

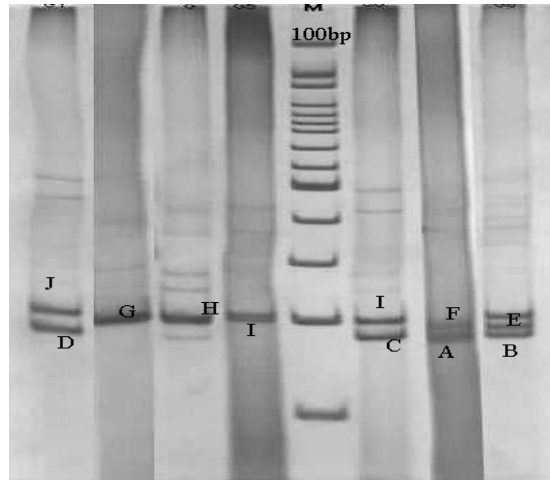


شکل ۱- نمونه‌ای از DNA استخراج شده به روش فنل - کلروفورم بر روی ژل آگاروز ۱ درصد.

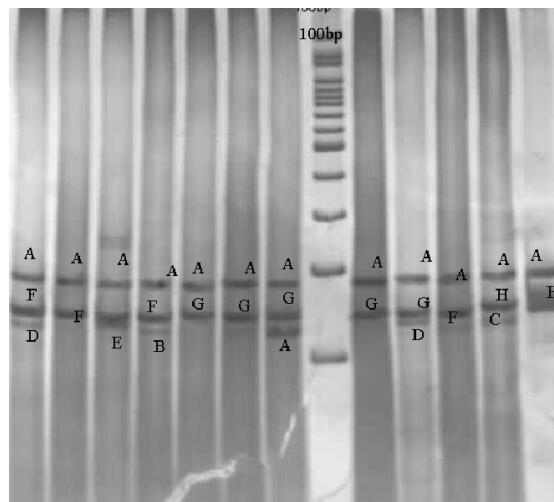


شکل ۲- محصول PCR و آرایش باند DNA ماهی شیپ دریای خزر با استفاده از پرایمر LS-68(U72739)

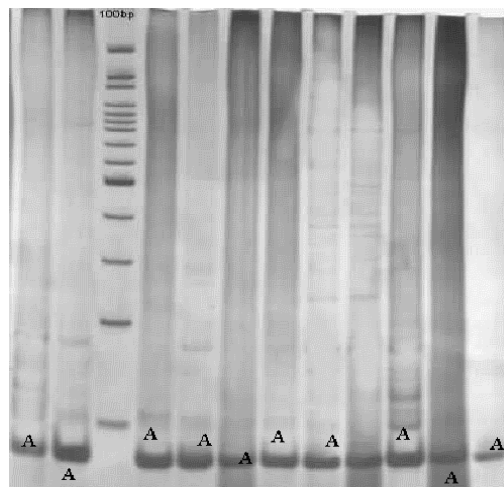
روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (حروف معرف ال‌ها).



شکل ۳- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی شیپ دریای خزر با استفاده از پرایمر LS-67(U72736) روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (حروف معرف الیها).



شکل ۴- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی شیپ دریای خزر با استفاده از پرایمر LS-57(U72730) روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره.



شکل ۵- محصول PCR و آرایش باندهای DNA ماهی شیپ دریای خزر با استفاده از پرایمر LS-62(U72738) روی ژل اکریل آمید ۶ درصد پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره (حروف معرف الیها).

## بحث

سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف و در جمعیت‌های مختلف یک گونه که در مناطق مختلف ساکن می‌باشند متفاوت است. ریلی و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعه ساختار جمعیتی ماهی دندان‌دار (*Dissostichus eleginoides* Smith) سطح هتروزیگوسیتی را ۰/۵۸-۱/۰۵۸ شاو و همکاران (۱۹۹۹) تعداد ال در لوکوس‌های مورد مطالعه در شک ماهی اطلس (*Clupea harengus* Linnaeus) را ۱۸-۴۱ عدد و سطح هتروزیگوسیتی را حدود ۰/۹۳-۰/۹، گزارش کردند. دوودی و آدویز (۲۰۰۰) میانگین هتروزیگوسیتی در ماهیان آب شیرین، شور و آنادراموس را به ترتیب ۰/۴۶، ۰/۷۹ و ۰/۶۸ اعلام نمودند. اپلپارد و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تن ماهی چشم درشت (*Thunnus obesus* Lowe) سواحل اقیانوس هند میزان هتروزیگوسیتی را ۰/۹۲-۰/۵۲ گزارش نمودند، هکل و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ماهی سه خار (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus) آب شور و شیرین رنج هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۰/۹۲-۰/۴۶ و ۰/۷۶-۰/۵۲ برآورد نمودند. ویرجین و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی آتلانتیک (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill) تعداد ال در لوکوس‌های مورد مطالعه را ۷-۴ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۶۴-۰/۴۴ گزارش کردند. بیرجتی و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهیان عنوان کردند که در ماهیان، گونه‌های دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین‌تری را نسبت به گونه‌های آب شیرین نشان می‌دهند و این تمایز بالا را به اندازه بزرگ جمعیت مؤثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیط‌های دریایی و اندازه کوچک جمعیت مؤثر و جریان ژنی محدود در جمعیت‌های آب شیرین نسبت دادند. زا و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی تاسماهی چینی هتروزیگوسیتی را ۰/۵۴ و متوسط تعداد ال در هر لوکوس را ۷ اعلام نمودند و علت هموزایگوسیتی بالا را به وجود ال‌های نول و تلاقی خویشاوندی نسبت دادند. ویندهیا و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ساختار جمعیتی کپور ماهی

هندی (*L. doro*) تنوع ژنتیکی را ۰/۵ گزارش کردند. در مطالعه حاضر، استفاده از روش میکروستلایت با استفاده از پرایمرهای به کار برده شده برای تعیین تنوع ژنتیکی، سطح بالایی از تنوع (۰/۷۵) با متوسط تعداد ال‌های مشاهده شده و مؤثر به ترتیب ۱۰/۸ و ۷/۶ را در ماهی شیپ در مناطق مختلف نشان داد که در مقایسه با مطالعه قاسمی (۲۰۰۳) در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی شیپ دریای خزر را با استفاده از ژن دهیدروژناز ۵ و ۱۶ در روش آر اف ال پی (میزان تنوع هاپلوپیتی و نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۸۱۶ و ۰/۰۰۷) مبین برتری میکروستلایت‌ها در تعیین تنوع ژنتیکی می‌باشد. یون و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه آنالیز میتوکندریایی و میکروستلایتی جمعیت‌های (*O. keta*) تنوع ژنتیکی بالایی (۰/۷-۰/۴۴) را در روش میکروستلایت مشاهده نمودند. تعادل هاردی-واینبرگ تنها در جوامعی صادق است که شرایطی چون تعداد افراد جمعیت بالا، جمعیت بسته، جفت‌گیری تصادفی و احتمال جهش بسیار کم در آنها حکم‌فرما باشند. اپلپارد و همکاران (۲۰۰۲) انحراف از تعادل مشاهده شده در برخی جایگاه‌ها در مطالعه ساختار ژنتیکی تن ماهی چشم درشت به خطای نمونه‌برداری و بریجتی و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی جمعیت اردک ماهی (*Esox luscious* Linnaeus) به اندازه کوچک جمعیت ناشی از حوادث بعد از عصر یخبندان نسبت دادند. ویندهیا و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ساختار جمعیتی کپور ماهی هندی (*L. doro*) انحراف از تعادل را در هیچ یک از جایگاه‌ها مشاهده نکردند. زا و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تاسماهی چینی مشاهده انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به تلاقی خویشاوندی نسبت دادند. در این مطالعه علت مشاهده انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در ۶ ترکیب از ۱۸ ترکیبات مختلف جایگاه - منطقه را می‌توان به تکامل غیر هم‌جهتی که در جمعیت‌های مختلف برای یک جایگاه خاص در طول زمان در اثر تفاوت‌های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است یا عدم تصادفی بودن



نمونه‌گیری به جهت کوچک بودن اندازه جمعیت نسبت داد. شاو و همکاران (۱۹۹۹) عدم جدایی جمعیت‌های شک ماهیان بهار تخم‌ریز نروژ و شک ماهیان بالسفجورد را ناشی از مهاجرت برای تغذیه این ماهیان دانستند. آدامز و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی ساختار قزل‌آلای جویباری تی<sup>۱</sup> را ۰/۵۲ (p≤۰/۰۰۱) تعیین و جدا بودن جمعیت‌های تولید مثلی قزل‌آلای جویباری دریاچه‌های حوزه آبریز خلیج هند، علی‌رغم وجود سد فیزیکی برای مهاجرت بین آنها را، به شرایط هیدرو جغرافیایی نسبت دادند. هروردن و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی تنوع میکروستلایتی ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus* Fraser) در مناطق صخره‌ای گریت بریر در ۶ منطقه نمونه‌برداری از سه ناحیه جغرافیایی تنوع ژنتیکی داخل مناطق ۹۹/۷۴ درصد (p≤۰/۰۲۳)، بین مناطق ۱۵ درصد (p≤۰/۱۷۶) و بین نواحی ۰/۱ درصد (p≤۰/۲۲۴) برآورد نمودند که بین نمونه‌های هر منطقه اختلاف معنی‌دار، بین مناطق و میان نواحی اختلاف معنی‌دار نبود. اسمیت و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه آنالیز ژنتیکی جمعیت تاسماهی سفید رودخانه فراسر، تفاوت میان گروه‌های نمونه‌برداری را رژیم هیدرو جغرافیایی و تغذیه‌ای به‌عنوان سد مهاجرتی تاسماهی سفید دانستند. قاسمی (۲۰۰۳) با استفاده از روش آر اف ال پی نشان داد بین جمعیت شیب رودخانه اورال و حوضه جنوب دریای خزر اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P≤۰/۰۰۰) ( $X^2=137/35$ ) و آنزیم سی اف آر ال تری وان<sup>۲</sup> را به‌عنوان یک مارکر مولکولی هت

تمایز این دو جمعیت معرفی کرد. یون و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی میکروستلایتی جمعیت‌های (*O.keta*) در نواحی ژاپن، روسیه و آمریکای شمالی اختلاف بین نواحی نمونه‌برداری را ۰/۰۵ (p≤۰/۰۱)، بین مناطق را در ناحیه زاپین ۰/۰۱ (p≤۰/۰۱)، روسیه ۰/۰۴ (p≤۰/۰۱)، آمریکای شمالی ۰/۰۵ (p≤۰/۰۱) محاسبه نمودند.

در مطالعه حاضر اختلاف بین مناطق ۸ درصد (p≤۰/۰۲) و داخل مناطق ۹۲ درصد (p≤۰/۰۲) تخمین زده شد که نشان می‌دهد احتمالاً بیش از یک جمعیت ماهی شیب در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که این خود تأیید کننده مطالعه صفری و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی رابطه ژنتیکی ماهیان شیب صید شده در مناطق مختلف سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، علی‌رغم فشار صید و کاهش شدید ذخایر این گونه هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی در حد بالایی وجود دارد و برای حفظ این تنوع باید اقدامات لازم انجام گیرد و به نظر می‌رسد بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که باید در بازسازی ذخایر مد نظر قرار گیرد. همچنین نتایج نشان داد که روش مایکروساتلایت از توانایی بالایی برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در ماهی شیب برخوردار است.

### منابع

1. Adams, B.K., and Hutchings, J.K., 2002. Microgeographic population structure of brook charr: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of fish biology*. 62: 4. 517-533.
2. Appleyard, S.A., Ward, R.D., Grewe, P.M., 2002. Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of fish biology*. 60: 4. 767-770.
3. Birgitte, J., Hansen, M., and Loeschcke, V., 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox luciosus* L.) population: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84: 1-11.

4. Dewoody, J.A., and Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 56: 461-473.
5. Heckel, G., Zbinden, M., Mazzi, D., Kohler, A., Reckeweg, G., Bakker, T.C.M., and Largiadere, C., 2002. Microsatellite markers for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) and their applicability in a freshwater and anadromous population. *Conservation Genetics*. 3: 79-81.
6. Herweden, L., Beniz, J., and Davis, C., 2003. Microsatellite Variation and population genetic structure of the red trout emperor on the Great Barrier Reef. *Journal of fish biology*. 62: 3. 987-999.
7. Ludwig, A., Belfiore, N., Pitra, C., Svirsky, V., and Jenneckens, I., 2001. Genome Duplication Events and Functional Reproduction of Ploidy levels in Sturgeon (*Acipenser, Huso and Scaphirhynchus*). *Genetics Society of America*. 158: 2. 1203-1215.
8. Maquan, E.C., Sloor, B.L., Sheehy, R.J., and May, B., 2000. Microsatellite Analysis of Genetic Variation in Sturgeon: new primer sequences for *Scaphyrhynchus* and *Acipenser*. *American fisheries society*. 129: 1380-1388.
9. May, B., Charles, C., Krueger, C., and Kincaid, L., 1997. Genetic Variation at Microsatellite Loci in Sturgeon Primer Sequence Homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 54: 1542-1547.
10. Moghim, M., 2002. Stocks and populations of ship sturgeon in southern Caspian sea. *Iranian Journal of Fisheries Science*. 13: 1. 171-190.
11. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
12. Peakall, M., and Smouse, A., 2005. GeneAlex Analysis In Excel software.
13. Pourkazemi, M., Skibinski, D.O., and Beardmore, J.O., 1996. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian Sturgeon population structure from Iranian Coastline of the Caspian Sea. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 3-28.
14. Qasemi, A., 2003. Study of Genetic Variation of Ship Sturgeon (*Acipenser nudiventris*) in South coast of Caspian Sea and Ural river using PCR-RFLP. M. Sc Thesis. Department of Marine Biology. University of Tarbiat modares. 73 p
15. Reilly, A., and Ward, R.D., 1998. Microsatellite loci to determine population structure of the Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) *Molecular Ecology*. 8: 1753-1768.
16. Safari, R., Pourkazemi, M., Rezvani, S., Shabani, A., and Bagherian, A.A., 2006. Genetic relationship of Iranian coastline Ship Sturgeon (*Acipenser nudiventris*) and Ural river based on microsatellite. P7. In: Department of fisheries science. Abstracts of the first localized congress of fisheries industrial and science. Iran, Golestan, Azadshahr.
17. Shaw, P.W., Turan, C., Wright, J.M., Connel, M., and Carvalho, G.R., 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity*. 82: 490-499
18. Smith, T., Nelson, J., Polard, S., Rubidge, E., McKay, S.J., Rodzen, J., May, B., and Koop, B., 2002. Population genetic analysis of sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser river. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 307-312.
19. Taylor, M.I., Meardon, F., and Turner, G., 2002. Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in a lake Victorian haplochromine cichlid fish: a *pundamilia pundamilia*\* *pundamilia uyererei* hybrid. *Molecular Ecology Note*. 2: 443-445.
20. Vilbert, L., and Marne, L., 1999. Biocapt, Genetic analyzer, version 99.03 for windows.
21. Vindhya, M., Anshumala, A., Punia, P., Narain, L., Kapoor, D., and Lai, K.K., 2005. Microsatellite Loci to determine population structure of *Labeo deero* (cyprinidae). *Aquatic Living resources*. 18: 83-85.
22. Wirgin, I., Waldman, J.R., Stabile, J., Lubinski, B., and King, T., 2002. Comparison mitochondrial DNA control region sequence and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 313-319
23. Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhu, B., Brosse, S., and Change, J., 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 7-13
24. Zhu, B., Zhou, F., Cao, H., Shao, Z., Zhao, N., and May, B., 2002. Analysis of genetic variation in the Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*) estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 301-306.
25. Yoon, M., Sato, S., Azoma, N., Seeb, J.E., Brykov, V., Seeb, L.W., Varnavskaya, N., Wilmot, R.L., Jin, D.H., Urawa, S., Urano, A., and Abe, S., 2007. Congruence of Population Genetic Profiles Obtained from Mitochondrial and Microsatellite DNA Analysis in the Pacific Rim Chum Salmon Populations. *North Pacific Anadromous Fish Commission. Technical Report* 7: 121-123.

## **Study of Genetic Variation of Ship Sturgeon (*Acipenser nudiventris*) from the South coast of Caspian Sea using microsatellite**

**R. Safari<sup>1</sup>, M. Pourkazemi<sup>2</sup>, S. Rezvani<sup>3</sup> and A. Shabani<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduated student of master degree, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources,

<sup>2</sup>Faculty member of Jihad ministry, Iranian Fisheries Research Organization, <sup>3</sup>Faculty member of Jihad ministry, Sturgeon Fish International Research Institute, Rasht, <sup>4</sup>Assistant Prof., Dept., of Fisheries College, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources

---

---

### **Abstract**

Ship Sturgeon (*Acipenser nudiventris*) is one of the economic and endangered species in Caspian Sea that has the least frequency among all immigrant Sturgeon. Genetic variation of Ship Sturgeon from the South coast of Caspian Sea was investigated using micro satellite. In this study 95 samples of Ship Sturgeon were collected from six locations on 3 regions, (First region: Kiashahr, Astara, Sefidrud, second region: Babolsar, Noshahr and the third: Gorgan). 4 SSR markers produced DNA bands in 5 loci, that 3 of them were polymorph. Range of observed and expected heterozygosity was (0.5-1) with average of 0.75 and (0.47-1) with average of 0.73 respectively. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) indicated that almost all of the variance in data (%92,  $p \leq 0.01$ ) was within locations. Between locations variance was (%8,  $p \leq 0.02$ ). No difference was observed among regions (%0,  $p \leq 0.93$ ). Results also showed that in spite of reduction of fish stocks, there is high level of genetic variation in this species and it seems there is more than one population in south coast of Caspian Sea and serious attempt must be done for protection of these stocks. Results also showed that microsatellites have high ability for showing genetic variation.

**Keyword:** Micro satellite; Ship Sturgeon; Genetic variation