



بررسی تنوع ژنتیکی مولدین پرورشی فیلماهی (*Huso huso*) با استفاده از روش ریزماهواره (Microsatellite)

سامان فراستی^۱، مجیدرضا خوش خلق^{۲*}، مهتاب یارمحمدی^۳

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷

تاریخ پذیرش: فروردین ۹۸

چکیده

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی مولدین پرورشی ماده و نر فیلماهی (*Huso huso*) موجود در گله مولدین موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، از چهار جفت لکوس ریزماهواره استفاده شد که همگی آن‌ها چندشکل بودند. تعداد آلل‌ها در محدوده ۳۷-۶ (میانگین ۱۸) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۸۷-۰ (میانگین ۰/۴۱) قرار داشت. میزان غنای آللی در این مطالعه (N_a) قابل قبول و میزان تنوع ژنتیکی متوسط و رو به کاهش برآورد شد. در بررسی تمایز ژنتیکی افراد، شاخص F_{st} به میزان ۰/۰۴۵ برآورد شد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین در بین مولدین بود. در بررسی‌های مرتبط با تعادل هاردی-واینبرگ به جز دو لکوس Spl-104 و Ls-19 در گله مولدین نر، لکوس‌های دیگر الگو انحراف از تعادل را نشان دادند که این امر می‌تواند در نتیجه کاهش اندازه جمعیت و یا وجود پدیده درون‌آمیزی باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از واریانس مولکولی مشخص شد که میزان اختلاف ژنتیکی بین دو جمعیت ۳ درصد بود. نتایج به دست آمده حاکی از پایین بودن تنوع ژنتیکی در گله مولدین پرورشی فیلماهی مورد مطالعه بود که در نتیجه کاهش مولدین وحشی فیلماهی در حوضه جنوبی دریای خزر رخ داده است.

واژگان کلیدی: فیلماهی، ریزماهواره، تنوع ژنتیکی.

- ۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
- ۳- دانشیار موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: majidreza@guilan.ac.ir

مقدمه

ماهیان خاویاری از خانواده *Acipenseridae* در زمره قدیمی‌ترین گروه‌های ماهیان زنده قرار دارند که قدمت آن‌ها به ۲۵۰ میلیون سال پیش باز می‌گردد (Bemis et al., 1997). شش گونه از ماهیان خاویاری به دو جنس (*Huso* و *Acipenser*) تعلق دارند که در دریای خزر و حوضه‌های آبریز مرتبط به آن زیست می‌کنند و هر ساله تولید بخش عمده‌ای از خاویار جهان را به خود اختصاص می‌دهند (Pourkazemi, 2006; Nasrollahzadeh, 2010). در نتیجه صید بیش از حد مولدین در طبیعت، وجود آلودگی‌های مختلف، تخریب بسترهای تولیدمثلی و از همه مهم‌تر طولانی بودن زمان بلوغ جنسی ماهیان خاویاری، جمعیت این ماهیان اقتصادی را در سطح جهان به شدت کاهش پیدا کرده است (Birstein et al., 2000; Billard and Lecointre, 1997). فیل‌ماهی (*Huso huso*) به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های اقتصادی موجود در دریای خزر مطرح بوده که جمعیت‌های وحشی آن به علت استحصال خاویار به شدت صید شده است و در معرض انقراض قرار دارد (Pourkazemi, 2006). این ماهی در لیست قرمز سازمان IUCN و در طبقه‌بندی گونه‌های به شدت در معرض خطر قرار دارد (IUCN, 2010).

در دهه‌های اخیر استفاده از برنامه‌های تکثیر حمایتی و تکثیر در شرایط اسارت به منظور حفظ و بهبود جمعیت‌های در معرض خطر توسعه زیادی پیدا کرده است. در برنامه‌های تکثیر حمایتی، مولدین وحشی در شرایط اسارت تکثیر می‌شوند و نتاج به دست آمده از آن‌ها در شرایط بسته پرورش یافته، سپس به جمعیت‌های مورد نیاز تزریق می‌شوند. اما در برنامه‌های تکثیر در اسارت، ذخیره مولدین در نتیجه پرورش ماهیان وحشی در شرایط اسارت ایجاد شده، نتاج به دست آمده از آن‌ها در صورت نیاز به طبیعت رهاسازی می‌شوند (McLean et al., 2007). تنوع ژنتیکی می‌تواند بر روی ویژگی‌های زیست‌پذیری و توانایی تطبیق‌پذیری یک جمعیت که به عنوان یکی از عوامل استقرار و پویایی جمعیت‌ها مطرح است، تاثیر داشته باشد (Reusch et al., 2005; Zeisset and Beebee, 2012). ارتباط خویشاوندی در یک برنامه تکثیر در شرایط اسارت کوچک محتمل است و می‌تواند نتاجی را ایجاد کند که درجه خلوص بالا و شایستگی اندکی را دارند

تهیه نقشه‌های ژنومی در ماهیان، نشانگرهای ریزماهواره با نشانگرهای دیگر توسط Wright و O'Connell در سال ۲۰۰۵ مورد مقایسه قرار گرفت که نتیجه آن همراه با بازدهی بالاتر نشانگرهای ریزماهواره همراه بود.

با توجه به کاهش روزافزون جمعیت فیلماهی در بخش‌های جنوبی دریای خزر و همچنین با در نظر گرفتن کاهش مولدین وحشی به منظور استفاده در اهداف بازسازی ذخایر، با بهره‌گیری از مولدین به دست آمده از آبی‌پروری می‌توان بخشی از این خلا را جبران کرده، همچنین به حفظ بقای این گونه با ارزش کمک شایانی کند. در این پژوهش برای اولین بار ساختار ژنتیکی مولدین پرورشی فیلماهی با هدف تهیه شناسنامه‌های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA ژنومی

نمونه‌گیری به میزان ۲ گرم از بافت باله دمی ۳۹ مولد ماده (با میانگین وزنی ۹۸/۹۷ کیلوگرم و میانگین سنی ۱۹/۰۵ سال) و ۸ مولد نر (با میانگین وزنی ۷۸/۳۸ کیلوگرم و میانگین سنی ۱۵/۶۲ سال) فیلماهی (*Huso huso*) موجود در گله مولدین موسسه تحقیقات بین‌المللی

Saccheri et al., 1998; Hedrick and Kalinowski, 2000; Woodworth et al., 2002). بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی در حد مطلوب و به حداقل رساندن میزان درون‌آمیزی به منظور به حداکثر رساندن میزان بازدهی یک التزام محسوب می‌شود که به این منظور، می‌توان از نشانگرهای مبتنی بر ژنوم برای چنین مطالعاتی بهره جست.

نشانگرهای ریزماهواره و یا تعداد قطعات متوالی تکراری متغیر (VNTR)، توالی‌های کوتاه و تکرارپذیری هستند که به صورت ناهمگون در طول ژنوم قرار گرفته‌اند و درجه چندشکلی بالایی را در گونه‌ها و جمعیت‌ها از خود نشان می‌دهند (Toth et al., 2000). نشانگرهای ریزماهواره به دلیل الگوی توارث هم‌بارزی، وجود درجه‌های بالایی از چندشکلی، عدم تاثیرپذیری از محیط و ویژگی‌های منحصر به فرد دیگر به عنوان یک ابزار ژنتیکی مناسب، به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی در سطح اشخاص و جمعیت‌ها و همچنین تعیین تنوع ژنتیکی در داخل گونه‌ها، احیا کردن شجره‌نامه‌ها و همچنین مقایسه جمعیت‌های وحشی و اهلی مورد تایید قرار گرفته است (Estoup and Angers, 1998). به منظور تعیین دقت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی و همچنین

تاس ماهیان دریای خزر (رشت) صورت پذیرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش استات آمونیوم (چکمه دوز قاسمی، ۱۳۸۴) انجام شد. این روش شامل سه مرحله کلی به شرح زیر بود: در مرحله اول، بافت باله دمی ابتدا توسط قیچی خرد و سپس از طریق افزودن $600 \mu\text{L}$ بافر STE (Sodium Chloride-Tris-) EDTA) به طور کامل هضم فیزیکی شد. در مرحله دوم، به منظور هضم شیمیایی بافت‌ها در ابتدا $20 \mu\text{L}$ بافر SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۲۰ درصد و سپس $2 \mu\text{L}$ پروتئیناز K به محلول اضافه شد و به مدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور با درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور هضم نهایی $600 \mu\text{L}$ استات آمونیوم به کل نمونه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر به منظور رسوب DNA، به میزان $800 \mu\text{L}$ اتانول مطلق سرد به محلول اضافه شد. پس از سه مرحله سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و تا زمان رویت DNA، نمونه‌ها در زیر هود قرار داده شدند. پس از اطمینان از وجود DNA و به منظور استفاده‌های بعدی به میزان

تاس ماهیان دریای خزر (رشت) صورت پذیرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش استات آمونیوم (چکمه دوز قاسمی، ۱۳۸۴) انجام شد. این روش شامل سه مرحله کلی به شرح زیر بود: در مرحله اول، بافت باله دمی ابتدا توسط قیچی خرد و سپس از طریق افزودن $600 \mu\text{L}$ بافر STE (Sodium Chloride-Tris-) EDTA) به طور کامل هضم فیزیکی شد. در مرحله دوم، به منظور هضم شیمیایی بافت‌ها در ابتدا $20 \mu\text{L}$ بافر SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۲۰ درصد و سپس $2 \mu\text{L}$ پروتئیناز K به محلول اضافه شد و به مدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور با درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور هضم نهایی $600 \mu\text{L}$ استات آمونیوم به کل نمونه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر به منظور رسوب DNA، به میزان $800 \mu\text{L}$ اتانول مطلق سرد به محلول اضافه شد. پس از سه مرحله سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و تا زمان رویت DNA، نمونه‌ها در زیر هود قرار داده شدند. پس از اطمینان از وجود DNA و به منظور استفاده‌های بعدی به میزان

تکثیر DNA

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی مولدین پرورشی از ۴ جفت نشانگر ریزماهوره (Ls19، Ls39، Ls68 و Spl-104) استفاده شد. به منظور دست‌یابی به حداکثر میزان محصول در واکنش‌های PCR، تمامی شرایط واکنش، به ویژه دمای اتصال بهینه‌سازی شد (جدول ۱). به منظور انجام واکنش PCR و تکثیر جایگاه‌های ژنی از ویال‌های $20 \mu\text{L}$ با نسبت‌های زیر استفاده شد: 100 ng DNA نمونه، $1/25 \mu\text{L}$ بافر PCR با غلظت $10 \times$ ، 10 pMol آغازگرهای رفت و برگشت، 100 mMol dNTPs، $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ آنزیم Taq (سینا ژن، ایران) و 50 mMol MgCl_2 (جدول ۲).

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای ریزماهواره‌ها

منبع	دمای اتصال (°C)	توالی تکراری	محدوده اندازه (bp)	توالی پرایمر (۵'-۳')	جایگاه ژن*
May et al., 1997	۵۵	(TTG) _۶	۱۴۰-۱۷۴	F-CATCTTAGCCGCTCTGTGGTAC R-CAGGTCCCTAATAACAATGGC	Ls19/U72730
	۵۵	(GTT) _{۱۰}	۱۱۹-۱۷۲	F-TTCTGAAGTTCACACATTG R-ATGGAGCATTATTGGAAGG	Ls39/U72734
	۶۱	(TATC) _{۱۳}	۱۳۲-۱۸۸	F-TTATTGCATGGTGTAGCTAAAC R-TCCTCTTTGGCATTGTTC	Ls68/U72739
McQuown et al., (2000)	۵۷	(TCRT) _{۱۲}	۱۸۱-۲۹۰	F-TTATATGGGTGGGGTGGATG R-TCCTCTTTGGCAATTGTTC	Spl-104/AF276173

*: کد دسترسی در بانک ژنی

جدول ۲: نوع و غلظت مواد مصرفی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

مقدار در واکنش ۲۰ μL	غلظت	مواد مصرفی
۱ μL	۱۰۰ ng	DNA
۱/۲۵ μL	۱۰ X	بافر PCR
۰/۲۵ μL	۱۰ mMol	dNTP _s
۰/۵ μL	۵۰ mMol	MgCl ₂
۰/۵ μL	۱۰ pMol	آغازگر (F)
۰/۵ μL	۱۰ pMol	آغازگر (R)
۰/۱ μL	۵U/μL	Taq DNA Polymerase
۸/۴ μL	-	dH ₂ O

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکل (Mastercycler EP Gradient, 96 Plus, Eppendorf, آلمان) و تحت شرایط زیر صورت پذیرفت: واسرشته‌سازی اولیه (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط (Extension) و در ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی آغازگر (Annealing) مربوطه، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه

موجود در جمعیت‌های مولدین پرورشی فیل‌ماهی با استناد به مولفه‌های تعداد آلل، متوسط تعداد آلل، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)، تعادل هاردی واینبرگ، شاخص F_{st} و F_{is} و N_m برآورد شد. ساختار ژنتیک جمعیت برای هر کدام از جایگاه‌های ژنی در این دو جمعیت از طریق مولفه‌های F (شاخص ثبات کل جمعیتی) مورد بررسی قرار گرفت (Weir and Cockerham, 1984).

نتایج

در این پژوهش تمامی جایگاه‌های ژنی در مولدین پرورشی فیل‌ماهی به صورت چندشکلی بودند. تعداد ۱۴۴ آلل در این دو جمعیت شناسایی شد (۱۱۳ آلل در جمعیت مولدین ماده و ۳۱ آلل در جمعیت مولدین نر) که تمامی آن‌ها به صورت دیسومیک بودند. در جمعیت مولدین ماده لکوس $Spl-104$ با ۳۷ آلل و در جمعیت مولدین نر لکوس $Ls19$ با ۱۰ آلل، بالاترین میزان چندشکلی را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

پایان به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط نهایی تیمارهای دمایی اعمال شد.

الکتروفورز و رنگ‌آمیزی

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد (۱:۲۹ بیس آکریل‌آمید: آکریل‌آمید، بافر TBE با غلظت ۱X) به همراه مارکر ۵۰ bp (سینا کلون، ایران) انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، فرآیند رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترات نقره ۱ درصد و با استفاده از سه بافر صورت پذیرفت (Pourkazemi, 1996). در مرحله اول به منظور از بین بردن رنگ بافر سنگین کننده از بافر اسید استیک ۵ درصد و اتانول ۱۰ درصد استفاده شد. در مرحله دوم به منظور رنگ‌پذیری DNA، ژل درون بافر نیترات نقره ۱ درصد قرار داده شد و نهایتاً در مرحله آخر به منظور نمایان شدن باندها از بافر فرمالدئید ۱۵ درصد و NaOH ۴/۵ درصد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزار GenAlex (V6.5) (Peakall and Smouse, 2012) تنوع ژنتیکی

جدول ۳: تعداد آلل‌های ثبت شده به تفکیک جمعیت و میانگین آن‌ها در سطح جمعیت مولدین پرورشی فیل ماهی

N _e		N _a		جایگاه آلی
نر	ماده	نر	ماده	
۵/۵۵۶	۲۵/۵۶۳	۸	۳۷	Spl-104
۸/۵۳۳	۱۶/۵۳۳	۱۰	۲۳	Ls-19
۵/۵۳۳	۱۳/۹۵۴	۸	۲۴	Ls-39
۵/۳۳۳	۲۰/۵۵۴	۷	۲۹	Ls-68
۱۲/۲±۶۷۱/۷۳۹		۴±۱۸/۱۶۶		میانگین

N_a: تعداد آلل مشاهده شده؛ N_e: تعداد آلل موثر.

۰/۱۸۲ برای لکوس Ls19 و ۰/۸۸۲ برای لکوس Ls39 بود. مقادیر ضریب تمایز (Fst) برای هر لکوس در محدوده ۰/۰۲۷ تا ۰/۰۵۴ و میانگین ۰/۰۴۵ به ثبت رسید و میزان افتراق بین دو جمعیت (Fst) ۴/۵ درصد به دست آمد (جدول ۶).

در بررسی صورت پذیرفته با آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در سطح ۹۹ درصد مشخص شد که تنوع ژنتیکی میان دو جمعیت ۳ درصد، در میان افراد ۵۲ درصد و در درون افراد ۴۵ درصد بود. (شکل ۱) مقدار Fst با استفاده از واریانس مولکولی ۰/۰۲۹ به ثبت رسید.

میزان تنوع ژنتیکی برآورد شده در جمعیت مولدین پرورشی با استفاده از شاخص‌هایی مانند هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) و همچنین بررسی تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون X² در هر دو جمعیت در جدول ۴ و مقادیر مربوط به H_o و H_e در سطح جایگاه ژن نیز در جدول ۵ ارائه شده است. به جز لکوس‌های Spl-104 و Ls19 در جمعیت مولدین نر، لکوس‌های دیگر عدم انحراف از تعادل را نشان دادند.

در تمامی جایگاه‌های آلی میانگین شاخص Fst (ضریب تمایز) ۰/۰۴۵، Fis (ضریب درون‌آمیزی) ۰/۵۳۷ و Nm (جریان ژنی) ۵/۷۱۳ بود. مقادیر ضریب درون‌آمیزی (Fis) در حدود

جدول ۴: تنوع ژنتیکی چهار جایگاه آلی مورد بررسی در دو جمعیت مولدین پرورشی فیلماهی

نر	ماده	مولفه‌ها	جایگاه آلی
۰/۳۷	۰/۶۹	H _O	Spl-104
۰/۸۲	۰/۹۶	H _E	
ns	***	H-W	
۰/۸۷	۰/۶۱	H _O	Ls 19
۰/۸۸	۰/۹۴	H _E	
ns	***	H-W	
۰/۰۰	۰/۲۰	H _O	Ls 39
۰/۸۱	۰/۹۲	H _E	
***	***	H-W	
۰/۲۵	۰/۳۰	H _O	Ls 68
۰/۸۱	۰/۹۵	H _E	
**	***	H-W	

H_O: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_E: هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ H-W: احتمال در تعادل هاردی-واینبرگ؛ ns: عدم معنی داری؛ **: P<۰/۰۱؛ ***: P<۰/۰۰۱.

جدول ۵: مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) در سطح جایگاه‌های ژنی مولدین پرورشی فیلماهی

H _E	H _O	جایگاه ژنی
۰/۸۹۱	۰/۵۳۴	Spl-104
۰/۹۱۱	۰/۷۴۵	Ls19
۰/۸۷۰	۰/۱۰۳	Ls39
۰/۸۸۲	۰/۲۷۹	Ls68
۰/۸۸۹	۰/۴۱۵	میانگین

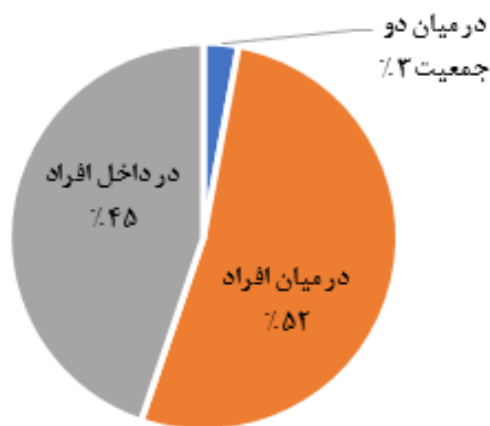
H_O: هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_E: هتروزیگوسیتی مورد انتظار.

جدول ۶: شاخص‌های F- در هر لکوس در جمعیت مولدین پرورشی فیل ماهی

جایگاه ژنی	F _{st}	F _{is}	N _m
Spl-104	۰/۰۵۲	۰/۴۰۱	۴/۵۷۳
Ls19	۰/۰۲۷	۰/۱۸۲	۸/۹۰۲
Ls39	۰/۰۵۴	۰/۸۸۲	۴/۳۹۰
Ls68	۰/۰۴۸	۰/۶۸۴	۴/۹۸۷
میانگین	۰/۰۴۵	۰/۵۳۷	۵/۷۱۳

F_{st}: ضریب تمایز؛ F_{is}: ضریب درون آمیزی؛ N_m: جریان ژنی.

درصد واریانس مولکولی



شکل ۱: تنوع ژنتیکی به دست آمده از آزمون واریانس مولکولی (AMOVA)

بحث

ضرورت تبدیل کرده است. در حال حاضر یکی از روش‌های حفظ جمعیت‌های در معرض خطر، بهره‌گیری از روش تکثیر در شرایط اسارت است، اما باید به این نکته توجه شود که اندازه کوچک جمعیت پرورشی و همچنین تکثیر کنترل نشده آن‌ها می‌تواند باعث کاهش تنوع ژنتیکی شود

جمعیت‌های طبیعی فیل ماهی (*Huso huso*) در دریای خزر تحت تاثیر مداخله‌های انسانی به صورت چشمگیری کاهش پیدا کرده است که این امر توسعه برنامه‌های مرتبط با حفظ ذخایر و جمعیت‌های این ماهی را به یک

(Hansen et al., 2000). بنابراین حفظ تنوع ژنتیکی باید به عنوان اولویت اصلی در برنامه‌های حفاظت و بازسازی ذخایر در نظر گرفته شود. با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مناسب می‌توان تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را مورد بررسی قرار داد. نشانگرهای ریزماهواره در پژوهش‌های مرتبط با ژنتیک جمعیت گونه‌های وحشی و پرورشی ماهیان به صورت گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Liu et al., 2009). در بررسی تنوع ژنتیکی تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) و با تاکید بر برآورد سهم لاروهای تولید شده از طریق بازسازی ذخایر در جمعیت‌های وحشی مشخص شد که به نسبت ۱۰-۵ درصد از جمعیت ماهیان جوان در دریا را ماهیان حاصل شده از مراکز تکثیر مصنوعی تشکیل می‌دهند (Zhu et al., 2002). به دلیل بالا بودن تنوع قطعات تکرار شونده در نتیجه جهش و همچنین به علت الگوی توارث هم‌بارزی در نشانگرهای ریزماهواره، ارزش به‌کارگیری آن‌ها در مطالعات ژنتیکی دو چندان می‌شود (Liu and Cordes, 2004). در همین راستا در نتیجه بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) مشخص شد که روش ریزماهواره از توانایی بالایی در نشان دادن تنوع ژنتیکی تاس‌ماهیان روسی برخوردار است (خوش‌خلق و همکاران، ۱۳۸۶). در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) در قسمت‌های شمالی و جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره میزان تنوع ژنتیکی اندک برآورد شد که علت آن به کاهش تعداد افراد جمعیت‌ها نسبت داده شد (Norouzi and Pourkazemi, 2016). به عنوان یک اصل، در صورتی که مقادیر هتروزیگوسیتی در محدوده ۰/۳ و ۰/۸ باشد، نشانگرهای ریزماهواره در نشان دادن تنوع ژنتیکی می‌توانند مفید واقع شوند (Takezaki and Nei, 1996). در پژوهش حاضر به جز جایگاه Ls-39 در هر دو جمعیت و لکوس Ls-68 در جمعیت مولدین نر، لکوس‌های دیگر از این اصل پیروی کردند که این امر استفاده از این نشانگرها را به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت مولدین پرورشی فیل‌ماهی مناسب می‌سازد.

هتروزیگوسیتی شاخص مناسبی به منظور بررسی تاریخچه و تنوع یک جمعیت است. در صورتی که مقادیر به دست آمده برای هتروزیگوسیتی بالاتر از حد متوسط باشد، میزان تنوع ژنتیکی نیز بالا است و اگر پایین‌تر باشد، میزان تنوع ژنتیکی در آن جمعیت کاهش پیدا

ایرانی (*Acipenser persicus*) در مناطق جنوبی دریای خزر به وجود خطا در نمونه‌گیری، مهاجرت، تکثیر مصنوعی و یا وجود آلل‌های خنثی نسبت داده شد (Chakmehdouz, Ghasemi et al., 2011).

در این پژوهش متوسط ضریب درون‌آمیزی (F_{is}) به میزان $0/537$ برآورد شد. به صورت کلی مقادیر به دست آمده برای F_{is} در محدوده -1 (عدم وجود درون‌آمیزی) و $+1$ (تشابه کامل) قرار دارد. وجود مقادیر مثبتی از F_{is} نشان دهنده کاهش نتاج هتروزیگوت در جمعیت F_1 در نتیجه درون‌آمیزی خواهد بود. میزان F_{is} استنتاج شده در این پژوهش حاکی از وجود یک درون‌آمیزی متعادل در جمعیت مولدین پرورشی بود.

جریان ژنی (N_m) در نتیجه انتقال ماده ژنتیکی در بین جمعیت‌ها از طریق مهاجرت و یا انتقال مولدین و گامت‌ها ایجاد می‌شود (Avisé, 1994). در صورتی که اصلی‌ترین دلیل تمایز ژنتیکی جریان ژنی باشد، آنگاه $N_m > 1$ خواهد بود. اما در صورتی که $N_m < 1$ باشد رانش ژنی عامل اصلی تمایز ژنتیکی در جمعیت‌ها می‌شود (Li et al., 2007). با توجه به میانگین N_m به دست آمده در این مطالعه می‌توان بیان کرد که میزان جریان ژنی بین دو گله در حد

کرده است. به صورتی که در مطالعه انجام شده توسط Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده نشانگرهای ریزماهواره بر روی جمعیت‌های تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) در حوضه جنوبی دریای خزر هتروزیگوسیتی کاهش پیدا کرده بود. در تمامی موارد در این مطالعه، مقادیر میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) از مقادیر میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) پایین‌تر بود که این امر نشان دهنده کاهش تنوع ژنتیکی و وجود احتمالی درون‌آمیزی در افراد جمعیت ماهیان وحشی است. در همین راستا Dudu و همکاران در سال ۲۰۱۴ پایین‌تر بودن میزان H_o از H_e را در جمعیت مولدین وحشی فیل ماهی (*Huso huso*) در رودخانه دانوب در نتیجه کاهش جمعیت مولدین و افزایش درون‌آمیزی بیان کردند.

در بررسی‌های مرتبط با تعادل هاردی-واینبرگ، به جز دو لکوس $Spl-104$ و $Ls-19$ در جمعیت مولدین نر، تمامی لکوس‌ها از تعادل خارج بودند. این انحراف از تعادل می‌تواند به کاهش اندازه جمعیت، وجود رابطه‌های خویشاوندی، وجود آلل‌های خنثی و در نتیجه افزایش کاذب هموزیگوسیتی مرتبط باشد. انحراف از تعادل در مورد جمعیت تاس‌ماهیان

کاملاً از هم جدا هستند و هیچ گونه جریان ژنی در بین جمعیت‌ها وجود ندارد (Holsinger and Bruce, 2009). در ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت‌های تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) در رودخانه اوتاوا به منظور ارزیابی تفاوت‌های ژنتیکی در مناطق نمونه‌برداری از شاخص F_{st} استفاده شد و افتراق ژنتیکی اندکی بین گروه‌ها به ثبت رسید (Wozney et al., 2011). میزان F_{st} در بررسی تمایز ژنتیکی تاس‌ماهی‌های آتلانتیک (*Acipenser oxyrinchus*) در بهاره و پاییزه در رودخانه جیمز ایالت ویرجینیا ۰/۰۴۸ برآورد شد که نشان دهنده افتراق ژنتیکی نرهای پاییزه و بهاره بود (Balazik et al., 2017).

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان دهنده پایین بودن تنوع ژنتیکی در گله مولدین پرورشی فیل‌ماهی مورد مطالعه است که این امر می‌تواند بازتابی از کاهش ۹۰ درصدی جمعیت مولدین وحشی در دریای خزر باشد (IUCN, 2010). به منظور تعیین دقیق‌تر تنوع ژنتیکی می‌توان از تعداد بیشتری مولد بهره جست که با توجه به کاهش شدید جمعیت مولدین در طبیعت و کاهش معنی‌دار بازگشت شیلاتی این امر چندان محتمل به نظر نمی‌رسد. با توجه به این که ۵۰ درصد از نتایج به دست آمده از افراد

متوسط و رو به بالا بود که این امر نیز در نتیجه تلاقی‌های بین جمعیتی در مولدین صید شده از دریا رخ داده است. بالا بودن مقادیر جریان ژنی نمی‌تواند تنوع ژنتیکی را تضمین کند، زیرا پایین بودن تعداد مولدین و جمعیت‌ها و در نتیجه آمیزش بین جمعیت‌های کوچک می‌تواند تنوع را کاهش دهد.

از ضریب تمایز F_{st} به عنوان یکی از شاخص‌های مهم برای تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود (Balloux and Lugon-Moulin, 2002). برای تفسیر F_{st} پیشنهاد شده است که مقدار بین ۰-۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ نشان دهنده تمایز بالا بین جمعیت‌ها و مقادیر بالاتر از ۰/۲۵ تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد (Wright, 1978). در این مطالعه میانگین میزان F_{st} برابر با ۰/۰۴۵ ثبت شد که این امر نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین این دو جمعیت بود. پایین بودن مقدار F_{st} در یک جمعیت نشان دهنده پایین بودن چند شکلی در آن جمعیت است. به هنگام صفر بودن این مقدار رابطه آمیزشی دو جمعیت به صورت آزاد بوده و مقدار یک به معنای عدم وجود تنوع آلی در بین جمعیت‌ها است که در این صورت دو جمعیت

هتروزیگوت نیز هتروزیگوت هستند، می‌توان با استفاده از آمیزش مولدین پلی‌مورف میزان هتروزیگوسیتی را افزایش داد و این امر را می‌توان از طریق آمیزش بین مولدین هتروزیگوت و یا استفاده از مولدین مراکز تکثیر و حفاظت و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری دیگر عملی کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر

منابع

- خوش خلق م.ر.، پورکاظمی م.، کمالی ا. و رضوانی س. ۱۳۸۶. بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) شمال خزر (رودخانه ولگا) و خزر جنوبی (آب‌های ایران و ترکمنستان) با استفاده از روش میکروستلایت. مجله شیلات ایران، ۱۶(۴): ۸۰-۶۹.
- Avise J.C. 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, USA. 207P.
- Balazik M.T., Farrae D.J., Darden T.L. and Garman G.C. 2017.** Genetic differentiation of spring-spawning and fall-spawning male Atlantic sturgeon in the James River, Virginia. PLoS One, 12(7): 1-8 (e0179661).
- Balloux F. and Lugon-Moulin N. 2002.** The estimate of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11: 155-165.
- Bemis W.E., Findies E.K. and Grande L. 1997.** An overview of Acipenseriforms. Environmental Biology of Fishes, 48(1-4): 25-71.
- Billard R. and Lecointre G. 2000.** Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10(4): 355-392.
- Birstein V.I., Bemis W.E. and Waddman J.R. 1997.** The threatened status of Acipenseriform species: A summary. Environmental Biology of Fishes, 48: 427-435.
- Chakmehdouz Ghasemi F., Pourkazemi M., Tavakoli Eshkalak M., Yarmohammadi M., Hassanzadeh Saber M. and Baradaran Noveiri S. 2011.** Application of microsatellite markers to determine populations of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the South of Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(4): 596-606.
- Dudu A., Burcea A., Costache M., Florescu I. and Georgescu S.E. 2014.** Analysis of genetic diversity in beluga sturgeon, *Huso huso* from the Lower Danube River using DNA markers. Animal Science and Biotechnologies, 47(1): 64-68.
- Estoup A. and Angers B. 1998.** Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. P: 55-86. In: Carvalho G. (Ed.).
- چکمه‌دوز قاسمی ف. ۱۳۸۴. مقایسه روش‌های استخراج DNA در آبزیان و دستور العمل کاربردی آن. پایان‌نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علمی کاربردی علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان، دانشگاه جامع علمی-کاربردی. ۵۳ص.

- Advances in Molecular Ecology. IOS Press, Netherlands.
- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E. and Mensberg K.D. 2000.** Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*, 9: 583–594.
- Hedrick P.W. and Kalinowski S.T. 2000.** Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 139–162.
- Holsinger K.E. and Bruce S.W. 2009.** Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting Fst. *Nature Reviews Genetic*, 10(9): 639–650.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2010.** IUCN Red List of threatened species. Version 2010.1. IUCN, Species Survival Commission, Switzerland. Retrieved March 2010, from <http://www.iucnredlist.org>.
- Khoshkholgh M.R., Nazari S. and Pourkazemi M. 2013.** Population structure of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) in the southern part of Caspian Sea. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 9(1): 29–39.
- Li D., Kang D., Yin Q., Sun Z. and Liang L. 2007.** Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Genetics and Genomics*, 34: 984–993.
- Liu F., Xia J.H., Bai Z.H., Fu J.J., Li J.L. and Yue G.H. 2009.** High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, 297: 51–56.
- Liu Z. and Cordes J.F. 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1–37.
- May B., Chales C., Krueger C. and Kincaid L. 1997.** Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon primer sequences homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 1542–1547.
- McLean J.E., Seamons T.R., Dauer M.B., Bentzen P. and Quinn T.P. 2007.** Variation in reproductive success and effective number of breeders in a hatchery population of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*): Examination by microsatellite-based parentage analysis. *Conservation Genetics*, 9: 295–304.
- McQuown E.C., Sloos B.L., Sheehen R.J. and May B. 2000.** Microsatellite analysis of genetic

- variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. American Fisheries Society, 129: 1380–1388.
- Nasrollahzadeh A. 2010.** Caspian Sea and its ecological challenges. Caspian Journal of Environmental Sciences, 8(1): 97–104.
- Norouzi M. and Pourkazemi M. 2016.** Microsatellite DNA markers for analysis of genetic population structure of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in the North (Volga and Ural Rivers) and South Caspian Sea (Sefidrud and Gorganrud Rivers). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15(2): 687–700.
- O'Connell M. and Wright J.M. 2005.** Microsatellite DNA in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7: 331–363.
- Peakall R. and Smouse P.E. 2012.** GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- An update. Bioinformatics, 28: 2537–2539.
- Pourkazemi M. 1996.** Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences, University of Wales, UK. 260P.
- Pourkazemi M. 2006.** Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past present and future. Journal of Applied Ichthyology, 22: 12–16.
- Reusch T.B.H., Ehlers A., Hammerli A. and Worm B. 2005.** Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 2826–2831.
- Saccheri I., Kuussaari M., Kankare M., Vikman P. and Hanski I. 1998.** Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature, 392: 491–494.
- Takezaki N. and Nei M. 1996.** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. Genetics, 144: 389–399.
- Toth G., Gaspari Z. and Jurka J. 2000.** Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Research, 10(7): 967–981.
- Weir B.S. and Cockerham C.C. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358–1370.
- Woodworth L.M., Montgomery M.E., Briscoe D.A. and Frankham R. 2002.** Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications. Conservation Genetics, 3: 277–288.

- Wozney K.M., Haxton T.J., Kjartanson S. and Wilson C.C. 2011.** Genetic assessment of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) population structure in the Ottawa River. *Environmental Biology of Fishes*, 90(2): 183–195.
- Wright S. 1978.** The relation of livestock breeding to theories of evolution. *Journal of Animal Science*, 46(5): 1192–1200.
- Zeisset I. and Beebee T.J.C. 2012.** Donor population size rather than local adaptation can be a key determinant of amphibian translocation success. *Animal Conservation*, 16(3): 359–366.
- Zhu B., Zhou F., Cao H., Shao Z., Zhao N., May B. and Chang J. 2002.** Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: Estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4-6): 301–306.



Research Paper

Genetic diversity of cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) brood stocks by using microsatellite method

Saman Farasati¹, Majid Reza Khosh Kholgh^{2*}, Mahtab Yarmohammadi³

Received: March 2019

Accepted: April 2019

Abstract

The genetic diversity and population structure of cultured male and female herds of beluga sturgeon (*Huso huso*) brood stocks were estimated in International Sturgeon Research Institute using four DNA microsatellite loci. All loci were in polymorphic pattern. The number of alleles and observed heterozygosity ranged between 6-37 (mean 18) and 0-0.87 (mean 0.41), respectively. Allelic richness (N_a) was acceptable and genetic variation was in moderate decreasing pattern. For survey of genetic differentiation in individuals, the F_{st} was estimated at 0.045, indicating a low genetic differentiation among breeders. Samples from male herds in Spl-104 and Ls-19 loci were at Hardy-Weinberg equation and other loci showed a pattern of deviation from equilibrium, which could be as a result of reduced population size and the presence of an inbreeding phenomenon. According to the results obtained from molecular variance analysis, the genetic difference between two populations was 3%. The results of the study indicate that genetic diversity was low in the cultured beluga brood stocks, resulting in the reduction of wild beluga breeders in the southern basin of the Caspian Sea.

Key words: *Beluga Sturgeon, Microsatellite, Genetic Diversity.*

1- M.Sc. in Fisheries, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

2- Associate Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

3- Associate Professor in International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: majidreza@guilan.ac.ir