# بررسی الکتروفورتیک و مورفومتریک تاس ماهی ایران

# (قره‌برون *Acipenser persicus*) به منظور تعیین نژاد

مهندس سید امیر پروانه
دکتر کاظم پریور
موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران
دانشگاه آزاد اسلامی
انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای خزر - رشت، صندوق پستی ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

## چکیده

این بررسی درون گونه‌ای در ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) به منظور یافتن نژادهای احتمالی با استفاده از پروتئینهای محلول در سرم خون و مشخصات مورفومتریک ماهیان صورت گرفته است. مجموعاً از ۱۵۹ عدد ماهی خون‌گیری بعمل آمد. پس از نمونه‌برداری خون، مشخصات مورفولوژیک ماهیان اندازه‌گیری و ثبت گردید.

مناطق جمع‌آوری نمونه‌ها، صیدگاههای تابعه شیلات ایران واقع در حاشیه جنوبی دریای خزر بودند.

جهت جداسازی الکتروفورزی از ماتریکس استات سلولز استفاده گردید. شاخص الکتروفورتیک مورد بررسی پس از تفکیک پروتئین‌ها، تعداد باندها بودند. پس از جداسازی سرم، پروتئین‌های محلول در آن، در تانک تفکیک از هم جدا می‌شدند. سپس باندهای بدست آمده رنگ آمیزی شده و سپس رنگ بری در آنها صورت می‌گرفت. عمل اسکن پلیت توسط دستگاه دانسیتومتر صورت گرفته و الکتروفوروگرام مربوطه توسط دستگاه چاپگر چاپ می‌شد.

از مجموع تجزیه و تحلیل‌های آماری بعمل آمده مشخص گردید که در پاره‌ای از مشخصات مورفولوژیک بین ماهیان مناطق گرگان و سفیدرود تفاوت‌های عمده و معنی‌داری وجود دارد و از این نظر می‌توان دو نژاد یا جمعیت جغرافیائی معرفی نمود.

از نظر مقایسه الکتروفوروگرامها، تفاوت در تعداد باند مشاهده شد.

## مقدمه

در تکنیک الکتروفورز مولکولهای پروتئین براساس عواملی نظیر بار الکتریکی، جرم مولکولی، pH و غیره به یکی از دو قطب مثبت (آند) و منفی (کاتد) مهاجرت نموده و هر مولکول در یک منطقه توقف پیدا می‌کند و باند خاصی را بوجود می‌آورد. سپس با رنگ‌آمیزی، باندهای حاصله نمایان می‌شوند. باندهای حاصله را می‌توان توسط دانسیتومتر اسکن نموده و منحنی‌های مربوطه را رسم نمود و به بررسی کمی و کیفی آنها پرداخت.

در سال ۱۹۷۳ محققینی نظیر Balsano و Rasch با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید به مطالعه پروتئین‌های محلول در سرم خون چند گونه از ماهیان پرداختند.

در سال ۱۹۷۴ پروفسور لوکیاننکو و همکارانش با استفاده از آنالیز ایمونوشیمیایی ترکیب آنتی ژنی آلبومین‌های سرم خون و همین تکنیک الکتروفورز توانستند جدایی دو گونه تاسماهی ایران و تاسماهی روس را ثابت کنند و به این ترتیب تاسماهی ایران به عنوان یک گونه مستقل معرفی گردید (عادلی ۱۳۷۳).

در سال ۱۹۸۸ میلادی، مطالعات الکتروفورتیک به منظور یافتن جمعیت‌های ماهی قزل‌آلای قطبی توسط محققینی چون J.D.Partington و C.M.Mils صورت گرفت. همراه با مطالعات الکتروفورتیک، مشخصات مورفولوژیک ماهیان اندازه‌گیری و ثبت گردید و سرانجام این داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در ادامه این گونه بررسی‌ها، در سال ۱۹۹۱ دو محقق به نامهای Basaglia و Marchetti به مطالعه پروتئین‌های محلول ماهیچه سفید در گونه‌های مختلف خانواده سوف ماهیان پرداختند. این محققین در مقدمه گزارش خود اعلام نمودند که الکتروفورز، تکنیکی مهم برای آنالیز بیوشیمیایی در طبقات مختلف می‌باشد. در ایران نیز این تکنیک به منظور مطالعات ماهی شناسی توسط دکتر کیوانفر با بررسی پروتئین‌های سرم خون گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری انجام شده است (Keyvanfar 1988).

## مواد و روشها

نمونه‌برداری از صیدگاههای مختلف ماهیان خاویاری در سواحل جنوبی دریای خزر صورت گرفت. به منظور دست‌یابی به جمعیت‌های احتمالی که ممکن است تحت شرایط خاص اکولوژیک و بیولوژیک در یک منطقه بوجود آمده باشند، نمونه‌برداری در سطح وسیعی انجام گرفت. از آنجا که ماهیان مولد صیدگاههای ۳ و ۴ شیلات ایران به مجتمع شهید بهشتی واقع در سد سنگر رشت منتقل می‌شدند، از کارگاه فوق نیز نمونه‌برداری شد.

از آنجا که هدف ما در این مرحله، بررسی پروتئین‌های محلول در سرم خون ماهیان مناطق مختلف بود، خون‌گیری از رگهای موجود در کمان آبششی با استفاده از وسایل کاملاً تمیز صورت گرفت. برای این کار ابتدا برانشی ماهی شستشو و سپس با چاقو یکی از کمانهای آبششی برش داده شد. از رگهای موجود در کمان آبششی، خون به حالت فوران خارج می‌گردید و با قرار دادن یک لوله سانتریفوژ تمیز مقدار ۵ ـ ۲ میلی‌متر خون برداشته می‌شد.

به منظور جلوگیری از تخریب سریع پروتئین‌های محلول در سرم خون نمونه‌ها بلافاصله به کلمن محتوی یخ منتقل می‌گردیدند و سپس مشخصات مورفولوژیک ماهی اندازه‌گیری شده و در فرمهای مخصوص ثبت گردید. این مشخصات عبارت بودند از :

۱ ـ وزن (kg)

۲ ـ طول چنگالی (fork length) : از نوک پوزه تا محل انشعاب باله دمی

۳ ـ طول کل (total length) : از نوک پوزه تا انتهای باله دمی هتروسرک

۴ ـ جنسیت

۵ ـ تعداد پلاکهای پشتی

۶ ـ تعداد پلاکهای جانبی

۷ ـ تعداد پلاکهای شکمی

۸ ـ قطر چشم (با استفاده از کولیس و برحسب دهم میلی‌متر)

۹ ـ طول پوزه (با استفاده از کولیس و برحسب دهم میلی‌متر)

۱۰ ـ طول سر cm (از نوک پوزه تا انتهای محل شکاف برانشی)

۱۱ ـ ارتفاع سر cm (از سطح پائین تا بلندترین نقطه سر)

۱۲ ـ طول قاعده باله پشتی cm

۱۳ ـ ارتفاع باله پشتی cm

۱۴ ـ تعداد خارهای برانشی

۱۵ ـ طول شعاع آبششی (cm)

۱۶ ـ تعیین سن : حدود ۳ ـ ۲ سانتی‌متر از اولین شعاع سخت باله سینه‌ای برای این منظور برش داده می‌شد.

از آنجائی که ماهی قره‌برون دو رفتار مهاجرتی متفاوت نشان می‌دهد، عمل نمونه‌برداری از ماهیان در دو فصل پائیز و بهار انجام گرفت.

## عملیات آزمایشگاهی :

**جداسازی سرم:**

در بافت خون پس از مدتی، گلبولها لخته شده و سرم از آن جدا می‌گردد مگر در مواردی که خون همولیز شده باشد. در مواردی که سرم خوب جدا نشده بود، نمونه خون به مدت ۵ دقیقه و در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از جداسازی سرم، نمونه دوباره در داخل کلمن قرار داده شد.

**آماده سازی پلیت استات سلولز :**

برای آماده سازی، پلیت استات سلولز به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بافربابیتال قرار گرفت.

**تفکیک پروتئین‌ها :**

پس از انتقال نمونه‌های سرم بر روی ماتریکس استات سلولز، پلیت بر روی تانک تفکیک قرار داده شد و با استفاده از ولتاژ ۱۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه عمل تفکیک صورت گرفت.

**رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری پلیت :**

پس از پایان مرحله تفکیک، پلیت جهت رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پانسیواس قرار داده شد. پس از گذشت این مدت پلیت بطور متوالی در سه مرحله و هر مرحله به مدت ۵

دقیقه در اسید استیک ۵ درصد قرار داده می‌شد تا عمل رنگ‌بری صورت گیرد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه در متانول خالص قرار داده می‌شد تا باندهای بوجود آمده ثابت شوند و سپس به منظور شفافیت بیشتر، پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شفاف کننده قرار گرفت و سرانجام به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۶۰ درجه قرار داده شد تا خشک شود پس از خشک شدن،پلیت کاملاً شفاف دارای باندهای آشکار برای اسکن کردن آماده بود.

**خواندن باندها توسط دستگاه دانسیتومتر :**

عملاً خواندن باند توسط دستگاه دانسیتومتر با طول موج ۵۲۵ نانومتر صورت می‌گرفت. پس از خواندن باندها،الکتروفوروگرام مربوطه ترسیم می‌گردید و توسط دستگاه چاپگر چاپ می‌گردید. در الکتروفوروگرام تعداد باندها و درصد هر کدام از آنها مشخص بوده و آماده تجزیه و تحلیل بودند.

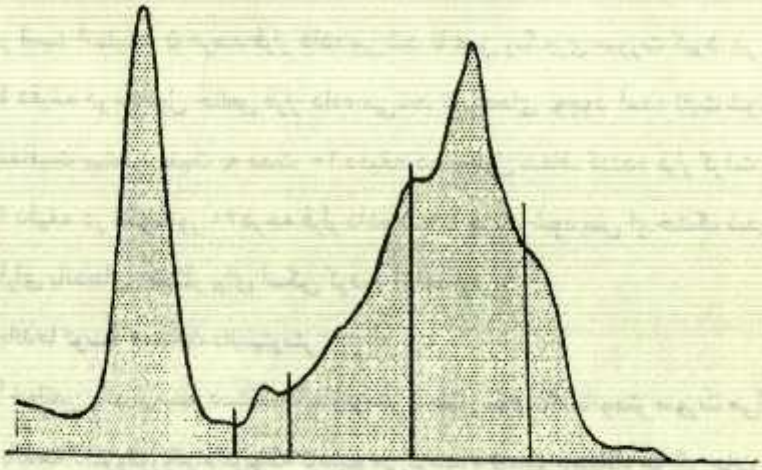
## نتایج

نتایج حاصل از این کار تحقیقاتی در دو قسمت الکتروفورتیک و مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت.

**الف ـ نتایج الکتروفورتیک :**

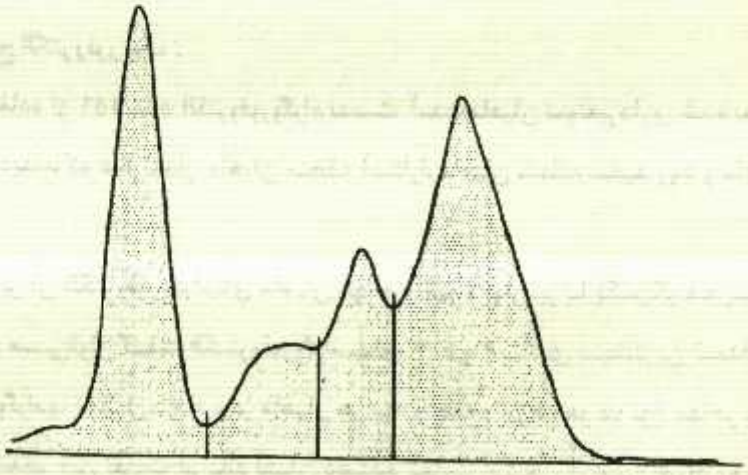
با استفاده از ۱۵۹ عدد الکتروفوروگرام بدست آمده، ماهیان نمونه‌برداری شده به سه منطقه تقسیم گردیدند که عبارتنداز: ماهیان منطقه آستارا، ماهیان منطقه سفید رود و ماهیان منطقه گرگان.

علاوه بر آن الکتروفوروگرامهای ماهیان مهاجر پائیز و بهار نیز با یکدیگر مقایسه شدند. در مجموع می‌توان گفت الکتروفوروگرامهای ۴، ۵ و ۶ باندی بیشترین تعداد را در این الکتروفوروگرامها تشکیل دادند و در ماهیان هر سه منطقه و نیز در هر دو نوع مهاجر بهاره و پائیزه مشاهده شدند. این تفاوت در باند نشان دهنده تفاوت ژنتیکی در بین افراد یک گونه است. الکتروفورگرامها در نمودارهای شماره ۱ و ۲ و ۳ قابل ملاحظه می‌باشد.



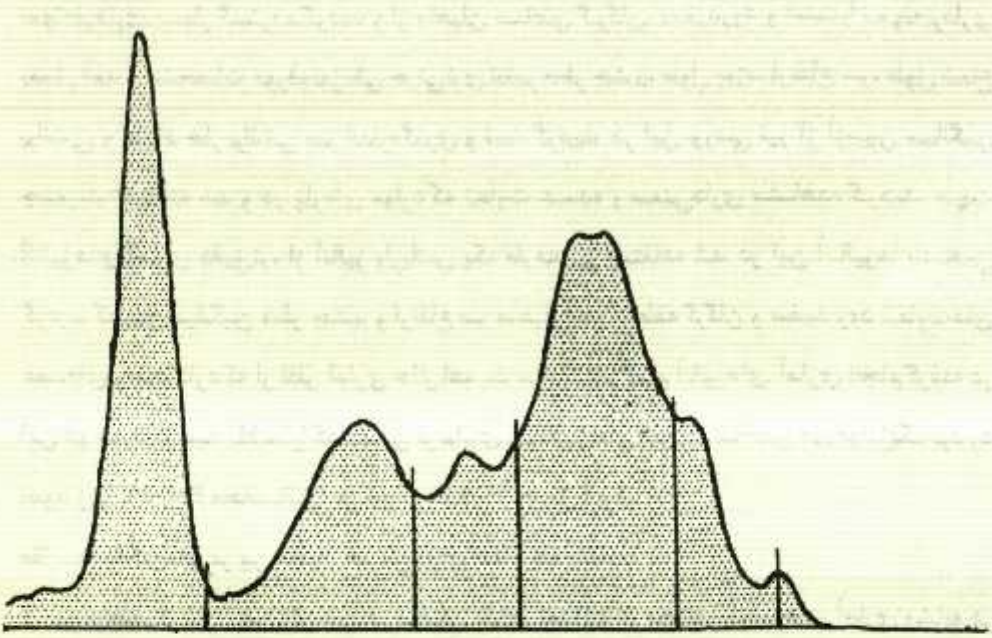
| کسر | درصد | طیف منبع | کسر | درصد | طیف منبع |
|---|---|---|---|---|---|
| آلبومین | ۳۰/۰ | ۳/۲ - ۵/۰ | بتا | ۴۸/۱ | ۰/۶ - ۱/۳ |
| آلفا یک | ۳/۱ | ۰/۱ - ۰/۴ | گاما | ۰/۶ | ۰/۷ - ۱/۵ |
| آلفا دو | ۱۸/۲ | ۰/۶ - ۱/۰ | | | |

نوع ماهی : قره‌برون ماده، مهاجر بهاری  منطقه : ترکمن



| کسر | درصد | کسر | درصد |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۳۱/۶ | ۳ | ۱۳/۴ |
| ۲ | ۱۰/۸ | ۴ | ۴۴/۳ |

نوع ماهی : قره‌برون نر، مهاجر بهاری  منطقه : آستارا



| کسر | درصد | کسر | درصد |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۲۸/۷ | ۴ | ۳۳/۴ |
| ۲ | ۱۶/۹ | ۵ | ۷/۹ |
| ۳ | ۱۱/۰ | ۶ | ۲/۲ |

نوع ماهی : قره‌برون نر، مهاجر بهاری  منطقه : آستارا

**ب ـ نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیک :**

این بررسی شامل دو مرحله بود:

**مقایسه میانگین‌های مهاجران بهار و پائیز :**

برای این کار از آزمون میانگین جمعیت (تست Z) استفاده شد (آیت‌الهی ۱۳۶۳) و هیچگونه تفاوت معنی‌داری در بین مهاجران مشاهده نگردید.

لازم بذکر است در پائیز تعداد نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته محدود بودند و از ۲۷ عدد ماهی تجاوز نمی‌کردند.

**مقایسه میانگین‌های جمعیت ماهیان منطقه گرگان، سفیدرود و آستارا :**

با توجه به نتایج بدست آمده و به منظور بررسی‌های دقیقتر، در فصل بهار دامنه مناطق

نمونه‌برداری بسیار گسترده گردید و از ماهیان مناطق گرگان، سفیدرود و آستارا نمونه‌برداری بعمل آمد و مشخصات مورفولوژیکی جزئی‌تری نظیر قطر چشم، طول پوزه، ارتفاع سر، طول شعاع برانشی و تعداد خار برانشی نیز اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این بررسی نیز از آزمون میانگین جمعیت استفاده شد و در پاره‌ای موارد که تفاوت عمده و معنی‌داری مشاهده گردید، جهت آنالیزهای آماری دقیق‌تر، از آنالیز واریانس یک طرفه نیز استفاده شد. در این آنالیزها مشخص گردید که بین میانگین قطر چشم و ارتفاع سر ماهیان دو منطقه گرگان و سفید رود تفاوت‌های عمده‌ای وجود دارد که از نظر آماری حائز اهمیت می‌باشند. تمام آنالیزهای آماری انجام گرفته در این دو مورد فرضیه H. ما را که مبتنی بر برابری میانگین‌های این دو شاخص مورفولوژیک بود رد نمود زیرا Fc (= F محاسباتی) بزرگتر از Ft (= F جدول) بود.

**مقایسه میانگین‌های در بین ماهیان هم سن دارای تعداد باند متفاوت :**

به منظور از بین بردن اثر سن در ماهیان دارای تعداد باند مختلف، آنالیزهای آماری مشابه در بین ماهیان ۵ و ۶ باند ۱۵ ساله و نیز ماهیان با همین تعداد باند و ۱۶ ساله صورت گرفت که در هیچکدام از این آنالیزها تفاوت عمده‌ای مشاهده نگردید.

## بحث

در گذشته مطالعه نژادها و جمعیت‌های ماهیان براساس پلاک‌گذاری و یا صرفاً اختلافات مورفولوژیک و مورفومتریک انجام می‌گرفت. روش پلاک‌گذاری در محیطهای وسیع نظیر بررسی ماهیان دریا مشکل آفرین است. خواص مورفولوژیک و رشدی نیز متاثر از فاکتورهای ژنتیکی و محیطی می‌باشند. تاثیرات متقابل این دو فاکتور معمولاً تغییرات وسیعی را نشان می‌دهند که در نتیجه تشخیص از طریق مورفولوژیک را مشکل می‌سازد. روش‌های تجزیه الکتروفورتیکی و تعمیم انها در کار تحقیقات ماهی شناسی امکان آنالیز شیمیایی و تجزیه درون گونه‌ای ماهیان، ساختار جمعیتی آنها و تغییرپذیری درون گونه‌ای را فوق‌العاده بسط و گسترش داده است. بروز اختلاف ساختاری و عملیاتی پروتئین‌ها، شرایط واقعی را برای مطالعه در سطح مولکولی را بوجود آورده است.

ما می‌دانیم که پروسه تکامل یک جریان مستمر است. در درون همین حرکت و جریان، پدیده گونه زایی نیز وجود دارد. عوامل بوجود آورنده این پدیده نیز متفاوتند. زمانیکه گونه‌ای بوجود می‌آید در مراحل اولیه تکوین و تشکیل آن، تفاوتهای ژنتیکی چندان مهمی در بین افراد آن دیده نمی‌شود و تشابه ژنتیکی در آن زیاد است. در اثر مرور زمان و تحت تاثیر عوامل مختلف تفاوت ژنتیکی در آنها زیاد می‌شود و فاصله ژنتیکی بوجود می‌آید. این انشعاب در اثر گذشت زمان فاصله‌اش زیادتر می‌شود. بررسی‌های مورفولوژیک همراه با بررسی‌های ژنتیکی می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب جهت بررسی‌های درون گونه‌ای برای مشاهده وجود یا عدم وجود تفاوتها مورد استفاده قرار گیرد.

در این بررسی چنانکه ذکر گردید تفاوت در تعداد باندها وجود داشت و آنالیزهای آماری نیز مشخص کردند که بین میانگین اندازه قطر چشم ماهیان منطقه سفید رود (۲۰/۱۶ میلی‌متر) با میانگین قطر چشم ماهیان منطقه گرگان (۲۲/۴۷ میلی‌متر) و نیز بین میانگین اندازه سر ماهیان منطقه گرگان (۷/۲۵ سانتیمتر) با میانگین اندازه سر ماهیان سفید رود (۹/۱۵ سانتیمتر)، اختلاف مهمی وجود دارد ولی صرفاً با در نظر گرفتن این دو فاکتور در کنار هم نمی‌توان این دو جمعیت را کاملاً از هم تفکیک کرد و این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تر دارد.

بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت الکتروفوروگرامهای تهیه شده از سرم خون ماهیان نمونه‌برداری شده وجود اختلاف در پروتئین‌های محلول سرم خون این ماهیان را نشان داد. ماهیان دارای تعداد ۴، ۵ و یا ۶ باند در همه مناطق دیده شدند.

بررسی‌های آماری و مشاهدات ظاهری حاکی از اختلاف بین ماهیان منطقه گرگان و سفید رود بود که می‌توان آن را دو نژاد جغرافیایی (یا دو جمعیت جغرافیایی) دانست.

## منابع

**تقی آیت‌الهی، سید محمد،** ۱۳۶۳. اصول و روشهای آمار زیستی. مؤسسه انتشارات امیرکبیر

**عادلی، یونس،** ۱۳۷۳. تاسماهی خزر جنوبی بعنوان گونه‌ای مستقل، منعلق به جنس *Acipenser* **لوکیانتکو و.ای ،** اومروف ژ.گ و کاراتایوا ب.ب.، ۱۹۷۴. قره‌برون خزر جنوبی گونه مستقل از جنس

آسیپنسریده. مجله بیولوژی، شماره ۵ (اصل مقاله به زبان روسی)

**Balsano J.S.** and Rasch E.M. 1973. Microspecrophotometric and enzymatic analyses of fish plasma proteins electrophoretically separated in thin polyacrylamid gels, Fish biol. (1974), 6, 51-59

**Basaglia F.** and Marchetti M.G. 1991. Study of the soluble white muscle tissue proteins from fifteen sparidae species, journal of fish biol. 38, 763-772

**Keyvanfar A.**, 1988. A comparative study on the serum and cellular proteins of four species of anadromous sturgeons in the Caspian Sea, ANN.INST. OCEANGR, PARIS, Vol 64, pp: 25-64

**Partington J.D.** and Mils C.M., 1988. An electrophoretic and biometric study of Arctic charr. *Salvelinus alpinus* (L) from the British Lakes J. fifth Biology (1988) 33, 791-814

# Survey on *Acipenser persicus* Populations by use of the Electrophoretic Technique and Morphological Characteristics

**S.A. Parvaneh M.Sc.**
**K. Parivar Ph.D**
**I.F.R.T.O**
**Sturgeon International Research Institute,**
**Rasht, P.O.Box 41635-3464**

## ABSTRACT

For identifying the populations of the *Acipenser persicus* (Persian sturgeon) a survey were done by use of the electrophoretic technique and also morphological characteristics. The matrix was Acetate cellolus. 5ml blood from each gill arch were obtained and separated serum from blood. Separation of proteins were done, using a voltage of 180 volt during 15 minutes. After separating the solution proteins, the bands were stained by ponceau-s. Decolouring of plates was done by Acetic acid 5% during three steps.

Scaning of the plates was done by densitometer with the wave length of 525 nm. Several genetic variations observed in the electrophorograms of samples. It seems that population of some localities can be characterized as a genetically distinguishable unit.

Morophological differences observed between the fish which located in Sephid Rud region and Gorgan region, like the eye diameter and head hight. The mean of eye diameter in Sephid Rud population was 20.16 mm and in Gorgan population 22.47 mm and the mean of head hight was 8.15 cm and 7.25 cm respectivly.