magiran.com

مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP

سید احمد قاسمی[۱] ؛ محمد پورکاظمی[۲] و محمدرضا کلباسی[۳]
aqasemi@email.com

۱ و۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت
صندوق پستی: ۳۴۶۴- ۴۱۶۳۵

۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس نور،
صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

تاریخ ورود: دی ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۴

چکیده

تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) دریای خزر با استفاده از ژنهای دهیدروژناز ۵ و ۶ (NADH5/6) و روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۸۰ عدد ماهی شیپ از سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال در قزاقستان جمع‌آوری گردید. ژن ND5/6 ژنوم میتوکندریایی بوسیله PCR تکثیر و سپس با ۳۹ آنزیم برشگر اندونوکلئاز هضم گردید. از ۳۹ آنزیم پنج آنزیم برشگر *MboI, DraI, HaeIII, Cfr13I, TasI* تنوع چند شکلی از خود نشان دادند. در مجموع بین نمونه‌های بررسی شده ۱۰ ترکیب هاپلوتیپی بدست آمد که از بین هاپلوتیپ‌های شناخته شده هاپلوتیپ AAAAA بیشترین فراوانی (۷۵/۵ درصد) را داشت. دو هاپلوتیپ BBAAA, BABAA حداقل فراوانی (۱/۲ درصد) را نشان دادند و هاپلوتیپ AAAAB با فراوانی (۵ درصد) مختص نمونه‌های رودخانه اورال بوده است. میانگین تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی بترتیب ۰/۵۸۱۶ و ۰/۰۰۷ درصد بدست آمد. میزان تنوع نوکلئوتیدی بدست آمده در این بررسی نسبت به سایر تاسماهیان دریای خزر (تاسماهی ایرانی، روسی و ازون‌برون) بسیار پایین‌تر بوده است که این امر می‌تواند ناشی از کوچک بودن اندازه جمعیتهای این گونه باشد. آنالیز آماری و شبیه سازی Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار نشان داد که توزیع هاپلوتیپ‌ها در بین مناطق مختلف نمونه‌برداری در جنوب دریای خزر اختلاف معنی‌داری ندارد (P=۰/۷۴، X^2=۳۵/۴۸) اما بین جمعیت شیپ رودخانه اورال و حوضه جنوبی دریای خزر اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰، X^2=۱۳۷/۳۵). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که جمعیت ماهی شیپ رودخانه اورال از جمعیت ماهی شیپ در سواحل جنوبی دریای خزر متفاوت است و آنزیم *Cfr13I* یک مارکر مولکولی جهت تمایز این دو جمعیت می‌باشد.

لغات کلیدی: ماهی شیپ، *Acipenser nudiventris*، تنوع ژنتیکی، PCR- RFLP، دریای خزر

magiran.com

مقدمه

ماهی شیپ بعنوان یکی از ماهیان ارزشمند خاویاری دریای خزر که همیشه کمترین فراوانی را در بین سایر گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر داشته و حدوداً ۱ درصد از کل صید ماهیان خاویاری در دریای خزر را شامل می‌شود (Sokalov & Vosilev, 1989). در گذشته دو جمعیت مهاجر جدا از هم در شمال دریای خزر وجود داشته که برای تخمریزی وارد رودخانه‌های اورال و ولگا می‌شدند (Makarov *et al.*, 1991). بنظر می‌رسد تنها جمعیت رودخانه اورال امروزه در دریای خزر باقی مانده است. Avetissov, 1992 معتقد است که ذخایر موجود این گونه در تمام رودخانه‌ها بجز اورال در حال از بین رفتن هستند. ماهی شیپ در دریای سیاه، خزر و آرال وجود دارد و به رودخانه‌های منتهی به آنها وارد می‌شوند و طبق منابع، جمعیت خاصی از این ماهی به رودخانه‌های سفید رود، کورا و آستارا مهاجرت می‌کند (Holcik, 1989). حفاظت و نگهداری از ذخایر ژنتیکی این ماهی از طریق مدیریت ذخایر بسیار مهم می‌باشد که برای مدیریت ذخایر نیاز به اطلاعات ساختار ژنتیکی می‌باشد تا بتوان تنوع ژنتیکی جمعیتها را حفظ کرد. آنالیز RFLP از سال ۱۹۷۸ به طور گسترده‌ای توسط شرکتهای آمریکایی مورد استفاده قرار گرفت (لالوئی، ۱۳۷۹). مطالعات زیادی در زمینه جمعیت تاسماهیان با استفاده از این روش انجام شده که توانسته‌اند جمعیتهای متفاوتی را تفکیک کنند. در بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) در سال ۱۹۸۸، Brown و همکاران با بررسی پلی‌مورفسیم mtDNA در این ماهی در رودخانه کلمبیا و Fraser، تنوع بالایی را برای تاسماهی سفید در این دو منطقه بدست آوردند. Simth و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ساختار ژنتیکی تاسماهی سفید رودخانه Fraser از چهار لوکوس Microsatellite و روش RFLP (D_loop) چهار واحد تکاملی مجزا را در این رودخانه (قسمت ابتدا، میانی، انتهایی و رودخانه Nechako) شناسایی کردند. دو روش بکار رفته نتایج یکسانی را نشان داد. با این تفاوت که مارکر Microsatellite تنوع بیشتری را نشان می‌دهد.

مطالعات اخیر بیشتر بر مبنای Microsatellite می‌باشد اما باید دانست که مطالعات پایه بر مبنای mtDNA انجام پذیرفته است. امروزه در کنار روشهای جدید همچنان روش RFLP مقایسه می‌گردد که می‌توان به مطالعات Wirgian و همکاران (۲۰۰۲)؛ Zhu و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی جمعیتهای تاسماهی اطلس و تاسماهی چینی اشاره کرد. اولین مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی تاسماهیان جنوب دریای خزر در سال ۱۹۹۶ توسط Pourkazemi انجام گرفت. الکتروفورز آلوزایم‌ها و RFLP، DNA میتوکندری برای مطالعه جمعیتهای اوزون‌برون (*A. stellatus*) استفاده گردید. مطالعه جمعیتهای تاسماهی روس (*Acipenser gueldenstaedii*) (Rezvani, 1997 ; Pourkazemi, 1996)، مطالعات ژنتیک مولکولی گونه‌های خاویاری دریای خزر با استفاده از ۲۱ آغازگر تصادفی (Rezvani, 1997)، مطالعه تنوع میتوکندریایی جمعیتهای تاسماهی روسی در جنوب دریای خزر از روش RFLP و ژن ND5/6 (Rezvani, 2000) و مطالعه تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی (عطایی، ۱۳۸۱) مطالعات انجام شده در زمینه تاسماهیان در ایران می‌باشند. اگر چه مطالعات ژنتیک مولکولی بر روی چهار گونه فیل ماهی،

magiran.com

ازون‌برون، تاسماهی ایرانی و روسی انجام شده ولی تا بحال مطالعه ژنتیکی روی جمعیتهای ماهی شیپ در دریای خزر صورت نگرفته است. هدف از تحقیق حاضر تعیین تنوع ژنتیکی و هاپلوتیپی این گونه در مناطق مختلف نمونه‌برداری و شناخت جمعیتهای احتمالی ماهی شیپ در سواحل جنوبی دریای خزر و مقایسه ماهی شیپ جنوب با ماهی شیپ رودخانه اورال می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری از ماهیان شیپ بالغ صید شده در صیدگاههای شیلات در سه استان گیلان(کیاشهر و انزلی)، مازندران (بابلسر و نوشهر)، گلستان و از ماهیان شیپ موجود در مراکز تکثیر شهید مرجانی واقع در ۴۰ کیلومتری گرگان (آق قلا) و شهید بهشتی (واقع در سدسنگر رشت) در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۱ و بهار سال ۱۳۸۲ انجام گرفت. جهت انجام نمونه‌برداری حدود ۲ گرم از بافت نرم باله از انتهای باله دمی و باله پشتی ماهیان شیپ جدا و در الکل اتانول ۹۶ درصد فیکس گردید. در این تحقیق ۸۰ عدد ماهی شیپ شامل ۲۰ نمونه از استان مازندران، ۲۳ نمونه از استان گلستان، ۲۵ نمونه از صیدگاههای استان گیلان، ۸ نمونه از رودخانه سفیدرود و ۴ نمونه از رودخانه اورال کشور قزاقستان (موجود در آزمایشگاه) جمع‌آوری شد.

استخراج DNA ژنومی (کل) با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلیگرم از بافت باله به روش فنل- کلروفرم (Moritz & Hillis, 1993 Cited in Pourkazemi, 1996) تعدیل شده برای ماهیان خاویاری انجام گردید (Pourkazemi, 1996) و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از روشهای اسپکتروفتومتری و الکترفورزی تعیین گردید.

برای ازدیاد قطعه ND5/6 از یک جفت پرایمر با توالی که در مطالعات قبلی برای ازون‌برون و تاسماهی روسی (Pourkazemi, 1996) بکار گرفته شده بود، استفاده شد. که پرایمر Forward (۲۴ نوکلئوتید) و پرایمر Reverse (۲۴ نوکلئوتید) طراحی و توسط شرکت IBM ساخته شد.

ND5- 5 AAT AGT TTA TTC AGT TGG TCT TAC 3

ND6- 5 TAA CAA CGA TGG TTT TTC ATA TCA 3

برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر یک از نمونه‌ها با غلظت موادی شامل ۲۰ نانوگرم DNA، ۲ واحد بین‌المللی از DNA پلیمراز سیناژن (Cinnagen)، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ (سیناژن)، ۲۰۰ میکرومول $dNTP_s$ (Pharmasia)، ۲۰ پیکو مول از هر پرایمر(IBM)، در بافر PCR با غلظت 1X (سیناژن) آماده گردید. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در دستگاه ترموسایکلر (Pharmacia/Thermal Cycler TC341) با برنامه شامل یک واسرشته سازی اولیه (Denaturation) بمدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و در ادامه ۳۰ دور شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه، الحاق (Annealing) در دمای ۵۳ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه، بسط (Extention) بمدت

magiran.com

۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت یک سیکل بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط نهائی برای تکثیر قرار گرفتند.

جهت کنترل کمیت و کیفیت محصول PCR، مقدار ۳ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر لودینگ بافر همراه با مارکر *λDNAHindIII* یا *λDNAHindIII and EcoRI* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه UV محصول PCR مطابق با طول ژن ND5/6 مورد بررسی قرار گرفت.

محصول PCR با اندازه ۲۵۰۰ جفت باز با استفاده از ۳۹ آنزیم برشگر (*AccI, AluI, AvaI, BclI, DdeI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HinfI, HpaII, RsaI, Sau3AI, TaqI, XhoI, HindIII, HinCII, ApaI, AvaII, BamHI, PvuII, HhaI, SamI, NdeI, SalI, KpnI, BglI, BglII, NcoI, Cfr13I, PstI, (DraI, XbaI, BshI, VspI, XopI, FunDII (Bsh1236I), TasI (TspEI), Tru1I (MseI), TaiI (HaeII)* در محلول واکنش زیر بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (بجز برای آنزیمهای *TaqI, BclI, TasI, Tru1I, TaiI,*) انکوباسیون گردید.

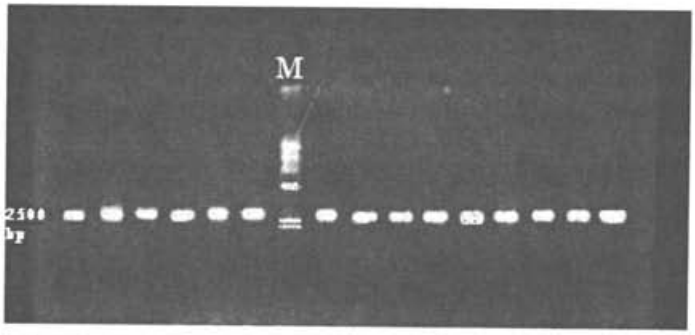
بافر آنزیم برشگر ×۱۰	۲ میکرولیتر
آنزیم برشگر	۱ "
محصول PCR	۳-۵ "
آب مقطر استریل تا حجم نهایی	۲۰ "

محصول هضم شده ژن ND5/6 در روی ژل اکریل آمید ۶ درصد برای مدت ۲/۵ تا ۳ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و در نهایت با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (Pourkazemi, 1996). باندهای بوجود آمده پس از هضم آنزیمی با استفاده از مارکرbp ۱۰۰ اندازه‌گیری شدند و براساس اینکه هر نمونه دارای چه ژنوتیپی بود با استفاده از حروف الفبای بزرگ A, B... و هاپلوتیپ هر نمونه بصورت توالی از این حروف معین گردید. پس از تهیه جدول هاپلوتیپ‌ها، برای آنالیز آماری از نرم‌افزار Reap و برنامه مشابه سازی Monte-Carlo استفاده شد.

نتایج

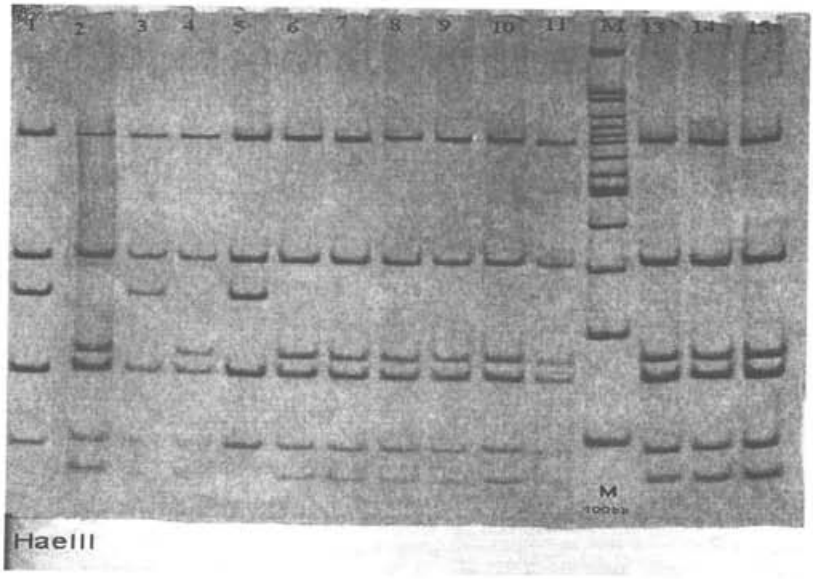
بررسی محصول PCR مربوط به ۸۰ نمونه ماهی شیپ با دو پرایمر ND5 و ND6، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد به همراه مارکرهای *HindIII and EcoRI, HindIII* نشان دهندهٔ تکثیر قطعه واحدی به طول bp ۲۵۰۰ شامل ناحیه $ND\frac{5}{6}$ بر روی mtDNA می باشد (شکل ۱).

magiran.com



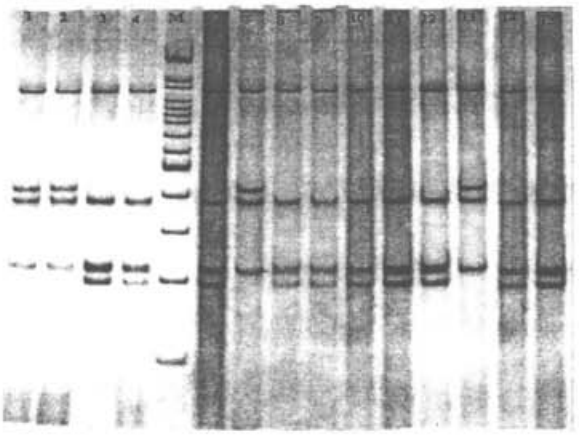
شکل ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده توسط پرایمرهای $\frac{5}{6}$ *ND* (ژل آگارز ۱/۵ درصد)

۳۹ آنزیم برشگر در این تحقیق برای مطالعه تنوع در منطقه $\frac{5}{6}$ *ND* مورد استفاده قرار گرفت. که از بین آنها پنج آنزیم برشگر *Cfr13I* ,*HaeIII* , *MboI* (*Sau3AI*) ,*DraI* ,*TasI* در بین نمونه‌های مناطق مختلف پلی‌مورفیسم را نشان دادند (اشکال ۲ و ۳). تعداد ۹ آنزیم *BshI* ,*BglI* ,*KpnI* ,*NdeI* ,*SamI* ,*BamHI* ,*ApaI* ,*HindIII* ,*EcoRI* فاقد محل برش در منطقه mtDNA ماهی شیپ بودند و ۲۵ آنزیم دیگر در تمامی افراد الگوی منومورفیک را نشان دادند.



شکل ۲: الگوی برشی ژن $\frac{5}{6}$ *ND* mtDNA تاسماهی شیپ با آنزیم *HaeIII*
(ستونهای ۱،۳، و ۵ ژنوتیپ B بقیه ستونهای ژنوتیپ A: مارکر در ستون ۱۲)

magiran.com

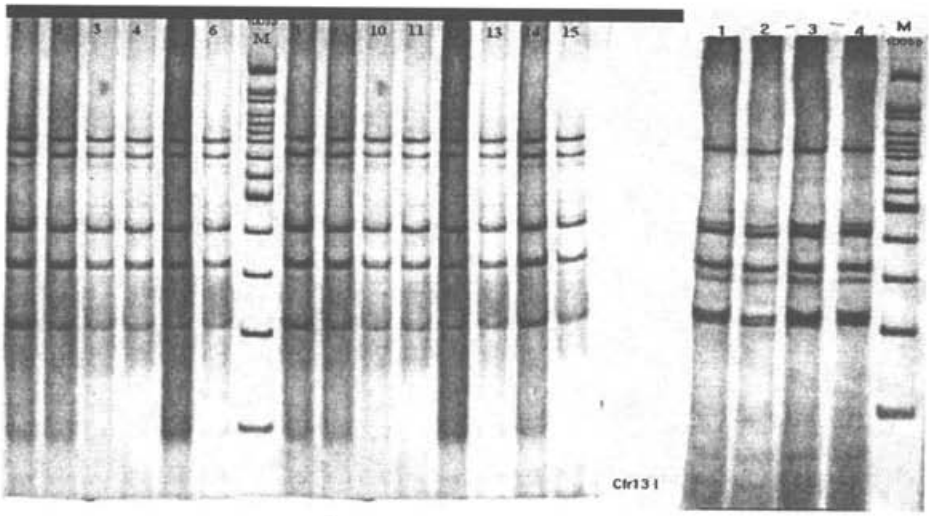


شکل ۳: الگوی برشی ژن $ND\,5/6$ mtDNA تاسماهی شیپ با آنزیم *MboI*
(ستونهای ۱-۲-۷-۱۳ ژنوتیپ B، بقیه ستونها ژنوتیپ A، ستون ۵ مارکر مولکولی می‌باشد)

آنزیم برشگر *DraI* دو ژنوتیپ A, B را تولید کرد، ژنوتیپ A که دارای یک جایگاه برشی بر روی mtDNA ND 5/6 ماهی شیپ بود. که دو قطعه به طولهای ۱۱۳۵ bp و ۱۳۶۵ تولید کرد. ژنوتیپ B فاقد جایگاه برشی برای این آنزیم بود. پدیده هتروپلاسمی (وجود فرمهای متفاوت ژنوم میتوکندریایی در یک فرد) در بعضی از نمونه‌ها فقط با آنزیم برشگر *DraI* مشاهده گردید. تعدادی از افراد ژنوتیپ A دارای هتروپلاسمی مکانی بوده که علاوه بر دارا بودن باندهایی به طول ۱۱۳۵، ۱۳۶۵، دارای باند ۲۵۰۰ bp شبیه به ژنوتیپ B می‌باشند. ۷۵ درصد از نمونه‌های گرگان، ۵۰ درصد نمونه‌های بابلسر، ۴۰ درصد نمونه‌های نوشهر، ۵۳ درصد نمونه‌های کیاشهر، ۴۰ درصد نمونه‌های انزلی و ۶۲ درصد نمونه‌های سفیدرود دارای هتروپلاسمی می‌باشند که بیشترین هتروپلاسمی در نمونه‌های گرگان وجود دارد. شدت باندهای ایجاد شده در نمونه‌های مختلف دارای هتروپلاسمی متفاوت می‌باشد که نشان دهنده درصد متفاوتی از دو نوع mtDNA می‌باشد.

آنزیم برشگر *TasI* دو ژنوتیپ A, B ایجاد کرد، در ژنوتیپ A تعداد ۹ قطعه با طولهای ۷۰۰، ۶۱۰، ۶۱۰، ۳۲۰، ۳۲۰، ۱۷۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۷۰، ۸۰ جفت باز و در ژنوتیپ B تعداد ۱۱ باند با طولهای ۷۰۰، ۵۴۰، ۳۲۰، ۳۲۰، ۱۵۰، ۱۵۰، ۱۵۰ و ۱۰۸ و ۸۰، ۷۰، ۷۰ و ۲۰ ایجاد گردید. ژنوتیپ B دارای دو جایگاه برش جدید نسبت به ژنوتیپ A برای آنزیم برشگر *TasI* می‌باشد. آنزیم برشگر *Cfr13I* دو ژنوتیپ A وB را ایجاد کرد که ژنوتیپ B تنها در نمونه‌های رودخانه اورال مشاهده شد. ژنوتیپ B دارای یک جایگاه برشی جدید نسبت به ژنوتیپ A برای آنزیم برشگر *Cfr13I* می‌باشد (شکل ۴).

magiran.com



شکل۴: الگوی برشی ژن $ND_{5/6}$ mtDNA تاس ماهی شیپ باآنزیم *Cfr13I* . ژل سمت چپ مربوط به نمونه‌های جنوب دریای خزر (ژنوتیپ A) و ژل سمت راست چهار نمونه مربوط به رودخانه اورال (ژنوتیپ B)

با استفاده از آنالیز RFLP محصول تکثیر شده $ND_{5/6}$ میتوکندریائی در مجموع ۱۰ هاپلوتیپ مختلف در بین ۸۰ نمونه ماهی شیپ از مناطق مختلف نمونه گیری مشخص گردید. هاپلوتیپ های AAAAA، BAAAA به ترتیب دارای فراوانی ۵۷/۵٪ و ۱۰٪ رایج ترین هاپلوتیپ ها در ۶ منطقه‌های نمونه‌برداری بودند و دو هاپلوتیپ ABABA و BABAA با فراوانی ۱/۲ درصد بعنوان هاپلوتیپ‌های نادر بودند. تست DSE برای محاسبات مربوط به میزان ارتباطات بین ۱۰ هاپلوتیپ مختلف انجام گرفت. بر طبق این تست (DSE) حداقل اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیت‌های AAABA و ABABA BAABA به میزان ۰/۴۲۳۸ درصد می‌باشد. این اختلاف مربوط به وجود یک جایگاه برشی متفاوت در ژنوتیپهای A با B در دو آنزیم *HaeIII* و *MboI* می‌باشد که با توجه به جایگاه برشی ۴ بازی برای هر دو این آنزیمها اختلاف یکسانی را نشان می‌دهند. حداکثر اختلاف نوکلئوتیدی در بین دو هاپلوتیپ ABABA و BABAA به میزان ۴/۹۱ درصد حاصل از عمل متقابل چهار آنزیم برشگر می‌باشد.

میانگین تنوع نوکلوتیدی و هاپلوتیپی در درون و بین مناطق مختلف نمونه‌گیری (Mean ± SE) محاسبه گردید که حداکثر تنوع هاپلوتیپی در نمونه‌های کیاشهر به میزان ۰/۰۷۸±۰/۸۱ درصد و حداقل تنوع هاپلوتیپی در نمونه‌های اورال به میزان ۰/۰۰ درصد بود. میانگین تنوع هاپلوتیپی محاسبه شده در ۸۰ نمونه آنالیز شده مناطق مختلف ۰/۰۱±۰/۵۸ درصد می‌باشد. میانگین تنوع نوکلئوتیدی در کل نمونه‌ها ۰/۰۰۷ درصد می‌باشد. حداکثر تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های منطقه کیاشهر به میزان ۰/۰۱۴ درصد محاسبه گردید و حداقل تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های منطقه اورال

magiran.com

بدلیل داشتن یک هاپلوتیپ صفر بوده است. محاسبات اختلاف نوکلئوتیدی بین مناطق مختلف نشان می‌دهد که بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی در بین نمونه‌های اورال و کیاشهر (۱/۳۱۵۹ درصد) و کمترین اختلاف نوکلئوتیدی بین نمونه‌های انزلی و سفیدرود (۰/۴۵۳۵ درصد) می‌باشد. تست ناهمگنی جغرافیائی با توجه به فراوانی و ترکیب هاپلوتیپ‌ها بوسیله تست Mante-Carlo (Raff & Bentzen, 1989) با ۱۰۰۰ بار تکرار در بین نمونه‌های مناطق مختلف محاسبه گردید. میزان x^2 برای نمونه‌های مناطق مختلف جنوب نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در توزیع هاپلوتیپ‌ها در بین جمعیتهای مختلف در جنوب دریای خزر وجود ندارد (x^2=۳۵/۴۸ ، P=۰/۷۴۸۰ ± ۰/۰۱۳۷). تست ناهمگنی جغرافیایی بین نمونه‌های اورال و نمونه‌های جنوب اختلاف معنی‌داری را در پراکنش هاپلوتیپ‌ها در بین مناطق اورال و جنوب خزر نشان می‌دهد (x^2=۱۳۷/۳۵ P=۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰).

بحث

تکثیر منطقه $ND5/6$ ژنوم میتوکندریایی ماهی شیپ به وسیله دوپرایمرND5 و ND6 انجام پذیرفت که نتیجه آن قطعه واحدی به طول ۲۵۰۰ bp برای دو ژن $ND5/6$ میتوکندری ماهی شیپ می‌باشد. نتایج بدست آمده در استفاده از این پرایمرها برای تکثیر ژن مورد نظر شبیه نتایج Gross و همکاران (۲۰۰۲) در کپور معمولی، Krieg و همکاران (۲۰۰۰) در گربه ماهی(*Silurus glanis*)، Pourkazemi (۱۹۹۶) در ماهی ازون‌برون است. ولی با نتایج حاصل توسط Rezvani (۱۹۹۷)، در مورد تاسماهی روسی، Triantafyllidis و همکاران (۱۹۹۹) در دو گونه *S. aristotelis* و *S. glanis*، امین‌زاده (۱۳۷۹) در قزل‌آلای رنگین کمان (۲۴۰۰bp) متفاوت می‌باشد. با توجه به نتایج می‌توان اظهار داشت که قطعه تکثیر شده حاصل مربوط به ژن $ND5/6$ می‌باشد و ژن مورد نظر در ماهی شیپ طولی در حد ۲۴۰۰ bp شبیه سایر گونه‌ها دارد.

استفاده از روش مولکولی RFLP بر روی ژن تکثیر شده $ND5/6$ میتوکندریایی برای تعیین تنوع ژنتیکی نشاندهندهٔ سطح پایینی از تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۰۷۵۴) در ماهی شیپ می‌باشد. سطح پایینی از تنوع نوکلئوتیدی در سایر ماهیان نیز گزارش شده است. Krieg و همکاران (۲۰۰۰) تنوع نوکلئوتیدی در *S. glanis* مربوط به مناطق مورد بررسی را بین ۰/۰۰ تا ۰/۰۲۹ بدست آوردند، Triantafyllidis و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی سه منطقه Cytb , $ND5/6$، D-Loop، حداکثر تنوع نوکلئوتیدی در *S. glanis* را ۰/۱۷ درصد گزارش کردند و در مورد *S. aristotelis* این تنوع ۰/۶۶ بود. Pourkazemi (۱۹۹۶) در مطالعه ساختار جمعیت ازون‌برون جنوب خزر تنوع نوکلئوتیدی را (۰/۰۰۹) گزارش کرد. نتایج عطائی (۱۳۸۱) در مطالعه ساختار جمعیتی تاسماهی ایرانی میزان تنوع نوکلئوتیدی بالایی (۰/۰۴۴) را نشان می‌دهد که حدود ۴ برابر تنوع بدست آمده در ماهی شیپ است. Rezvani (۱۹۹۷) تنوع نوکلئوتیدی ژن $ND5/6$ را در تاسماهی روس بالا ذکر کرد و Pourkazemi با بررسی ناحیه D-Loop در این ماهی تنوع نوکلوتیدی را (۰/۰۵) گزارش کرد. میزان پایین تنوع در گونه‌های

magiran.com

دیگر از جمله *A. transmuntanus* ، *A. oxyrinchus* ، *A. fluvenscens* ، *A. odeostoi* و قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus namayeush*) نیز گزارش شده است. به عقیده Chebanov (۱۹۹۸) در تاسماهیان اصولاً تنوع ژنتیکی پایین می‌باشد و علت پایین بودن تنوع ژنتیکی در ماهیان را خونسرد بودن آنها می‌دانند. در موجودات خونسرد بدلیل متابولیسم پایین سرعت تکاملی و تغییر نوکلئوتیدی mtDNA کم است (Beaumant, 1994). علاوه بر این باید دانست که تنوع mtDNA تنها براساس جهش می‌باشد و نو ترکیبی در آن دخالتی ندارد.

اما ماهی شیپ نسبت به سایر تاسماهیان خزر دارای سطح بسیار پایینی از تنوع نوکلئوتیدی (۱/۵ برابر تاسماهی ایرانی و ۱/۲ برابر ازون برون، ۱/۶ برابر تاسماهی روسی) می‌باشد. اندازه جمعیتهای ماهی شیپ در مناطق مختلف اصولاً کوچک است (Sokalov & Vasiler, 1989). در نتیجه با توجه به کوچک بودن اندازه جمعیتهای این گونه اندازه جمعیت مؤثر در این گونه نیز پایین می‌باشد. که دو عامل در کاهش تنوع درون گونه‌ای برای ماهیان محسوب می‌گردد. لذا یکی از عواملی که می تواند تنوع کم در این گونه را توجیه کند اندازه کوچک جمعیت این گونه می باشد. فشار صید از عوامل کاهش دهنده تنوع ژنتیکی در ماهیان می‌باشد (Krieg *et al.*, 2000). با توجه به صید بی‌رویه سالهای اخیر این ماهی در دریای خزر یکی دیگر عوامل کاهش دهندهٔ تنوع درون گونه‌ای در این ماهی می‌تواند فشار صید باشد. اثر فشار صید بر کاهش تنوع در *Salvelinus nmaycush* (Wilson & Herbert, 1996) گزارش شده است. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Reap براساس پراکنش و ترکیب هاپلوتیپ‌ها در مناطق مختلف نمونه‌برداری نشاندهندهٔ میزان تنوع هاپلوتیپی بالا (۰/۵۸۱۶) ولی اختلاف نوکلئوتیدی پایین (۰/۰۱۲۴) بین مناطق مختلف نمونه‌برداری در این گونه می‌باشد. تنوع هاپلوتیپی بالا و عدم اختلاف نوکلئوتید در سایر تاسماهیان از جمله ازون برون (پورکاظمی، ۱۹۹۶) تاسماهی ایرانی (عطایی، ۱۳۸۱)، تاسماهی روسی (Pourkazemi, 1996 ; Rezvani, 1997) و تاسماهی سفید (Simth *et al.*, 2002) نیز گزارش شده است. تنوع هاپلوتیپی بالا ولی اختلاف کم نوکلئوتیدی و پراکنش یکنواخت هاپلوتیپ‌ها در جمعیتهای تاسماهیان (از جمله تاسماهی شیپ) وابسته به نحوهٔ زندگی آنها می‌باشد. تاسماهیان دارای طول عمر بالا هستند (سال ۲۵ <) و دوره طولانی از زندگی خود را در آب شیرین و شور می‌گذارنند. این امر باعث جریان بالای ژنی بین جمعیتهای مختلف می‌گردد. پرش ژنتیکی و تبادل ژنی بعنوان دو عامل اصلی در پراکنش هاپلوتیپ‌ها می‌باشند. از آنجایی که نمونه‌ها از دریا گرفته شده و طی دوره تغذیه جمعیتهای مختلف می‌توانند در کنار هم باشند، بنابراین ممکن است این هاپلوتیپ‌ها از جمعیتهای جدای تولید مثلی که به رودخانه‌های خاص وارد می‌شدند در دوره تغذیه در کنار یکدیگر قرار گرفته باشند. هاپلوتیپ AAAAB که در منطقه اورال است بصورت منومورف و فاقد هر گونه تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی می‌باشد. مشابه نتایج این بررسی، در جمعیت کانادایی تاسماهی اطلس نیز دیده شد. ۴ نمونه آنالیز شده آنها نیز کاملاً منومورف و فاقد پلی مورفیسم بودند و نسبت به نمونه‌های رودخانه‌های امریکا کاملاً متفاوت بودند (Waldman *et al.*, 1998).

magiran.com

طبق آنالیز ناهمگنی جغرافیایی با استفاده از شبیه‌سازی Mante-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار تفاوت معنی‌داری بین جمعیتهای سواحل جنوبی دریا خزر مشاهده نگردید. بعبارت دیگر پراکندگی هاپلوتیپ‌های این گونه در جنوب دریای خزر همگن می‌باشد ($P \geq 0.05$). اما در مقایسه نمونه‌های اورال و جنوب دریای خزر تفاوت معنی‌داری به واسطه وجود یک هاپلوتیپ خاص در منطقه اورال وجود دارد ($X^2=137.35$, $P=0.000$) که می‌توان نتیجه‌گیری نمود ماهی شیپ حوضه جنوب دریای خزر در محدوده آبهای ایران با ذخایر ماهی شیپ در اورال کاملا متفاوت می‌باشد. این نتیجه‌گیری نظر Avetissov که در سال ۱۹۹۲ گزارش کرده بود تنها جمعیت رودخانه اورال در دریای خزر باقی مانده است را رد می‌کند و بیانگر این است که جمعیتهای متفاوتی از شیپ در دریای خزر از جمله جمعیت حوضه جنوبی دریای خزر وجود دارد. آنزیم *Cfr13I* دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت را بین نمونه‌های اورال و جنوب نشان داد که می‌تواند به عنوان مارکر مولکولی جداکننده ماهیان شیپ اورال از ماهی شیپ جنوب دریای خزر باشد.

ماهی شیپ بعنوان یکی از ماهیان در معرض خطر انقراض (IUCN) می‌باشد که طبق گزارشات اخیر بعضی از جمعیتهای آن مانند جمعیت ولگا از بین رفته یا بعضی از جمعیتها مانند جمعیت کورا از سال ۱۹۸۰ تاکنون بشدت کاهش یافته‌اند (Makarov *et al.*, 1991). همچنین جمعیت اورال انقراض یافته است (Bond *et al.*, 1992). در مورد جمعیتهای شیپ در گذشته در جنوب دریای خزر گزارش دقیقی وجود ندارد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشاندهندهٔ وجود یک جمعیت واحد در جنوب دریای خزر می‌باشد. شاید دلیل عدم وجود جمعیتهای متفاوت در جنوب دریای خزر انقراض جمعیتهای خاصی مانند جمعیت ولگا یا کاهش شدید آنها در این منطقه باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات شیلات ایران و بخشی از طرح جامع ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت تاسماهیان دریای خزر و کد ۸۲-۰۰۵-۰۱۲ انجام گرفته است و جا دارد از انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری دکتر دادمان، موسسه تحقیقات شیلات ایران و دانشگاه تربیت مدرس بجهت تامین هزینه‌های مالی و اجرایی این پروژه و همچنین از شیلات انزلی، کیاشهر، مازندران و آشوراده بجهت همکاری در تامین نمونه کمال تشکر را ابراز نمائیم.

منابع

امین‌زاده، س. ، ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهیهای قزل آلای رنگین کمان در قطعه ND5/6 ژنوم میتوکندریایی به روش PCR-RFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس. ۸۵ صفحه.

magiran.com

عطایی، ف. ، ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفید رود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید بهشتی. ۱۵۷صفحه.

لالوئی، ف. ، ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استانهای گیلان و مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیولوژی ماهیان دریا. دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس. ۷۸ صفحه.

Avetissov, K.B. , 1992. The present status on the ship stugeon Acipenser with in its distribution area, *In*: A.P . Ivanov. Reproduction of Acipenserids, salmonids and sameless valuable fish. Vniro, Moscow. pp.3-15

Beaumant, A. R. 1994. Genetic and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall. London. 539P.

Bond, A.R. ; Michin, P.P. and Sager, J. , 1992. Lake Balkhash dwindling, becoming increasingly saline . Post – Soviet Geography. Vol. 33, No. 2, pp.131-134.

Brown, J.R. ; Kowbel, D.J. ; Bechenbach, A.T. and Simth, M.J. , 1988. Mitochondrial DNA polymorphism in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser and Columbia River. Aquaculture International Congress and Exposition Vancouver tread and Convention Center Vancouver. British Columbia. Canada. September.6-9. 57P.

Chebanov, M. , 1998. Conservational sturgeon genetic diversity enhancement and living gene banks. Action - Before - Extinction Harvey, B. ; Ross, C.; Greer, D. ; Carol sfeld, J. (eds) International Development Research Centre IRDC, Ottawa, Canada, 202-505 Fisgard-St World Fisheries Trust. pp.163-173.

Gross, R. ; Kohlmann, K. and Kersten, P. , 2002. PCR-RFLP analysis of mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphism in the European and East Tsiem subspecies of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture. Vol. 204, pp.507-516.

Holcik, J. , 1989. The freshwater fishes of Europe. Vol. I. part II, Acipenseriformes, AULA-Verlag , Wiesbaden. 496P.

IUCN , 1994. Red list Categories. IUCN, Gland, 21P.

Ivanov, V.P. ; Vlasenko, A.D. , 2001. The relict fish of the Caspian Sea. The sturgeon. Fish forming and fishing. Vol. 1, pp.20-21.

Krieg, F. ; Trintafyllidis, A. and Guyomard, R. , 2000. Mitochendrial DNA variation in European population of *Silurus glanis*. Journal of Fish Bio. Vol. 56, pp.713-724.

magiran.com

Makarov, I.A. ; Alekperov, A.P. and Zarbahjat, T.S. , 1991. Present status of sSpawning run of ship sturgeon *Acipenser nudiventris*, in the Kura River. Journal of Ichthyology. Vol. 31, No. 5, pp.17–22.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stock from the South Caspian Sea. Ph.D. thesis School of Biological Sciences, University of Wales, Swan Sea. UK. 258P.

Rezvani, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph.D thesis. School of Biological Sciences, University of Wales, Swan Sea. UK. 196P.

Rezvani, S. , 2000. Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from the southern Caspian Sea using RFLP analysis of the PCR amplified ND5/6 gene region. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 2, No. 1, pp.13-36.

Simth, C.T. ; Nelson, R.J. ; Pollard, S. ; Rubidge, E. ; Mckoy, S.J. ; Rodzen, J. ; May, B. and Koop, B. , 2002. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River. Journal of Appli. Ichthyol. Vol. 18, pp.307-312.

Sokolov, L.I. and Vasilier, V.P. , 1989. *Acipenser nudiventis* lovetsky, *In*: J. Holeik (ed). The fresh water fishes of Europe, Vol. 1, part II, General introduction to fishes. Acipenseriformes, AULA – verlag, wewsbaden . pp.206-226.

Triantafyllidis, A. ; Krieg, F. ; Cottin, C. and Abatzapoulos, T.J. , 2002. Genetic structure and phylogeography of European Catfish (*Silurus glanis*) populations. Molecular Ecology. Vol. 11, pp.1039-1055.

Waldman, J.R. ; Hart, J.T. and Wirgian, I.I. , 1998. Stock composition of NewYork Bight Atlantic sturgeon fishery based on analysis of mitochondrial DNA. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 125, No. 3, pp.364-371.

Wilson, C.C. and Herbert, P.D.N. , 1996. Phylogeographic origins of lake trout (*Salvelinus namaycush*) in Eastern North America. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 53, pp.2764-2775.

Wirgin, I., Waldman, J. R., Rosko, J., Gross, R.C., Rogers, S.G., Stabile, J. 2002. Genetic structure of Atlantic Sturgeon population based on mitochondrial DNA control raregion. Am. Fish. Soc. **129**(2): 476-486

magiran.com

Zhu, B. ; Zkou, F. ; Cao, H. ; Shoo, 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 Aappl. Ichthyol. Vol. 12, pp.301-306.

magiran.com

Comparison of genetic variation of Ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) in the southern Caspian Sea and Ural River using PCR-RFLP

Qasemi A.[1]; Pourkazemi M.[2] and Kalbassi M.R.[3]

aqasemi@email.com

1,2 - Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran

3- Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modarres University, P.O.Box: 356-46414 Noor, Iran

Received: January 2004 Accepted: May 2006

Keyword: Ship sturgeon, *Acipenser nudiventris*, PCR-RFLP, ND5/6 gene, Caspian Sea, Ural River

Abstract

Genetic variation of ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) from the Caspian Sea was investigated using NADH5/6 gene and PCR-RFLP analysis. A total of 80 specimens of the fish were collected from the south Caspian Sea and the Ural River from Kazakhstan. mtDNA ND5/6 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) digested using 39 Endonucleases Restriction Enzyme. Of the 39 enzymes, five showed polymorphism. Totally, ten composite haplotypes among 80 specimens were detected. Haplotype AAAAA showed maximum frequency (57.5%) whereas haplotypes BBAAA and BABAA showed minimum frequency (1.2%). Haplotype AAAAB was recognized specifically in Ural River specimens.

Average haplotype and nucleotide diversity was 0.8516 and 0.007 respectively. Compared to other sturgeon species living in the Caspian Sea, nucleotide diversity of Ship Sturgeon was much lower (0.007). This may be due to smaller population size of this species. Monte-Carol simulation using 1000 interaction did not show any significant differences between haplotype distribution of the fish sampled in the south Caspian Sea (X^2=35.48 , P=0.74). However, we detected a significant difference between haplotype of Ship Sturgeon from Ural River and the south Caspian Sea. We conclude that Ship Sturgeon from Ural River is different from the fish in the south Caspian Sea and suggest *Cfr13I* enzyme as a molecular marker for population differentiation in the Caspian Sea.