وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

ژنتیک مولکولی جمعیت ماهی قره‌برون و ازون‌برون حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از مایکروستلایت

مجری :
محمد پورکاظمی

شماره ثبت
۸۶/۱۲۶۰

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان پروژه / طرح : ژنتیک مولکولی جمعیت قره‌برون و ازون‌برون حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از مایکروستلایت

شماره مصوب : ۸۰۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده گان : محمد پورکاظمی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد پورکاظمی

نام و نام خانوادگی همکاران : مهتاب یارمحمدی- شهروز برادران نویری- محمد حسن زاده- فریدون چکمه‌دوز- سهراب رضوانی

نام و نام خانوادگی مشاور (ان) : -

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۱۳۷۷/۷/۱

مدت اجرا : ۳سال و ۶ ماه

ناشر : مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

شمارگان (تیتراژ) : ۱۵ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۸۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه و هدف ۹
۲- مواد و روشها ۲۳
۳- نتایج ۲۷
۴- بحث ۵۰
۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۵۸
منابع ٦۰
چکیده انگلیسی ٦۵

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURE RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- International Sturgeon Research Institue

Molecular Population Genetic of Persian Sturgeon (*Acipencer persicus)* and Stellate Sturgeon (*Acipencer stellatus)* using Microsatellite markers

Executor :
Mohammad Pourkazemi

86.1260

Ministry of Jihad – e – Agriculture
Agriculture Research and Education Organization
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon Research Institue

---

Title : Molecular Population Genetic of Persian Sturgeon (*Acipencer percicus)* and Stellate Sturgeon (*Acipencer stellatus)* using Microsatellite markers

Approved Number :*802*

Author: *Mohammad Pourkazemi*
Executor *:* *Mohammad Pourkazemi*
Collaborator *:* M. Yarmohammadi; Sh. Baradaran Noveiri; M. Hasanzadeh; F. Chakmehdooz; S. Rezvani
Advisor : -
Location of execution : Guilan
Date of Beginning : 2006
Period of execution : *1year and 3 months*
Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*
Circulation : *15*
Date of publishing : *2007*

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

بسمه تعالی

طرح **ژنتیک مولکولی جمعیت ماهی قره‌برون و ازون‌برون حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از میکروستلایت** با مسئولیت اجرایی **آقای محمد پورکاظمی**[1] در تاریخ **۸۶/۱۰/۲** در کمیته تخصصی شیلات با رتبه **عالی** تأیید شد.

موسسه تحقیقات شیلات ایران

۱- آقای محمد پورکاظمی متولد سال ۱۳۳۶ در شهرستان رامسر دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته ژنتیک مولکولی آبزیان بوده و در حال حاضر در انستیتو تحقیقات بین‌المللی شهید دادمان با عنوان شغلی رئیس انستیتو مشغول به فعالیت می‌باشد.

چکیده جامع پروژه

الف- مقدمه و هدف:

ذخایر شیلاتی اکثر گونه‌های تجاری آبزیان جهان طی دو دهه اخیر روند نزولی بخود گرفته است. کاهش ذخایر دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد که مهمترین آن عبارتند از صید بی‌رویه و بیش از حد مجاز، آلودگی‌ها، تخریب زیستگاههای طبیعی و محلهای تخم‌ریزی، احداث سد و پل، مسدود کردن مسیر مهاجرت برای تخم‌ریزی، کاهش تخم‌ریزی طبیعی و بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی و ... .

دو پارامتر صید بیش از حد مجاز و آلودگی‌ها اثر مستقیم بر کاهش ذخایر دارد، برایال یکی از اثرات مستقیم صید غیرمجاز را می‌توان تغییر در ساختار ژنتیکی آبزیان نام برد زیرا فشار صید و Overfishing آبزیان درشت‌تر را زودتر از چرخه زندگی خارج می‌نماید و یک نوع انتخاب (Selection) برای ماهیان ریزتر باقی می‌گذارد و همین ماهیان ریزتر در آینده بعنوان مولدین جهت تکثیر و ازدیاد نسل مورد استفاده قرار می‌گیرد که خود یک نوع بهگزینی منفی (Negative selection) است. آلودگی‌ها هم میزان عادت‌پذیری یک گونه را نسبت به محیط زیست خود کاهش می‌دهد. از لحاظ مدیریت شیلاتی، بهره‌برداری اصولی و پایدار از ذخایر بویژه ذخایر مشترک آبزیان زمانی امکان‌پذیر است که جمعیت‌های مختلف تشکیل دهنده یک گونه آبزی، نحوه پراکنش و زیست‌شناسی آن کاملاً مشخص باشد و متناسب با فراوانی یا محدودیت آن برنامه مدیریت صید از لحاظ زمان، مکان، ابزار و مقدار صید مشخص و اعمال گردد. یکی از دلایل عمده شناخته شده در کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از اکوسیستم‌های جهان یکسان تلقی نمودن جمعیت‌ها و ذخایر (Stock) تشکیل دهنده یک گونه در پهنه گسترش آبی آن گونه می‌باشد. در بسیاری از موارد علت اصلی این امر بخاطر نادیده گرفتن تغییر در ساختار ژنتیکی آبزیان در اکوسیستم‌های طبیعی است و شاید علت اصلی آن عدم شناخت و درک ژنتیک جمعیت آبزیان توسط اکثر مدیران شیلاتی است (Ovenden *et al.*, 1990). بنابراین یکی از ضروریات اصلی مدیریت علمی ذخایر شناخت ذخایر و جمعیت‌های تشکیل دهنده آن گونه است.

شش گونه از ماهیان خاویاری در دریای خزر و حوضه آبریز آن زندگی می‌کند و بخش عمده خاویار دنیا (۹۰-۸۵ درصد) از این گونه‌ها تولید می‌شود. گونه‌های تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) از گونه‌های اصلی تاسماهیان دریای خزر را تشکیل می‌دهند. تاسماهی ایرانی

عمدتاً در بخش جنوبی دریای خزر و ماهی ازون‌برون بعنوان ذخیره مشترک ۵ کشور حاشیه دریای خزر را تشکیل می‌دهند. در دو دهه اخیر بعلت صید بی‌رویه میزان صید قانونی ماهیان خاویاری دریای خزر از ۲۸۵۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به کمتر از ۱۵۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ و همچنین میزان تولید خاویار از ۳۰۰۰ تن به کمتر از ۱۱۰ تن در سال ۲۰۰۵ رسیده است. با توجه به کاهش ذخایر فوق و با عنایت به اهمیت ماهیان خاویاری بعنوان گونه‌های در خطر انقراض و فسیل زنده با قدمت ۱۵۰ میلیون ساله، یکی از مهمترین اهداف مدیریت شیلاتی پنج کشور حاشیه خزر باید به شناخت جمعیت‌ها و ذخایر و نحوه پراکنش و میزان بیوماس آنها باشد تا با اعمال یک برنامه‌ریزی علمی، ذخایر و جمعیت‌هایی که در خطر انقراض قرار دارند به مقدار کمتری صید و بهره‌برداری شود و در مقابل آن برنامه‌ریزی جدی برای حفاظت و احیاء نسل آنها صورت پذیرد.

تاسماهی ایرانی که تا قبل از سال ۱۹۷۴ بعنوان یک زیرگونه تاسماهی روسی (*A. gueldenstadttii persicus*) تلقی می‌شد از جمعیت‌های مختلفی تشکیل شده است. در گذشته در رودخانه‌های کورا (جمهوری آذربایجان)، ولگا (روسیه فدراتیو)، اورال (جمهوری قزاقستان) و سفیدرود (ایران) مهاجرت و صید می‌گردید. در دو دهه اخیر بعلت صید غیرمجاز، اکثر ذخایر تاسماهی ایرانی در رودخانه‌های سایر کشورهای حاشیه خزر از بین رفته و عمدتاً جمهوری اسلامی ایران سالانه بین ۱۸-۱۵ میلیون عدد بچه ماهی ۵-۳ گرمی از این گونه را از طریق تکثیر مصنوعی تولید و به دریا رهاسازی می‌کند. بنابراین شناخت ساختار ژنتیکی و شناسایی جمعیت‌های احتمالی این گونه از لحاظ مدیریت و بهره‌برداری شیلاتی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

گونه ازون‌برون هم بعنوان یک گونه مشترک در آبهای ۵ کشور حاشیه خزر پراکنش دارد و در گذشته بیش از ۶۰درصد تاسماهیان دریای خزر را تشکیل می‌داد. برخلاف تاسماهی ایرانی، گونه ازون‌برون به ترتیب بیشتر در رودخانه‌های اورال، ولگا، کورا و سفیدرود مهاجرت می‌نماید. بعنوان یک ذخیره مشترک شناسایی جمعیت‌ها و ذخایر این گونه هم از لحاظ مدیریت بهره‌برداری و هم از لحاظ مدیریت حفظ ذخایر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به الحاق تمامی ۲۷ گونه تاسماهیان به ضمایم " کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های در حال انقراض" یا «CITES» و تعیین و توافق بر سهمیه صید و صادرات خاویار بین کشورهای بهره‌برداری کننده از ذخایر مشترک (دریای خزر، دریای سیاه، رودخانه دانوب و آمور) شناسایی وتفکیک نژادها و جمعیت‌های بومی

تاسماهیان در کشور از اولویت خاص برخوردار خواهد بود که در این طرح به آن پرداخته شده است. هدف از این بررسی عبارتنداز :

۱- بررسی ساختار ژنتیک جمعیت دو گونه تاسماهی ایرانی و ازون‌برون و یافتن مارکرهای مولکولی برای تشخیص جمعیت‌های آن

۲- شناسایی و تفکیک جمعیت‌های مختلف هر گونه

۳- محاسبه اختلاف، شباهت و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مختلف

ب – سابقه تحقیق:

ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیت آبزیان از چند دهه پیش آغاز شده است. در اوایل از روش لوسای کدگذاری کننده پروتئین (آلوزایم) مورد استفاده قرار می‌گرفت (Utter et al., 1987) و در اواسط دهه ۱۹۸۰ از mtDNA در گروههای مختلف آبزیان از قبیل آزادماهیان، کپورماهیان، گربه ماهیان، سخت‌پوستان آب شیرین و شور مورد استفاده قرار گرفت (Martin et al., 1982, Karl and Avise 1993, Avise *et al*., 1984, (Ovenden 1990, Allendorf *et al*., 1987, Avise 2004 و اخیراً روش microsatellite برای بررسی ساختار ژنتیک جمعیت آبزیان استفاده می‌شود (Koskiene *et al*., 2002).

در تاسماهیان مطالعات ایمنوژنتیک برای تمایز گونه‌ها و جمعیت‌ها صورت گرفته (Prevaryaukha 1995 Luk'yanenko *et. al*., 1974) و مطالعات بیوشیمیایی با استفاده از روش آلوزایم در مورد ماهی ازون‌برون در دریای خزر انجام شده است. Chikacher (1983) و سپس Rybova and Kutergina در سال ۱۹۹۰ مطالعات بیوشیمیایی بر روی ۹۰۰ نمونه ماهی ازون‌برون بخش شمالی دریای خزر انجام دادند.

Pourkazemi (1996) اولین مطالعات بیوشیمیایی برروش آلوزایم را برروی ماهی ازون‌برون حوضه جنوبی دریای خزر انجام داد و به رغم مشاهده تنوع ژنتیکی و هتروزیگوسیتی اختلاف معنی‌داری در فراوانی اللها و ژنوتیپ‌ها در بین مناطق ۴ گانه نمونه‌برداری مشاهده نکرد. اولین مطالعات مولکولی با استفاده از روش RFLP در مورد ژن ND5/6 میتوکندری توسط Pourkazemi 1996 صورت گرفت. به رغم مشاهده ۹ هاپلوتیپ مختلف در بین نمونه‌های بررسی شده اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق ۴ گانه مشاهده نگردید.

تعداد مطالعات انجام شده پیرامون گونه تاسماهی ایرانی محدودتر می‌باشد. Rostami (1961) دو نژاد بهاره و پائیزه تاسماهی ایرانی در فصل مهاجرت در رودخانه سفیدرود گزارش نمود. Pervaryukha (1995) دو نژاد بهاره و پائیزه تاسماهی ایرانی را در دریای خزر گزارش کرد. اولین مطالعات مولکولی برروی تاسماهی ایرانی توسط Pourkazemi (1996) انجام شد که بخشی از ژن ND5 میتوکندری را کلون و توالی‌یابی نمود و تاسماهیان مختلف دریای خزر از لحاظ فیلوژنی مورد ارزیابی قرار داد.

سپس Rezvani gilkolaei (1997) با استفاده از توالی ND5 به مطالعه نمونه‌های تاسماهی ایرانی در شرق و غرب حوضه جنوبی دریای خزر پرداخت و اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های بررسی شده مشاهده نکرد.

عطایی (۱۳۸۱) با استفاده از ژن ناحیه D-Loop میتوکندری ۹۰ نمونه تاسماهی ایرانی جمع‌آوری شده در غرب گیلان (۳۰ نمونه)، منطقه سفیدرود (۳۰ نمونه) و منطقه بندرترکمن (۳۰ نمونه) با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار داد ولی اختلاف معنی‌داری در فراوانی هاپلوتیپ‌ها مشاهده نکرد. تاکنون هیچگونه تحقیقی در خصوص ساختار جمعیت ماهی ازون‌برون و تاسماهی ایرانی به روش میکروستلایت در دریای خزر صورت نگرفته و این بررسی اولین تحقیق در این زمینه می‌باشد.

ج – اهداف:

این بررسی سه هدف را تعقیب می‌نمود که عبارتنداز:

۱- بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی ایرانی و ماهی ازون‌برون جهت یافتن مارکرهای مولکولی برای تشخیص جمعیت‌های آن

۲- شناسایی و تفکیک جمعیت‌های مختلف هر گونه

۳- محاسبه اختلاف، شباهت و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مختلف

د- روش تحقیق:

جهت بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی ازون‌برون و تاسماهی ایرانی نمونه‌برداری از بافت باله دمی ماهیان بالغ صید شده استفاده گردید. مجموعاً ۱۴۰ نمونه بافت از ماهی ازون‌برون جمع‌آوری گردید که از این تعداد ۳۴ نمونه مربوط به رودخانه سفیدرود و صیدگاههای حاشیه آن، ۲۳ نمونه از صیدگاههای منطقه ساری و بندرترکمن

(جنوب شرقی دریای خزر)، ۳۶ نمونه از رودخانه کورا (جمهوری آذربایجان)، ۲۳ نمونه از رودخانه اورال (جمهوری قزاقستان) و ۱۴ نمونه از رودخانه ولگا (فدراتیو روسیه) جمع‌آوری گردید.

برای بررسی تاسماهی ایرانی ۶۹ نمونه از مناطق مختلف بخش جنوبی دریای خزر جمع‌آوری گردید که از این تعداد، ۲۴ نمونه از منطقه جنوب شرقی، ۲۶ نمونه از جنوب غربی (ناحیه ۱ شیلات) و ۱۹ نمونه از رودخانه سفیدرود و صیدگاههای اطراف که جهت تکثیر مصنوعی به مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید بهشتی منتقل گردیده بود جمع‌آوری شد.

تمامی نمونه‌ها به میزان ۵-۳ گرم از باله دمی ماهی بوده و در الکل اتیلیک ۹۰درصد قرار داده شد و پس از حمل به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، استخراج DNA به روش فنل کلروفورم (اقتباس از Pourkazemi 1996) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مشخص شد و با استفاده از سه جفت پرایمر میکروستلایت(May *et al.*, 1997) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد و سپس با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید الکتروفورز صورت گرفت و با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

باندهای DNA روی ژل شمارش و وزن مولکولی آن اندازه‌گیری و با استفاده از برنامه کامپیوتری Popgene (Version 1.31)، تعداد و فراوانی الل و ژنوتیپ، شاخص تثبیت جمعیت، تعداد لوسای پلی‌مورفیک، شاخص شانون، میزان مهاجرت ژنی (F_{st}, G_{st}) میزان فاصله و شباهت ژنتیکی، تست X^2 و G^2 به روش Monet-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار محاسبه گردید.

ه - یافته‌های تحقیق:

نتایج بررسی نشان داد که پرایمر Afu-۸۶ برای بررسی ژنتیک جمعیت دو گونه تاسماهی ایرانی و ازون‌برون مناسب‌تر بوده و در هر دو گونه در روی ۲ لوسای باندهای پلی‌مورفیک مشاهده و بمیزان ۱۰۰٪ پلی‌مورفیسم برخوردار بودند.

در تاسماهی ایرانی مجموعاً ۳۵ الل در ۲ لوسای (۱۵ الل در لوکوس اول و ۲۰ الل در لوکوس دوم) مشاهده شد و اللهای I و G با فراوانی ۰/۱۵۶۷ بیشترین فراوانی و اللهای A ، C و D هر سه با فراوانی مشابه به میزان ۰/۰۰۷۵ کمترین فراوانی را داشتند. در لوکوس دوم بیشترین فراوانی مربوط به اللهای H و I که بطور یکسان به میزان

۰/۱۱۹۴ و کمترین فراوانی الل مربوط به اللهای S و X بطور یکسان به میزان ۰/۰۲۲۴ بوده است. فراوانی ژنوتیپ‌های GG، HH، II و JJ بین ۸ تا ۵ مورد بیشترین فراوانی را داشتند و ژنوتیپ‌های اختصاصی در هر یک از مناطق نمونه‌برداری دیده شد که در سایر نقاط مشاهده نگردید. میزان مهاجرت ژنی برای تمام لوسای محاسبه گردید بطوریکه میزان F_{is} در لوکوس اول ۰/۴۹۵۱ و برای لوکوس دوم ۰/۰۵۳۸ و میزان F_{it} در لوکوس اول و دوم به ترتیب ۰/۵۱۷۶ و ۰/۰۷۸۵ و میزان F_{st} برای دو لوسای اول و دوم به ترتیب ۰/۰۴۴۵ و ۰/۰۲۶۰ برآورد گردید. همچنین تخمین زده شد که بطور متوسط تعداد ۶/۹ مولد در طی دوران زندگی خود بین مناطق مورد بررسی مهاجرت می‌کنند و در بین آنها مهاجرت ژنی (gene flow) وجود دارد. براساس محاسبات انجام شده به روش UPGMA، تاسماهی ایرانی در بخش جنوبی دریای خزر از سه گروه با منشاء ژنتیکی متفاوت تشکیل یافته و طبق درخت تکاملی رسم شده تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک جمعیت مستقل بوده ولی تاسماهی ایرانی منطقه غرب (ناحیه ۱) و منطقه شرق (بندرترکمن) در گروه جداگانه و مستقلی تفکیک شده‌اند. براساس تست هتروژنی و مقایسه فراوانی الل و ژنوتیپ به روش Monte-Carlo و با ۱۰۰۰ بار تکرار مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد ($P\leq0.05$).

در ماهی ازون‌برون ۳۸ الل در دو لوسای مشاهده گردید که تعداد ۱۴ الل مربوط به لوکوس اول و ۲۴ الل در لوکوس دوم بودند. بیشترین فراوانی الل مربوط به الل G معادل ۰/۱۹۲۹ و سپس اللهای H و F به ترتیب ۰/۱۷۵۰ و ۰/۱۵۳۶ بوده است. در لوکوس دوم الل‌های I، J، با فراوانی ۰/۱۰۳۶ ، ۰/۰۷۱۴ و اللهای H، K، N، F بطور یکسان معادل ۰/۰۶۷۹ و الل G با ۰/۰۶۴۳ بیشترین فراوانی را داشتند. مجموعاً تعداد ۱۰۶ ژنوتیپ در ۲ لوسای مشاهده شد که تعداد ۴۳ ژنوتیپ در لوکوس اول و ۶۳ ژنوتیپ در لوکوس دوم شمارش شد. ژنوتیپ‌های GG (۱۹ مورد)، HH (۱۸ مورد)، FF (۱۵ مورد) و EE (۹ مورد) بیشترین فراوانی را در لوکوس اول و در لوکوس دوم ژنوتیپ‌های MJ (۸ مورد)، JH (۷ مورد)، FD (۱۵ مورد) بیشترین فراوانی را داشتند. همانند تاسماهی ایرانی ژنوتیپ‌های اختصاصی و مشترک بین مناطق نمونه‌برداری در ماهی ازون‌برون هم مشاهده گردید.

میزان F_{is} در لوکوس اول با مقدار F_{is}=۱ و در لوکوس دوم بمیزان F_{is}=۰/۷۹۶۴ بیشترین مقدار را نشان داد و شاخص تثبیت کل در لوکوس اول مساوی با ۰/۵۷۸۴ و در لوکوس دوم معادل ۰/۲۲۰۴ بوده است. و میزان Gene flow یا (N_m) معادل ۹ مولد در بین مناطق بررسی شده بوده است. میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها

محاسبه شد و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده رودخانه سفیدرود با رودخانه ولگا معادل ۰/۴۴۹۰ و کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های ولگا و کورا و به میزان ۰/۲۰۵۹ بوده است.

درخت فیلوژنی رسم شده براساس روش UPGMA نتایج بسیار جالبی نشان داد که در آن ماهی ازون‌برون رودخانه سفیدرود بعنوان یک جمعیت مستقل و نمونه‌های رودخانه کورا و ولگا در یک کلاستر با شباهت ژنتیکی بالا و نمونه‌های رودخانه اورال و جنوب شرقی دریای خزر در کلاستر دیگر قرار گرفتند و بیانگر مهاجرت جمعیت‌های مختلف در مناطق مورد بررسی می‌باشد. همانند تاسماهی ایرانی تست هتروژنی به روش Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار، اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌های مختلف ماهی ازون‌برون دریای خزر نشان داد ($P\leq0.05$).

و- نتیجه گیری:

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که ذخایر تاسماهی ایرانی در بخش جنوبی دریای خزر از گروه و جمعیت‌های مختلف تشکیل یافته است. بطوریکه تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک جمعیت مستقل بوده و تاسماهی ایرانی بخش غربی و شرقی ناحیه جنوبی دریای خزر از شباهت ژنتیکی بالایی برخوردارند. در نتیجه مدیریت شیلاتی برای حفظ ذخایر ارزشمند ماهیان خاویاری باید برنامه مستقلی برای تاسماهی ایرانی جمعیت رودخانه سفیدرود داشته باشد. از آنجائیکه در سالهای اخیر تکثیر طبیعی این گونه در رودخانه سفیدرود به حداقل مقدار ممکن و در حد صفر رسیده است لذا در تکثیر مصنوعی تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود باید تلاش و جدیت خاصی برمبنای اصول ژنتیکی و دستاوردهای این تحقیق صورت پذیرد.

برای ماهی ازون‌برون هم نتایج این بررسی نشان داد که جمعیت ماهی ازون‌برون رودخانه سفید مستقل بوده و جمعیت‌های کورا و ولگا و همچنین جمعیت‌های اورال و جنوب شرقی دریای خزر بیشترین قرابت ژنتیکی را دارند. با توجه به اینکه نمونه‌های بافت باله دمی ماهی ازون‌برون رودخانه ولگا و اورال از داخل رودخانه‌های فوق جمع‌آوری گردیده است، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ماهی ازون‌برون رودخانه ولگا کشور روسیه فدراتیو در سواحل آذربایجان و ماهی ازون‌برون از رودخانه اورال کشور قزاقستان به سواحل ایران مهاجرت و صید می‌گردد. با توجه به این دستاورد مهم از آنجائیکه برای تکثیر مصنوعی ماهی ازون‌برون، مولدین مورد نیاز مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری از نوار ساحلی جنوب دریای خزر صید می‌گردد باید دقت کافی بعمل آید تا

فقط از ازون‌برون‌های نژاد خاص رودخانه‌های ایران (سفیدرود) استفاده گردد تا ذخایر ژنتیکی این گونه در خطر نابودی حفظ و از خطر انقراض جلوگیری گردد. این امر حتی در برنامه‌های مدیریت صید و بهره‌برداری این گونه در سواحل ایرانی باید رعایت و کنترل شود.

علاوه بر موارد فوق با توجه به مطالعات انجام شده قبلی و نتایج این بررسی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که روش میکروستلایت روش بسیار قوی برای تمایز جمعیت‌های مختلف یک گونه بوده و این روش براحتی قادر است جمعیت‌های مختلف یک گونه را در یک اکوسیستم مشترک از همدیگر متمایز نماید.

ن- پیشنهادها

- انجام مطالعات ژنتیک سایر جمعیت آبزیان دریای خزر و همچنین اکوسیستم‌های مختلف آبهای داخلی و جنوب کشور به روش میکروستلایت
- استفاده از مارکرهای ژنتیکی شناسایی شده در این بررسی برای حفاظت ذخایر در خطر انقراض ماهی ازون‌برون و تاسماهی ایرانی نژاد رودخانه سفیدرود
- تکثیر مصنوعی ماهی ازون‌برون و تاسماهی ایرانی نژاد سفیدرود و تشکیل بانک ژنی از طریق تشکیل گله‌های مولد، بانک اسپرم وتدوین برنامه بازسازی ذخایر گونه‌های فوق بر مبنای اصول ژنتیکی
- خودداری از صید مولدین ازون‌برون و تاسماهی ایرانی نژاد رودخانه سفیدرود برای اهداف استحصال خاویار
- انجام مطالعات مشابه بر روی سایر تاسماهیان دریای خزر از قبیل فیلماهی، تاسماهی روسی و ماهی شیپ

۱- مقدمه و هدف

ذخایر اکثریت گونه‌های تجاری آبزیان جهان در طی دو دهه گذشته کاهش یافته و جهت بهره‌برداری پایدار ضرورت دارد با انجام فعالیتهای کاربردی، ذخایر را بنحوی در حالت تعادل قرار داد. بطور کلی سه روش برای جبران و جلوگیری از کاهش ذخایر وجود دارد که عبارتنداز: ۱- تنظیم مقررات و کنترل تلاش صیادی،۲- بازسازی و احیاء محلهای تخمریزی و پرورش نوزاد و لارو ماهیان،۳- بازسازی ذخایر از طریق مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان. میزان بکارگیری هریک از روشهای سه گانه فوق ارتباط مستقیم به سیاستها و مدیریت شیلاتی هر کشور و همچنین وضعیت بیولوژیک و ذخایر هرگونه دارد(Blankenship & Leber 1995).

ذخایر ماهیان خاویاری دریای خزر که تأمین کننده ۹۰٪ خاویار جهان است در و دهه اخیر بشدت کاهش یافته بطوریکه میزان صید قانونی ۵ کشور حاشیه دریای خزر از ۲۸۵۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به کمتر از ۲۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ رسیده است. کاهش بیش از ۹۵ درصد ذخایر ۵ گونه از تاسماهیان دریای خزر طی ۱۶ سال گذشته وضعیت بسیار نگران‌کننده‌ای را از لحاظ حفاظت ذخایر بوجود آورده است.

با توجه به مهاجرت تخمریزی تاسماهیان از دریا به آب شیرین طی ۵۰ سال گذشته بر روی اکثریت رودخانه‌های اصلی منتهی به دریای خزر سدهای بزرگ احداث گردیده و بخش اعظم آب رودخانه جهت مصارف صنعتی، کشاورزی و ... بکار رفته است. این امر خود منتهی به مسدود نمودن مسیر مهاجرت برای تخمریزی طبیعی و گاهی سبب کاهش و تخریب بستر رودخانه‌ها گردیده است. برای جبران کاهش ناشی از عدم تکثیر طبیعی بیش از ۱۳ کارگاه تکثیر در کشورهای شوروی سابق و ۵ مرکز تکثیر در جمهوری اسلامی ایران احداث گردیده و امروزه بیش از ۹۵٪ ذخایر تاسماهیان دریای خزر از طریق تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر تأمین می‌گردد (بارانیکووا، ۱۳۷۷).

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از جمله ماهیان خاویاری است که اکثریت پراکنش آن در جنوب دریای خزر و در محدوده آبهای ایران می‌باشد این گونه در یک دهه گذشته حدود ۲۵درصد خاویار ایران را در بین ۵ گونه از تاسماهیان را تولید می‌کرد. در سالهای اخیر بعلت فشار صید بر روی ذخایر ۴ گونه دیگری در کشورهای تازه به استقلال رسیده شوروی سابق از یکطرف و رهاسازی بیش از ۸۵درصد بچه تاسماهی ایرانی از

سوی شیلات ایران و همچنین مهاجرت بسیار اندک این گونه به آبهای میانی و شمال دریای خزر از طرف دیگر سبب شده است که تاسماهی ایرانی حدود ۵۵ درصد خاویار ایران را در سال ۱۳۸۱ تشکیل دهد.

ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) یکی دیگر از گونه‌های بسیار با ارزش دریای خزر است که در گذشته ۵۵-۵۰٪ خاویار ایران و همچنین سایر کشورهای دریای خزر را تشکیل می‌داد. بعلت فشار صید بیش از حد بر روی این گونه و کاهش شدید تخمریزی طبیعی و همچنین نزول شدید رهاسازی بچه ماهی و همچنین بعلت نارسایی‌های فیزیولوژیک سبب گشته که میزان صید و ذخایر این گونه شدیداً کاهش یافته و سهم خاویار آن در کل خاویار ایران به کمتر از ۲۰٪ تنزیل یابد.

برای حفظ ذخایر تمامی گونه‌های تاسماهیان علی‌الخصوص دو گونه تاسماهی ایرانی و ماهی ازون‌برون اقدامات جدی باید صورت پذیرد و ضمن مبارزه جدی با صید بی‌رویه و غیرقانونی باید برای احیاء محلهای تخمرریزی و همچنین بازسازی ذخایر بر مبنای اصول ژنتیکی اقدام گردد.

یکی از روشهای اصولی برای حفظ ذخایر هریک از گونه‌های تجاری علی‌الخصوص گونه‌های در حال انقراض شناخت جمعیتها و ذخایر (Stock) آنهاست. اگر مدیریت شیلاتی جمعیت و یا ذخایر متعدد متعلق به یک گونه را از همدیگر متمایز ننماید و تمام جمعیت‌های ماهی موجود در یک اکوسیستم آبی را واحد فرض نماید. این امر موجب می‌شود یا از جمعیت‌های ضعیف بیش از حد مجاز برداشت و صید گردد و یا از جمعیت‌های مناسب و یا قوی کمتر از حد قابل برداشت صید گردد. از طرف دیگر در صورت عدم شناخت جمعیتهای خاص و بومی آبزیان که ذخایر مشترک و متعلق به چند کشور سبب می‌گردد تا در تکثیر مصنوعی فراوانی ذخایر ژنی جمعیت یا نژاد متعلق به سایر کشورهای مشترک در همان اکوسیستم بصورت غیرعمد ازیاد یابد حتی اگر افزایش کمی در تعداد رهاسازی بچه ماهیان تحقق پذیرد.

هدف از این بررسی بشرح ذیل می‌باشد:

۱- یافتن مارکرهای مولکولی برای تشخیص جمعیت‌ها در گونه‌های با ارزش اقتصادی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*)

۲- شناسایی و تفکیک جمعیت‌های مختلف هر گونه

۳- محاسبه اختلاف، شباهت و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف

۱-۱- مروری بر منابع

Tautz and Reuz در سال ۱۹۸۴ و Jefferys *et al* در سال ۱۹۸۵ اولین کسانی بودند که به مطالعه و شناخت توالی تکراری نوکلئوتیدها که بصورت تصادفی در تمام ژنوم پراکنده هستند پرداختند. در مراحل اولیه، ابتدا روش اثر انگشت DNAی چند لوکوسی (Multilocus DNA finger print) ابداع شده بود ولی بعلت وجود باندهای بسیار زیاد مشکلات عدیده‌ای در شمارش و چگونگی تجزیه و تحلیل آنها ایجاد می‌نمود (Bentzen *et al*., 1991; Prodohl *et al*., 1994) و بتدریج با تکامل روش فوق که تنوع را بر روی چند لوکوس (لوسای) بر روی یک ژل نشان می‌داد روش جدید microsatellite که تنوع را فقط بر روی یک لوکوس آشکار می‌نمود ابداع گردید (Wright and Bentzen 1994).

تاکنون مطالعات زیادی با استفاده از روش مایکروستلایت بر روی آبزیان صورت گرفته است. اولین مطالعه توسط Nielsen *et al* (1994) در مورد قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفت و مطالعات مشابه‌ای بر روی قزل‌آلای رنگین کمان در دریاچه اونتاریو انجام گرفت O`Connell *et al* (1996) ساختار جمعیت ماهی آزاد آتلانتیک توسط McConnell *et al* (1995) بررسی شد و نتایج مطالعه حاکی از تنوع ژنتیکی بسیار بالا و همچنین اختلاف در فراوانی الل‌ها بوده است. با توجه به نتایج مطلوب‌تر روش مایکروستلایت در مقایسه با روش آلوزایم و mtDNA، بتدریج مطالعات بر روی ساختار جمعیت انواع گونه‌ها از قبیل ماهی روغن آتلانتیک (*Gadus morhua*)، ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) ، قزل‌آلای رنگین کمان(*O. mykiss*) ، قزل‌آلای قهوه‌ای (*S. trutta*) ، شگ‌ماهیان اقیانونس اطلس (*Clupea harengus*) و قزل‌آلای جویباری (*Slavelinus fontinalis*) صورت گرفت (O` Connell and Wright 1997).

علاوه بر کاربردهای مایکروستلایت برای ساختار جمعیت، ازاین روش برای مطالعه نقشه ژنی بر روی دو گونه از تیلاپیا مورد استفاده قرار گرفته است (McConnell *et al*., 2000).

تاکنون مطالعات زیادی با استفاده از روش مایکروستلایت بر روی آبزیان صورت گرفته است. اولین مطالعه توسط Nielsen *et al*., (1994) بر روی قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفت و مطالعات مشابهی پیرامون قزل‌آلای رنگین کمان در دریاچه اونتاریو انجام گرفت O` Connell *et al* (1996) ساختار جمعیت ماهی آزاد

آتلانتیک توسط McConnell *et al*., (1995) مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج بررسی حاکی از تنوع ژنتایکی بسیار بالا و همچنین اختلاف در فراوانی آلل بوده است.

با توجه به نتایج مطلوب تر روش مایکروستلایت در مقایسه با روش آلوزایم و mtDNA، مطالعات بر روی ساختار جمعیت انواع گونه‌ها از قبیل ماهی روغن آتلانتیک (*Gadus morhua*)، ماهی آزاد آتلانتیک (*Salma salar*) ، قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorynchus mykiss*) ، قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salma trutta*)، شگ‌ماهیان اقیانونس اطلس (*Clupea harengus*) و قزل‌آلای جویباری (*Slavelinus fontinalis*) صورت گرفت (O` Connell and Wright 1997).

علاوه بر کاربردهای مایکروستلایت برای ساختار جمعیت، ازاین روش برای مطالعه نقشه ژنی (Genome Mapping) و همچنین آنالیز خویشاوندی و والدینی (Parentage and kinship analysis) استفاده می‌گردد (O` Connell and *et al*., 1997).

اولین بار مطالعات مایکروستلایت برروی ماهیان خاویاری توسط May *et al*., 1996 انجام گرفت. وی ابتدا بر روی تاسماهی دریاچه‌ای *A. fulvescens* و سپس بر روی ۶ گونه از تاسماهیان و دو گونه از پاروپوزه ماهیان آمریکای شمالی مطالعات مقایسه‌ای انجام داد.

براساس مطالعه فوق یازده motif از مایکروستلایت ۳ و ۴ تایی در تاسماهی دریاچه‌ای شناسایی شد و سپس بر روی ۸ گونه دیگر از تاسماهی شکلان Acipenseriformes آزمایش گردید. در طی این بررسی ۸ لوسای بطور یکنواخت در ۸ گونه مشاهده شد و ۳ لوسای فقط در سه گونه گزارش گردید. از ۸ لوسای بررسی شده در ۸ گونه یک لوکوس بصورت مونومورف و بقیه لوسای در۳ تا هر ۸ گونه بصورت پلی‌مورفیک بودند. بررسی فوق مارکرهای ابداع شده را روش مناسبی برای شناخت جمعیت‌ها و ذخایر تاسماهیان آمریکای شمالی اعلام نمود.

تکامل ستلایت DNA در ژنوم ۱۳ گونه از تاسماهیان توسط Robles *et al*., 2004 مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی خصوصیات توالی تکراری DNA تاسماهیان مورد ارزیابی قرار گرفت بطوریکه در حد بسیار بالائی از شباهت (عدم ایجاد موتاسیون در طی دوران تکاملی) در توالی DNA سیزده گونه مشاهده شد. براساس نتایج کسب شده معین گردید که قدمت تکاملی توالی DNA مطالعه شده به ۱۰۰ میلیون سال پیش بر می‌گردد و نتیجه‌گیری شد که این توالی یکی از قدیمی‌ترین ستلایت DNA مطالعه شده در بین موجودات است. یافته دیگر

مطالعه فوق این است که بیشتر ستلایت DNA بطور اختصاصی و بر حسب گونه (Species-Specefic) بوده و یا در چند گونه نزدیک به هم بطور یکسان وجود دارد. ولی در این بررسی که توالی DNA ۲ گروه از ستلایت تاسماهیان که از لحاظ طول، توالی DNA و اجزاء نوکلئوتید با همدیگر متفاوت بودند وقتی مورد مقایسه قرار گرفتند مشخص شد که بر خلاف ستلایت سایر موجودات زنده، درجه بسیار بالایی از حفاظت توالی DNA (Preservation) و میزان بسیار ناچیزی از تغییرات توالی DNA با سرعت اندک تغییرپذیری در تاسماهیان مشاهده شد.

تنوع ژنتیکی مولدین تخم‌ریز تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) با استفاده از ۴ مایکروستلایت مورد بررسی قرار گرفت (Zhao *et al*., 2005). در طی ۳ سال مجموعاً ۶۰ عدد مولد مهاجر به رودخانه یانگ‌تسه نمونه‌برداری شد و با استفاده از ۴ مایکروستلایت مجموعاً ۲۸ الل مشاهده شد. تعداد الل در هر لوکوس ۱۵-۴ عدد متفاوت بود و متوسط تعداد الل در هر لوکوس ۷ عدد شمارش گردید. تعداد ژنوتیپ در هر لوکوس بین ۴۱-۶ عدد متفاوت بود. میزان تنوع ژنتیکی ۴ لوسای مایکروستلایت از ۰/۶۷-۰/۳۴ متفاوت بوده و میزان متوسط آن ۰/۵۴ بود. میزان انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در ۴ مایکروستلایت بیشتر بدلیل الل صفر (null alleles) بود. میزان متوسط الل در هر لوکوس و متوسط هتروزیگوسیتی در این ماهیان از میزان متوسط شمارش شده در ماهیان رودکوچ دیگر کمتر بوده است. براساس محاسبات آماری و درخت تکاملی رسم شده تمایز و تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده مشاهده نگردید. عدم وجود تفاوت ژنتیکی (heterogeneity) در بین نمونه‌های متعلق به سالهای مختلف نمونه‌برداری به ساختار سنی پیچیده تاسماهی چینی (برای ماهیان مولد نر ۲۷-۸ سال و برای مولد ماده ۳۵-۱۲ سال) مرتبط بوده که با فرضیه پائین بودن تنوع ژنتیکی حیوانات با طول عمر بالا منطبق می‌باشد (Zhao *et al*., 2005).

تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی تاسماهیان دریای خزر با استفاده از روش مایکروستلایت گزارش نشده و این اولین بررسی بر روی ۲ گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر (تاسماهی ایرانی و ازون‌برون) می‌باشد.

۲-۱- سوابق مطالعه در مورد دو گونه ازون‌برون و تاسماهی ایرانی

از مجموع ۲۷ گونه از تاسماهیان جهان، تعداد کثیری به طور جدی در معرض خطر انقراض می‌باشند این تعداد شش گونه فیلماهی(*Huso huso*)، تاسماهی روس(*Acipenser guldenstaedti*)، شیپ(*A. nudiventris*) ، ازون‌برون

(*A.stellatus*) و استرلیاد (*A. ruthenus*) بطور مشخص در دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن زیست می‌کنند که تأمین کننده بیش از ۹۰درصد خاویار جهان می‌باشد. استفاده اصولی و پایدار از این ذخایر ارزشمند زیستی به خصوص در دریای خزر که بصورت مشترک توسط کشورهای حاشیه آن مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد در درجه اول نیازمند شناخت کامل از ذخایر و جمعیت‌های موجود این ماهیان می‌باشد.

این آگاهی می‌تواند راهگشای برنامه‌ریزی برای مسئولین ذیربط و کلیه عوامل بهره‌بردار در جهت کمک به حفظ ذخایر موجود، کاهش فشار صید، رهاسازی اصولی بچه ماهیان تکثیر شده در مراکز مربوطه و گسترش فعالیتهای تکثیر و پرورش مصنوعی تاسماهیان در دریای خزر باشد.

برای شناسایی جمعیت‌های یک گونه در یک اکوسیستم (از جمله تاسماهیان دریای خزر) نیاز به مجموعه‌ای از فعالیتهای صحرایی (نمونه‌برداری) و آزمایشگاهی (بیوشیمیایی، ژنتیکی) است که هزینه‌های بالا و همچنین زمان طولانی برای اثبات آن نیاز است. بعلاوه مطالعه گونه‌هایی مثل تاسماهیان که در محدوده آبی چند کشور (حاشیه دریای خزر) پراکنش دارند. همکاری منطقه‌ای را برای بررسی جامع از لحاظ فراوانی و پراکنش می‌طلبد. از طرف دیگر علاوه بر بررسی‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی، خصوصیات زیستی شامل زمان و مکان مهاجرت (برای تغذیه و تخمریزی)، زیستگاههای مورد استفاده محلهای زمستان گذرانی و موارد دیگر باید مورد بررسی قرار گیرد.

هرگونه از ماهیان خاویاری می‌تواند جمعیتهای مختلفی داشته باشد که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های مختلف حاشیه دریای خزر مهاجرت می‌کنند و حتی در رودخانه‌های بزرگ امکان وجود چند جمعیت از یک گونه (زودکوچ، دیرکوچ از نژادهای بهاره و پائیزه) وجود دارد که از لحاظ تکاملی و ژنتیکی متعلق به همان رودخانه خاص بوده و طی میلیون‌ها سال در آن سازش یافته است.

تاکنون اختلافات بیولوژیک، مورفولوژیک، ایمنولوژیک، بیوشیمیایی، ... زیادی در بین جمعیت‌های مختلف ماهیان خاویاری مشاهده شد و مطالعات ژنتیکی و مولکلی بر مبنای DNA هم انجام شده است. مهمترین نتایج بدست آمده در مورد دو گونه ازون‌برون و تاسماهی ایرانی به شرح ذیل می‌باشد:

۱-۲-۱- ازون‌برون (*A. stellatus*)

Lovetsky (1834) معتقد بودند، جمعیت ماهی ازون‌برون دریای آزوف را باید به علت نسبت زیاد پوزه به طول بدن، تحت عنوان زیرگونه *A. stellatus* donensis نام برد. در حالیکه سایر محققین طی سالهای بعد، با نشان دادن نسبت‌های مشابهی در ازون‌برون‌های سایر مناطق این مورد را رد کردند (Holcik. 1989).

نسبت طول سر به طول بدن، طول پوزه و خصوصیات باله‌های پشتی و مخرجی در این ماهی را که توسط Chugunov & Chugunova (1964) بررسی شده بود را اساس محکمی برای جداسازی و دسته‌بندی این ماهی نمی‌داند زیرا معتقد است که این خصوصیات در طول دوره‌های مختلف زندگی این ماهی، در مراحل مختلف رشد و شرایط تغذیه‌ای متفاوت می‌توانند بسیار متغییر باشند (Holcik, 1989).

Berg (1933) معتقد به وجود دو فرم شمالی و و جنوبی از ماهی در دریای خزر می‌باشد که از لحاظ مورفولوژی شبیه یکدیگر هستند، اما از نظر بیولوژی، زمان تخمریزی، زمان رسیدگی جنسی، سرعت رشد و هماوری با یکدیگر تفاوت دارند (Berg, 1933).

Borzenko نیز طی سالهای ۱۹۴۲ و ۱۹۶۴ به وجود دو فرم مختلف شمالی و جنوبی از این ماهی در دریای خزر معتقد بود که از نظر رشد و هماوری با یکدیگر تفاوت داشته و از لحاظ ژنتیکی نیز از یکدیگر قابل تشخیص هستند (Pourkazemi, 1996).

همچنین مهاجرت مولدین ازون‌برون بهاره و پائیزه به اکثر رودخانه‌های منتهی به دریای خزر گزارش نشده است (Nikol`skii, 1971). با بررسی‌های ترکیب آنتی‌ژن در سالهای اخیر، مشخص گردید که ازون‌برون دریای خزر دارای سه جمعیت ازون‌برون ولگا، ازون‌برون اورال و ازون‌برون کورا می‌باشد (پروایوخا، ۱۳۷۴). این جمعیت‌ها تفاوت‌هایی با همدیگر دارند. بطور مثال در ازون‌برون ولگا، طول سر، ارتفاع سر، طول قاعده باله پشتی، طول قاعده باله مخرجی، ارتفاع باله مخرجی، کمترین ارتفاع بدن، پهنای پوزه، قطر چشم، فاصله سبیلک‌ها تا دهان، عرض دهان، تعداد صفحات استخوانی پهلویی و تعداد شعاع‌های باله پشتی بیشتر از ازون‌برون اورال می‌باشد (Borzenko, 1942). مسئله دیگر این که هر دو جمعیت نام برده، دارای نژادهای بهاره و پائیزه هستند و در اکثر رودخانه‌های روسیه هر دو نژاد دیده می‌شوند. در این مورد نیز سه گروه بیولوژیک مجزا (اوایل بهاره، اواخر بهاره و پائیزه) تعریف شده است و برای حفظ آنها باید مولدین هر گروه بطور مجزا انتخاب شده و تکثیر شوند.

در سال ۱۹۹۶، Pourkazemi با مطالعه مولکولی ازون‌برون با استفاده از ژنهای mtDNA ND5/6, D-Loop وجود تنوع ژنتیکی بالا در ماهی ازون‌برون و وجود هتروپلاسمی‌ها در ۵ گونه تاسماهی دریای خزر را گزارش نمود.

۲-۲-۱- تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*)

برای نخستین بار Marti, 1940 نزدیکی خصوصیات تاسماهی سواحل دریای سیاه را با تاسماهی ایران در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه کورا اعلام کرد. در سالهای اخیر Artyukhin & Zarkura (1986) مشخص نمودند که *A. guldenstaedti* واریته Colchica بخش شرقی دریای سیاه، مجموعه‌ای از خصوصیات مورفولوژیک عمومی و اکولوژیک *A.persicus* را نیز دارد. این محققین معتقد بودند که جمعیت دریای سیاه را باید تحت عنوان زیر گونه *A. persicus* colchicus نام برد. براین اساس طبقه بندی خاصی به شرح ذیل ارائه شد (Holcik, 1989):

۱- (۲). میانگین طول پوزه ۵/۶ درصد طول کل بدن، پهنای پوزه در محل دهان ۳۷درصد طول پشت چشمی اپرکولوم سر، رنگ بدن در پشت خاکستری و آبی تیره، رنگ سر و طرفین بدن در زیر ردیف پلاک‌های جانبی بسیار روشن‌تر از قسمت پشت، ردیف پلاک‌های پشتی عمدتاً در منطقه پشتی بدن.

(تاسماهی ایرانی دریای خزر) *A.persicus* Borodin, 1897

۲- (۱). میانگین طول پوزه ۶/۹درصد طول بدن، پهنای پوزه در محل دهان ۳۰درصد طول پشت چشمی اپرکولوم سر، رنگ پشت بدن از آبی تیره تا سیاه، تفاوت رنگ سر و طرفین بدن در زیر ردیف پلاک‌های جانبی با رنگ پشتی بدن محسوس نیست. ردیف پلاکهای جانبی علاوه بر منطقه پشتی در زیر محور مرکزی نیز قرار دارند.

(تاسماهی شرق دریای سیاه) *A. persicus* Colchinus Marti, 1940

هرچند که در هر منطقه دریای خزر و رودخانه ولگا نمونه‌هایی دیده شده‌اند که خصوصیات بینابینی *A.persicus* و *A.guldenstaedti* را داشته و بنظر می‌رسد که باید هیبریداسیون بین این دو گونه باشند (Holcik, 1989).

Berg درسال‌های ۱۹۳۲-۱۹۱۱ معتقد بود که زیرگونه تعریف شده توسط Borodin، همان تاسماهی روسی است که تنها در رنگ بدن با یکدیگر تفاوت دارند. اما پس از مطالعات زیاد در سال ۱۹۳۴ اعلام کرد که این گونه، یک زیرگونه مستقل از تاسماهی روسی می‌باشد و این طبقه‌بندی تا سالها مورد تأیید بود. در سال ۱۹۷۷، مطالعات ایمونوالکتروفورز نشان داد که ترکیب آنتی‌ژن سرم تاسماهی روس با تاسماهی ایرانی به طول کامل در تعداد و نوع با

یکدیگر تفاوت دارند. تفاوت‌های مورفولوژیک یا اکولوژیک و ایمونولوژیک بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی روس و همچنین عدم وجود جمعیت‌های بینابینی بین تاسماهیان ولگا سفیدرود و جدایی تولیدمثلی حتی در زمان تخمریزی در داخل یک رودخانه نظریه Borodin را مبنی بر مجزا بودن این دو تاسماهی از یکدیگر ثابت می‌کند (Artyukin, 1979, 1983; Luk`yaneko *et al*., 1974).

با بررسی‌های انجام شده (پرواریوخا، ۱۳۷۴) مشخص گردید که تاسماهی ایران نیز دارای دو نژاد بهاره و پائیزه می‌باشد. بطوریکه در سرم خون نژاد بهاره، ۲ آنتی ژن مشاهده می‌شود که با نژاد پائیزه متفاوت است. شباهت‌های ظاهری این نژادها، به قدری زیاد است که حتی صیادان با سابقه نیز در تشخیص آنها دچار می‌شوند. وجود این دو نژاد نخستین بار توسط رستمی از مولدین مهاجر به سفیدرود گزارش گردید (Rostami, 1961). ذخایر اصلی تاسماهی ایران از جنوب دریای خزر تا قسمت‌های شمالی آن کاهش می‌یابد (آرتوخین، ۱۹۸۳) بطوریکه قسمت اعظم ذخایر آن در بخش جنوبی و مقدار کمتری در بخش میانی خزر دیده می‌شود.

مطالعات اندکی در تفکیک دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی طی سالهای گذشته صورت گرفت. کیوانفر در سال (۱۹۸۷) با استفاده از روش الکتروفوکوسینگ و در pH ۳/۵ تا ۱۰ با استخراج پروتئین‌های دانه‌های خاویار موفق شد که از لحاظ بیوشیمیایی دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی را از همدیگر تفکیک نماید. نصری چاری (۱۳۷۲) با بررسی ۲۶ پارامتر مورفومتریک و مریستیک دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی در ۲۲ پارامتر اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) در مقایسه دو گونه فوق مشاهده نمود.

براساس مطالعات اولیه انجام شده در توالی DNA ناحیه D-Loop میتوکندری دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی مشخص گردید که دو گونه فوق حدود ۱ میلیون سال پیش از همدیگر تفکیک شده‌اند (Pourkazemi, 1996, Pourkazemi *et al*., 2000).

Rezvani Gilkolaei در سال ۱۹۹۷ توالی DNA هسته "تاسماهی ایرانی" در شرق و غرب سواحل جنوبی دریای خزر را مورد بررسی قرار داد و اختلاف معنی‌داری در فراوانی اللها مشاهده نکرد.

قرائی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) و ۵۵ آغازگر دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی را مورد مطالعه قرار داد. نوزده آغازگر بر روی ژنوم تاسماهی ایرانی و روسی محلهای پهلوگیری (annealing) نداشتند و هیچگونه باندی ظاهر نگردید و ۳۶ آغازگر نوار باند DNA بر روی ژل پلی‌آکریلامید نشان

دادند که از بین آنها سه آغازگر یک شکل (monomorphic) و ۳۳ آغاز پلی‌مورفیک بودند که در مجموع ۳۴۱ نوار DNA ظاهر گردید. محاسبات آماری نشان داد که دو گونه بطور متوسط بمیزان ۷۰درصد تفاوت ژنتیکی دارند و از لحاظ مولکولی اثبات گردید که دو گونه فوق مستقل از یکدیگر هستند.

۳-۱- مطالعات نظری

روشهای متعددی برای مطالعه ساختار ژنتیکی ذخایر و جمعیت انواع آبزیان وجود دارد که به اختصار می‌توان از روشهای اکولوژیکی و علامتگذاری، ارزیابی صفات فیزیولوژیکی و رفتاری، مورفولوژیکی، مریستیکی، سیتوژنتیک، ایمینوژنتیک، گروههای خونی و تکنیکهای مرتبط با ژنتیک مولکولی نام برد (Ihssen *et al*., 1981).

در دهه گذشته طی مطالعات متعددی نقاط قوت و ضعف هریک از روش دقیقاً مشخص گردید و از سوی دیگر بعلت ابداع روشهای نوین و با توانایی بالا در زمینه‌های پروتئین، اسید نوکلئوئیک و همچنین DNAی میتوکندری بتدریج روشهای متداول گذشته جای خود را به روشهای جدید مولکولی دادند. کشف پلی‌مورفیسم آلوزایم در بسیاری از جمعیت‌های طبیعی آبزیان اطلاعات بسیار جالب و کاربردی برای شناخت ذخایر، نحوه مهاجرت گونه‌ها، گروههای تولیدمثلی و ترکیب و نحوه بازگشت ماهیان از محلهای رهاسازی در اختیار دانش‌پژوهان قرار داد (Allendorof *et al*., 1987).

استفاده از الکتروفورز پروتئینی (آنزیمها) نیاز به بافت تازه و با کیفیت مناسب از اندامهای مختلف بدن شامل کبد، کلیه، چشم، ماهیچه، قلب و ... دارد و همچنین ماهی حتماً برای نمونه‌برداری باید کشته می‌شد و از سوی دیگر روش مطالعه پروتئین یک روش غیرمستقیم بوده و بعلت ضعف تکنیک فقط حداکثر ۳۰درصد تنوع ژنتیکی آشکار نماید (Gauldie 1988, 1991).

با رشد سریع ژنتیک مولکولی و ابداع روشهای نوین مبتنی بر DNA تکنیکهای متنوع دیگری برای مطالعه ساختار ژنتیک جمعیت آبزیان ابداع گردید. علی‌الخصوص پس از کشف دستگاه زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انقلاب بزرگی درعلم ژنتیک آغاز گردید. این تکنیک قادر است در مدت بسیار کوتاهی چندین هزار نسخه از ژن را ازدیاد نماید و می‌توان با استفاده از محصول PCR از طریق تعیین توالی (Sequencing) یا قطع آنزیمی (RFLP) به مطالعه تنوع ژنتیکی انواع آبزیان پرداخت (Martin *et al*., 1992; Karl and Avise 1993).

مولکول DNAی میتوکندری (mtDNA) بعلت وراثت مادری، سرعت تکامل و موتاسیون زیادتر، اندازه کوچک آن و همچنین عدم نیاز به بافت‌های تازه (برخلاف روش آلوزایم) روش بسیار قوی برای مطالعه ساختار جمعیت انواع آبزیان شناخته شد (Ovenden 1990). اما در اکثر مطالعات انجام شده این روش فراوانی بالا ژنوتیپ‌های رایج را از خود نشان می‌دهد و برای یافتن ژنوتیپ‌های بیشتر نیاز به بررسی تعداد نمونه بیشتر می‌باشد. از سوی دیگر، از آنجائیکه ژنوتیپ mtDNA فقط از طریق ژنوم مادری به نسل بعدی منتقل می‌شود، این روش به تنهایی قادر نخواهد بود چگونگی تلاقی بین والدین و انتقال آن به نسل بعدی را توصیف نماید (Avise *et al*., 1984).

این روش موقعی که بطور همزمان و در مقایسه با روش آلوزام بکار رود کاربرد وسیع‌تر و اطلاعات جامع‌تری از خود نشان می‌دهد (Avise *et al*., 1984).

گرچه نتایج حاصله از مطالعه با استفاده از روش DNAی میتوکندری بسیار شبیه به روش آلوزایم است ولی در بعضی از مطالعات انجام شده جمعیت‌های مختلف متعلق به یک گونه را به خوبی از همدیگر تفکیک نمود (Grewe and Herbert 1988).

در سالهای اخیر، استفاده از DNAی هسته کاربرد وسیعی برای بیولوژی جمعیت پیدا کرده است. اولین بار Jeffreys *et al*., 1985 با مطالعات خود اثبات نمود که توالی‌هائی از رشته DNA وجود دارد که بصورت تکرار بر روی توالی DNA مشاهده می‌شود و از تنوع بسیار بالایی در بین افراد مختلف برخوردار است. بعدها با تکامل و توسعه روش فوق و ابداع روشهای minisatellite و بعدها microsatellite مشخص گردید که روشهای فوق اطلاعات بسیار مفیدی در خصوص تنوع ژنتیکی آبزیان فراهم می‌نماید (Bentzen *et al*., 1991) .

مزایای متعددی در روش " تعداد متغیر تکرارهای متوالی" یا Variable Number Tandem Repeat در مقایسه با روشهای مبتنی بر آلوزایم یا mtDNA وجود دارد. از جمله نیاز به مقدار بسیار اندک بافت یا خون می‌باشد حتی مقدار جزیی از بافت که در الکل نگهداری شده باشد برای انجام آنالیز مناسب می‌باشد و برای اینکار نیاز به کشتن ماهی نمی‌باشد. احتمال یافتن مارکرهای اختصاصی برای هر جمعیت با استفاده از این روش بمراتب بیشتر از روشهای قبلی است و از همه مهمتر درصد هتروزیگوت که خود مبنایی برای تمایز جمعیت‌ها از یکدیگر است با استفاده از این روش بیشتر قابل حصول می‌باشد (Wright, 1993).

٤-۱-کلیاتی در مورد مایکروستلایت‌ها

مایکروستلایت (microsatellite) یا ریز ماهواره‌ها عبارتست از توالی کوتاهی از DNA، بطول کمتر از ۶ عدد نوکلئوتید که بصورت توالی‌های پشت سر هم بدون هیچگونه قطع یا انفصال در ژنوم اکثر موجودات مشاهده می‌گردد (Hancock 2000) . در گذشته واژه مایکروستلایت به توالی ۲ تایی نوکلئوتید (عمدتاً دو عدد باز GT) اطلاق می‌شد و بعضاً به نامهای دیگری از قبلی "توالی تکراری، توالی ساده، توالی تکراری کوتاه" به چشم می‌خورد (Hancock 2000) و این خود سبب اشتباه در منابع مختلف می‌گردید. در حال حاضر واژه "مایکروستلایت" عبارت رایج و عمومی برای تمام منابع است که بطور یکسان بکار می‌رود. با توجه به مطالعات وسیع انجام شده مشخص گردید که مایکروستلایت در اکثر موجودات وجود دارد و در همه آنها تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از خود نشان داده است.

عناوین دیگری که برای ریزماهواره‌ها بکار می‌برند عبارتست از Short Tandem Repeats (STR) یا Simple Sequence Repeats (SSR) که این ریزماهواره‌ها از واحدهای ۶-۲ جفت بازی تشکیل شده و پشت‌سر هم تکراری می‌شود مانند n(TG) یا n(AAT).

براساس مطالعات May, *et al*., (1997)، motif 11 از میکروستلایت ۳ و ۴ تایی در تاسماهی دریاچه‌ای شناسایی شد و سپس بر روی ۸ گونه دیگر از تاسماهی شکلان Acipenseriformes آزمایش گردید. در طی این بررسی ۸ لوسای بطور یکنواخت در ۸ گونه مشاهده گردید و ۳ لوسای فقط در سه گونه دیده شد. از ۸ لوسای بررسی شده در ۸ گونه یک لوسای بصور مونومورف و بقیه لوسای در هر ۸ گونه بصورت پلی مورفیک بودند. بررسی فوق مارکرهای ابداع شده را روشی مناسب برای شناخت جمعیت‌ها و ذخایر تاسماهیان آمریکای شمالی اعلام نموده است. تاکنون هیچ مطالعه‌ای پیرامون تاسماهیان دریای خزر با استفاده از روش مایکروستلایت گزارش نشده و این اولین بررسی بر روی ۲ گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر (تاسماهی ایرانی و ازون‌برون) می‌باشد.

۱-٤-۱-ویژگیهای ریزماهواره‌ها

DNA ماهواره‌ای از زمانی مصطح شد که معلوم گردید در سانتریفوژ سزیم کلراید، بخش کوچکی از DNA کل، باند ماهواره‌ای تشکیل می‌دهد که از باند ژنومی اصلی جدا قرار می‌گیرد. مشخص گردید که این بخش کوچک دارای توالیهای ساده‌ای هستند که کمتر از ۵۰۰ جفت باز دارند که هزاران و یا حتی میلیونها بار تکرار می‌شوند.

انواع دیگری از DNA تکراری یا واحدهای تکراری بسیار کوتاهتر بعدها طی توالی‌یابی ژن انسولین انسانی و مستقل از سانتریفوژ سزیم کلراید کشف گردید. اینها شامل ماهوارک‌ها (minisatellaites) با واحدهای تکراری ۶۴-۱۰ جفت باز و ریزماهواره‌ها (microstellites) با واحد تکراری ۶-۲ جفت بازی هستند. باید توجه داشت که طول کل ریزماهواره‌ها عمدتاً کوتاه بوده (۲۰۰-۱۰ جفت باز) در حالیکه بیشتر ماهوارک‌ها از چند صد تا چند هزار جفت باز متغیر هستند. دو گروه اخیر به نام Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) نیز شناخته می‌شوند (درسنامه، ۱۳۸۰). وجود جایگاههای ریزماهواره‌ای در ژنومهای یوکاریوتی از سالهای ۱۹۷۰ شناخته شده بود، اگر چه اطلاعات اندکی در مورد وجود پراکنش فراوان این توالیها موجود بود تا اینکه در سال ۱۹۸۲، Hamda و همکاران کپی‌های متعدد Poly (dT-dG)n را از بسیاری از موجودات کشف کردند. این یافته‌ها را Tautz و Renz در سال ۱۹۸۴ با تکنیک هیبریداسیون در موجودات مختلف مورد ارزیابی قرار دادند و دریافتند که چندین نوع از این توالیها وجود دارد.

در سال ۱۹۸۹ معلوم شد که امکان استفاده از PCR در آنالیز ریزماهواره‌ها وجود دارد. در این بررسیها پرایمرها براساس توالیهای تثبیت شده مجاور توالیهای تکرار شوند طراحی شدند و محصولات PCR بر روی ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید از همدیگر جدا شدند. این روش امکان جداکردن آلل‌ها با اختلاف یک جفت باز را فراهم نمود.

۲-٤-۱- مزایای ریزماهواره‌ها نسبت به سایر نشانگرها

اغلب چند شکلی بالایی دارند، Single-Locus بوده و دارای وراثت هم بارز (Codominant) هستند. در ژنوم فراوانی یافت می‌شوند. ریزماهواره‌ها پراکندگی وسیعی در ژنوم یوکاریوتها دارند. همچنین، مقدار اندک DNA مورد نیاز در بکارگیری این نشانگرها و در نتیجه نمونه‌گیری از موجودات بدون از بین بردن آنها از مزایای دیگر آنهاست. مزیت دیگر ریزماهواره‌ها این است که پرایمرهای ایجاد شده برای یک گونه را می‌توان در گونه‌های نزدیک آن بکار برد و این باعث صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌گردد.

ظاهراً ریزماهواره‌ها هیچ محصولی را کد نمی‌کنند و در نتیجه از نظر انتخاب طبیعی خنثی هستند. ولی باید متذکر شد اگر چه ریزماهواره‌ها نقش عملی ندارند ولی این لزوماً به این معنا نیست که از نظر تکاملی خنثی هستند چرا

که این نشانگرها با ژنها، پیوستگی ژنتیکی نشان می‌دهند. حتی گزارشهایی دال بر امکان وجود نقش عملی برای VNTRs وجود دارد.

براساس مدلی به نام Stepwise mutation model بدلیل اینکه تفاوت طول در این نشانگرها معمولاً بواسطه تغییرات گام به گام در تعداد واحدهای تکراری است از روی تعداد تکرارها اطلاعات تکاملی نیز قابل دریافت می‌باشد. اگرچه کاربرد ریزماهواره‌ها در فیلوژنی ممکن است به گونه‌هایی با تغییرات سریع یا گونه‌های نزدیک محدود شود. بالاخره مزایای عمده تکنیکی ریزماهواره‌ها بر سایر نشانگرها شامل نمره‌دهی آسان و دقیق و قابلیت خودکار شده آنها می‌باشد.

از معایب ریزماهواره‌ها می‌توان به صرف وقت و هزینه زیاد در مرحله ایجاد، دانش اندک در مورد نحوه جهشی آنها و لزوم ایجاد روشهای جدید برای آنالیز داده‌ها اشاره کرد.

همچنین بعلت پلی‌مورفیسم زیادتر از حد ریزماهواره‌ها کاربرد آنها فقط در رده‌بندی‌های درون گونه‌ای پیشنهاد می‌گردد.

۳-٤-۱-کاربردهای مایکروستلایت

مدیریت صحیح ذخایر شیلاتی باید بر مبنای ارزیابی ساختار ژنتیکی ذخایر یا منابع بیولوژیک باشد. اگرچه تعیین حدود مرزهای فرضی این ذخایر در محیطهای آبی و دریایی یک مسئولیت پیچیده و سختی است. ولی در بسیاری از نقاط جهان از این تکنولوژی بهره بردند و در حفظ و بهره‌برداری پایدار از ذخایر به بهترین نحوه استفاده کردند. بطوریکه از مارکرهای ژنتیکی برای توصیف ساختار ذخایر بسیاری از گونه‌های ماهیان بخصوص سالمونیدها استفاده شده است. سطوح خیلی بالای تنوع به میکروستلایت‌ها مربوط می‌باشد. سرعت عمل و پتانسیل جدا نمودن تعداد زیادی لوسای که قادر به کشف اختلافات در میان جمعیتهای خیلی نزدیک به هم می‌باشد، توسط این مارکر فراهم می‌گردد. بنابراین یکی از کاربردهای مهم مایکروستلایت جداسازی جمعیت‌ها و ذخایر مختلف متعلق به یک گونه است. از کاربردهای دیگر مایکروستلایت تعیین رابطه خویشاوندی علی‌الخصوص رابطه بین والدین و فرزندان است که براحتی می‌توان از این مارکرها استفاده نمود.

۲- مواد و روشها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها:

در این بررسی در مجموع ۱۴۰ نمونه ماهی ازون‌برون مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد ۳۴ نمونه مربوط به رودخانه سفید و صیدگاههای حاشیه آن و ۲۳ نمونه از منطقه جنوب شرقی دریای خزر از صیدگاههای منطقه ساری و بندرترکمن بوده است.

۸۶ نمونه بافت از رودخانه‌های سایر کشورهای حاشیه خزر جمع‌آوری گردید که از این تعداد ۳۶ نمونه مربوط به رودخانه کورا در جمهوری آذربایجان و ۳۳ نمونه مربوط به رودخانه اورال در قزاقستان و ۱۴ نمونه مربوط به رودخانه ولگا در روسیه فدراتیو بوده است.

نمونه‌های تاسماهی ایرانی از سه منطقه رودخانه سفیدرود، منطقه غرب دریای خزر (آستارا) و شرق دریای خزر (بندر ترکمن) جمع‌آوری شد. نمونه‌های باله دمی از منطقه جنوب شرقی (۲۴ نمونه) و غربی (۲۶ نمونه) دریای خزر از ماهیان بالغ صید شده جهت استحصال خاویار جمع‌آوری گردید و نمونه‌های رودخانه سفیدرود (۱۹ نمونه) در دهانه این رودخانه بمنظور تکثیر و پرورش ماهی صید و به مجتمع شهید بهشتی انتقال می‌یافتند استفاده گردید. در این بررسی در مجموع ۶۹ نمونه تاسماهی ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. هم برای نمونه‌های ازون‌برون و هم تاسماهی ایرانی بمیزان ۵-۳ گرم باله دمی ماهیان قطع و در الکل اتیلیک ۹۰٪ قرار داده و به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی انتقال یافتند. کلیه بررسی‌های مولکولی از استخراج DNA تا انجام PCR، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید، رنگ‌آمیزی باندها و محاسبات آماری در آزمایشگاه ژنتیک انستیتو انجام پذیرفت که جزئیات آن بشرح ذیل می‌باشد:

۲-۲- روش استخراج DNA (اقتباس از Pourkazemi 1996)

۱- پنج میلی گرم از بافت باله دمی در اپندرف ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد.

۲- مقدار µl ۶۰۰ از بافر STE بر روی نمونه ریخته و با قیچی بافت هموژنیزه گردید.

۳- مقدار µl ۲۰ بافر SDS ۲۰٪ بر روی نمونه ریخته و خوب هم زده شد.

۴- مقدار µl ۱۰ پروتئیناز K (10 mg/ml) بر روی نمونه افزوده و بمدت ۱۰ ساعت در حرارت ۵۵ درجه قرار گرفت.

۵- مقدار µl ۵۰۰ فنل به کل نمونه افزوده و بمدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر هم زده شد. سپس بمدت ۱۰ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۶- فاز بالایی را با میکروپیپت جدا کرده و دور ریخته شد.

۷- میزان µl ۳۰۰ فنل و µl ۳۰۰ کلروفورم بهمراه µl ۱۲ ایزوآمیل الکل به نمونه افزوده شد.

۸- ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و پس از سانتریفوژ در rpm ۱۳۰۰۰ محلول روئی دور ریخته شد.

۹- مقدار µl ۵۰۰ کلروفورم+ µl ۲۵ ایزوآمیل الکل به نمونه افزوده شد.

۱۰- مرحله ۸ دوباره تکرار گردید.

۱۱- میزان µl ۸۰۰ الکل اتیلیک ۱۰۰٪ بر روی نمونه ریخته و خوب هم زده شد.

۱۲- بمدت ۳ دقیقه نمونه ها را با rpm ۶۰۰۰ سانتریفوژ کرده محلول روئی دور ریخته شد.

۱۳-میزان µl ۱۵۰ الکل ۷۰٪ به نمونه افزوده و سپس به مدت ۲ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۱۴-الکل دور ریخته شد وDNA را در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده تا خشک گردد.

۱۵-میزان µl ۵۰ آب مقطر استریل بر روی DNA ریخته شد تا خوب حل گردد.

برای ارزیابی کیفیت DNA همه نمونه با آگارز ۵٪ الکتروفورز و سپس با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شدند.

۱-۲-۲- آزمایشات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction)

برای مقایسه ساختار ژنتیکی ماهیان مورد بررسی، از روش PCR و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بروش microsatellite استفاده گردید.

در این بررسی ۶ عدد پرایمر (۳ جفت) که اختصاصاً برای تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) طراحی شده بود استفاده گردید. توالی پرایمرها بشرح ذیل است (May *et al*., 1997): نامگذاری پرایمرها بدین صورت است که LS مخفف Lake Sturgeon، F مخفف Forward، R مخفف Reverse و شماره‌ها ۵۷، ۶۲ و ۶۸ شماره لوکوس است. Afu مخفف اسم علمی تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) می‌باشد.

پرایمر LS-57F Afu-57, $(GAA)_{29}$	5´-GCTTGGTTGCTAGTTTGC-3´
پرایمر LS-57R	5´-GTACAGATGAGACCAGAGGC-3´
پرایمر LS-62F Afu- 62, $(GACA)_7$	5´-GATCAGGAGGGCAGAGNAAC-3´
پرایمر LS-62R	5´- CCCTGGATTTGAATTAACAG-3´
پرایمر LS-68F Afu- 68, $(GATA)_{13}$	5´- TTATTGGATGGTGTACCTAAAC-3´
پرایمر LS-68R	5´- AGCCCAACACGACAATATC-3´

سنتز و ساخت پرایمرها در شرکت IBA آلمان صورت گرفت و سپس در آزمایشگاه ژنتیک انستیتو در غلظت 50µM رقیق کرده و برای هر آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

محلول PCR به غلظت و مقادیر ذیل تهیه گردید.

- DNA	(100ng)	2µl
- PCR	Bufferr (10X)	5µl
- dNTP	(200mM)	8µl
- $MgCl_2$	(25 mM)	1µl
- Primer	(50 µM)	1µl
- Tag		0.3µl
- dWater		31.6µl

پس از تهیه مخلوطی از مواد فوق در اپندروف های ۰/۵ میلی لیتری ریخته و طبق شرایط ذیل PCR شدند.

Stage1:	Denaturation	94 °C	3 min
	Cycle		1
Stage2:	Denaturation	94 °C	1 min
	Annealing	50 °C	30 sec
	Extention	72 °C	30 sec
	Cycle	35	
Stage3:	Extention	72 °C	5 min
	Cycle	5	

مقدار µl ۱۰ از محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶درصد با ولتاژ V ۱۲۰ رانده شد و پس از اتمام الکتروفورز ژلها با روش نیترات نقره بشرح ذیل رنگ آمیزی شدند و آرایش باندها دقیقاً ثبت گردید (Pourkazemi, 1996).

۳-۲- طرز تهیه ژل پلی اکریلامید ٦درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره

آب مقطر (۲۷/۵ میلی لیتر)، پلی اکریلامید ۳۰درصد (۷/۵ میلی لیتر) بافر TBE (۳/۵ میلی لیتر) را در ارلن مایر ریخته و بخوبی هم زده شد و سپس به مدت ۴ دقیقه گاززدایی صورت گرفت. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات

۱۰ درصد و ۳۲/۵ میکرولیتر TEMED به محلول افزوده شد. پس از هم زدن محلول آماده شده در قالب شیشه ای از قبل آماده شده ریخته شد.

برای رنگ آمیزی با روش نیترات نقره ابتدا سه بافرA ، Bو Cباید بشرح ذیل تهیه گردد.

بافر A-حاوی اتانول ۱۰درصد و اسید استیک ۵درصد در حجم ۳۶۰ میلی لیتر آب

بافرB -حاوی نیترات نقره ۰/۱ درصد در حجم آبی ۲۰۰ میلی لیتر

بافر C -حاوی سود ۴/۵ درصد، $NaBH_4$ ۰/۱ درصد و فرمالدئید ۰/۱۵ درصد در ۳۰۰ میلی لیتر آب

ابتدا ژل بمدت ۳ دقیقه در بافر A (۲ بار) شستشو شده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در بافرB و سپس در بافرC بمدت ۱۰ دقیقه شستشو گردیدند.

٤-۲- محاسبات آماری

برای انجام آنالیز آماری از برنامه ژنتیکی Popgene (version 1.31) استفاده شد که بر مبنای آن پارامترهای زیر اندازه‌گیری گردید:

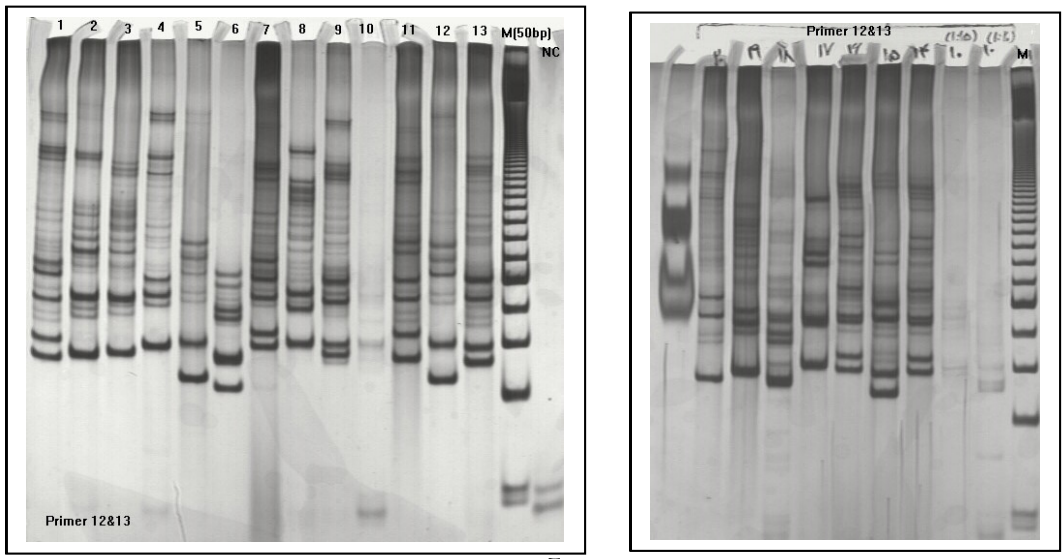
تعداد و فراوانی الل، فراوانی ژنوتیپ و شاخص ثابت شدن (Fixation index) براساس روش Wright (1978) ، لوسای پلی‌مورفیک (براساس روش Hartle and Clark 1989) شاخص شانون (Shannon *et al.*, 1949) بعنوان معیاری برای محاسبه تنوع ژنتیکی، میزان مهاجرت ژنی (Gene flow) و محاسبه Fst یا Gst براساس Slatkin and Barton (1989) ، فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی براساس Nei (1972, 1973, 1978) تست خنثی (Neutrality test) براساس تست Ewans-Watterson به روش Manly (1985)، محاسبه عدم تعادل ارتباط (Linkage disequilibria) برای هر جفت لوسای و تست X^2 براساس روش Weir (1979).

۳- نتایج

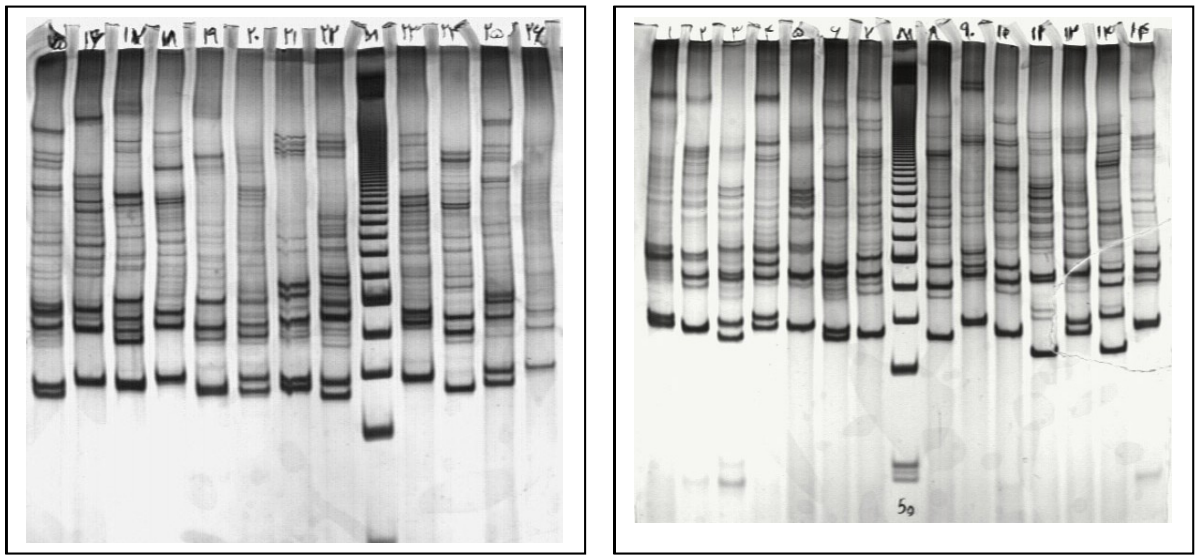
استخراج DNA به روش فنل کلروفورم از باله‌های تاسماهی ایرانی و ازون‌برون، DNA با کیفیت مناسب و مقدار کافی تولید نمود و برای انجام PCR مطلوب بوده است. نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای میکروستلایت برای هر یک از گونه‌ها به تفکیک و به شرح ذیل ارائه می‌گردد.

الف - تاسماهی ایرانی

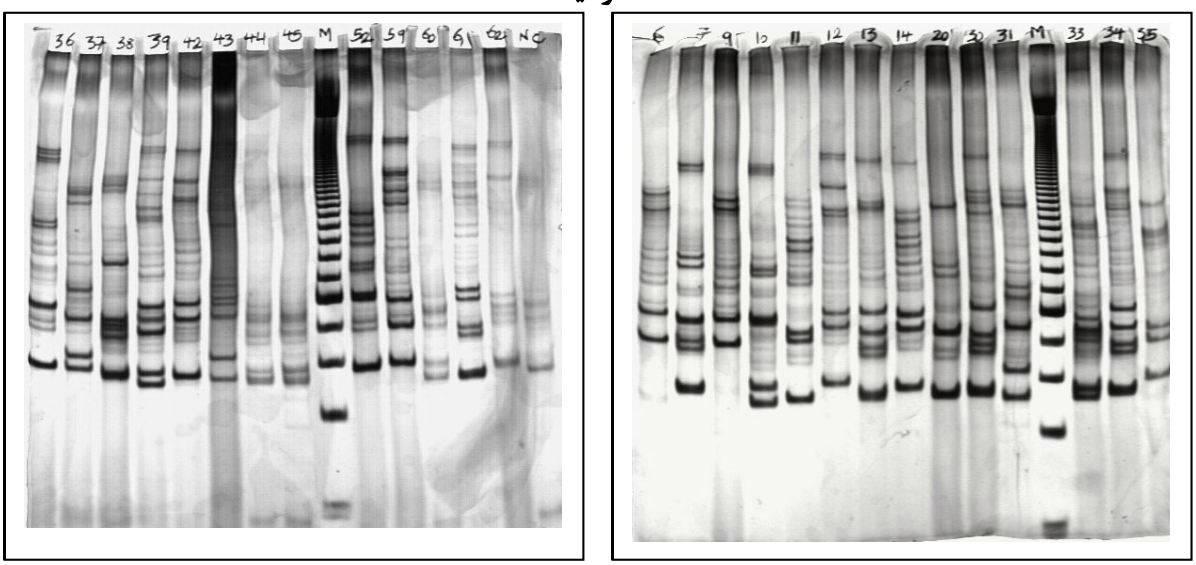
از مجموع سه جفت پرایمر Afu-۵۷ ، Afu-۶۲ و Afu-۶۸ فقط جفت پرایمر Afu-۶۸ جواب مناسب برای تولید محصول PCR و پلی‌مورفیسم در نمونه‌های بررسی شده از خود نشان داد که در تصاویر ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.



تصویر ۱- محصول PCR نمونه‌های تاسماهی ایرانی جمع‌آوری شده از رودخانه سفیدرود شماره نمونه‌ها در قسمت بالای ستونها نشان داده شده است و برای مقایسه از مارکر با وزن مولکولی ۵۰ جفت باز (M) استفاده گردیده است.



تصویر ۲- محصول PCR نمونه‌های تاسماهی ایرانی جمع‌آوری شده از ناحیه ۱ (غرب استان گیلان) شماره نمونه‌ها در قسمت بالای ستونها نشان داده شده است و برای مقایسه از مارکر با وزن مولکولی ۵۰ جفت باز (M) استفاده گردیده است.



تصویر ۳- محصول PCR نمونه‌های تاسماهی ایرانی جمع‌آوری شده از ناحیه ٤ (منطقه بندرترکمن) شماره نمونه‌ها در قسمت بالای ستونها نشان داده شده است و برای مقایسه از مارکر با وزن مولکولی ۵۰ جفت باز (M) استفاده گردیده است.

۱-۱-۳- فراوانی الل و ژنوتیپ

پرایمر Afu-۶۸ در ۲ لوسای در تاسماهی ایرانی تنوع ژنتیکی نشان داد که به لوکوس یک (PPP- ۱) و لوکوس دو (PPP- ۲) نامگذاری گردید. مجموعاً ۳۵ الل مشاهده شد که از این تعداد ۱۵ الل در لوکوس اول و ۲۰ الل در لوکوس دوم مشاهده شد و فراوانی آنها طبق جدول ۱ بوده است.

جدول (۱). الل، اندازه و فراوانی آن در لوکوس اول و دوم در تاسماهی ایرانی

الل	اندازه الل در لوکوس ۱ (جفت باز)	لوکوس ۱- PPP	لوکوس ۲- PPP	اندازه الل در لوکوس دوم (جفت باز)
A	۱۰۶	۰/۰۰۷۵	۰/۰۲۹۹	۱۸۶
B	۱۱۴	۰/۰۲۹۹	۰/۰۱۴۹	۱۹۴
C	۱۱۸	۰/۰۰۷۵	۰/۰۱۴۹	۱۹۸
D	۱۲۲	۰/۰۰۷۵	۰/۰۷۴۶	۲۰۲
E	۱۲۶	۰/۰۴۴۸	۰/۰۳۷۳	۲۰۶
F	۱۳۰	۰/۱۴۱۸	۰/۰۶۷۲	۲۱۰
G	۱۳۴	۰/۱۵۶۷	۰/۰۸۹۶	۲۱۴
H	۱۳۸	۰/۱۱۱۹	۰/۱۱۹۴	۲۱۸
I	۱۴۲	۰/۱۵۶۷	۰/۱۱۹۴	۲۲۲
J	۱۴۶	۰/۱۳۴۳	۰/۰۱۴۹	۲۲۶
K	۱۵۰	۰/۱۰۴۵	۰/۰۵۲۲	۲۳۰
L	۱۵۴	۰/۰۲۹۹	۰/۰۵۹۷	۲۳۴
M	۱۵۸	۰/۰۲۲۴	۰/۰۴۴۸	۲۳۸
N	۱۶۲	۰/۰۱۴۹	۰/۰۳۷۳	۲۴۲
O	۱۶۶	۰/۰۲۹۹	۰/۰۲۹۹	۲۴۶
P			۰/۰۶۷۲	۲۵۰
Q			۰/۰۲۹۹	۲۵۴
R			۰/۰۵۲۲	۲۵۸
S			۰/۰۲۲۴	۲۶۲
X			۰/۰۲۲۴	۲۸۲

همانطوریکه در جدول (۱) آمده است بیشترین فراوانی در لوکوس اول (۱ -PPP) مربوط به الل‌های G و I که بطور یکسان به میزان ۰/۱۵۶۷ فراوانی داشتند و کمترین فراوانی مربوط به سه الل A، C و D بود که هر سه دارای فراوانی مشابه و به میزان ۰/۰۰۷۵ داشتند. در حالیکه در لوکوس دوم (۲ -PPP) فراوانی و همچنین اندازه اللها متفاوت بوده است. بیشترین فراوانی الل مربوط به اللهای H و I که بطور یکسان به میزان ۰/۱۱۹۴ بودند و کمترین فراوانی الل مربوط به اللهای S و X که بطور یکسان فراوانی آنها به میزان ۰/۰۲۲۴ بوده است.

فراوانی ژنوتیپ در لوکوس ۱ و ۲ با همدیگر متفاوت بوده است و فراوانی آنها برحسب تعداد مشاهده شده Obs (O) و قابل انتظار .Exp (E) در جدول (۲) ارائه گردیده است.

فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده به ترتیب در ژنوتیپ‌های GG (۸)، HH (۶)، FF (۶)، II (۶)، JJ (۵) بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بوده است. تعدادی از ژنوتیپ‌ها در سه منطقه مورد بررسی بطور مشترک مشاهده شده است و بیانگر آن است که تاسماهی ایرانی در طول سواحل جنوبی دریای خزر مهاجرت می‌کند و تبادل ژنی Gene flow بین آنها صورت می‌گیرد.

ژنوتیپ مشترک بین سفیدرود و بندرترکمن	←	GK, KK
ژنوتیپ مشترک بین سفیدرود و غرب گیلان (آستارا)	←	JJ, II
ژنوتیپ مشترک بین سفیدرود، غرب گیلان و منطقه بندرترکمن	←	GG, II
ژنوتیپ مشترک بین منطقه بندرترکمن و غرب دریای خزر	←	FI, FF, HH

در کنار وجود ژنوتیپ‌های اشتراکی ژنوتیپ‌های مشاهده شدند که به یک منطقه اختصاص داشتند و در مناطق نمونه‌برداری دیگر مشاهده نشدند که در جدول (۳) ارائه شده است.

جدول (۲). ژنوتیپ‌ها، تعداد مشاهده شده، تعداد قابل انتظار در لوکوس اول درتاسماهی ایرانی

ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	فراوانی قابل انتظار (E)	$(O-E)^2/E$	$2 \times O \times Ln (O/E)$
۱	BB	۱	۰/۰۴۵۱	۲۰/۲۱۱۸	۶/۱۹۷۲
۲	EE	۱	۰/۰۱۱۲۸	۶/۹۷۹۴	۴/۳۶۴۶
۳	FA	۱	۰/۱۴۲۹	۵/۱۴۲۹	۳/۸۹۱۸
۴	FF	۶	۱/۲۸۵۷	۱۷/۲۸۵۷	۱۸/۴۸۵۳
۵	GF	۱	۳/۰۰۰۰	۱/۳۳۳۳	۲/۱۹۷۲
۶	GG	۸	۱/۵۷۸۹	۲۶/۱۱۲۳	۲۵/۹۶۲۹
۷	HE	۱	۰/۶۷۶۷	۰/۱۵۴۵	۰/۷۸۱۱
۸	HF	۱	۲/۱۴۲۹	۰/۶۰۹۵	۱/۵۲۴۳
۹	HH	۶	۰/۷۸۹۵	۳۴/۳۸۹۵	۲۴/۳۳۷۸
۱۰	IE	۲	۰/۹۴۷۴	۱/۱۶۹۶	۲/۹۸۸۹
۱۱	IF	۳	۳/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
۱۲	IG	۱	۳/۳۱۵۸	۱/۶۱۷۴	۲/۳۹۷۴
۱۳	II	۶	۱/۵۷۸۹	۱۲/۳۷۸۹	۱۶/۰۲۰۰
۱۴	JD	۱	۰/۱۳۵۳	۵/۵۲۴۲	۴/۰۰۰۰
۱۵	JE	۱	۰/۸۱۲۰	۰/۰۴۳۵	۰/۴۱۶۴
۱۶	JF	۱	۲/۵۷۱۴	۰/۹۶۰۳	۱/۸۸۸۹
۱۷	JG	۱	۲/۸۴۲۱	۱/۱۹۴۰	۲/۰۸۹۱
۱۸	JJ	۵	۱/۱۵۰۴	۱۲/۸۸۲۴	۱۴/۶۹۳۵
۱۹	KB	۲	۰/۴۲۱۱	۵/۹۲۱۱	۶/۲۳۲۶
۲۰	KI	۳	۲/۲۱۰۵	۰/۲۸۲۰	۱/۸۳۲۳
۲۱	KK	۴	۰/۶۸۴۲	۱۶/۰۶۸۸	۱۴/۱۲۶۳
۲۲	LL	۲	۰/۰۴۵۱	۸۴/۷۱۱۸	۱۵/۱۶۶۹
۲۳	MC	۱	۰/۰۲۲۶	۴۲/۳۵۵۹	۷/۵۸۳۵
۲۴	MG	۱	۰/۴۷۳۷	۰/۵۸۴۸	۱/۴۹۴۴
۲۵	MJ	۱	۰/۴۰۶۰	۰/۸۶۹۰	۱/۸۰۲۷
۲۶	NG	۱	۰/۳۱۵۸	۱/۴۸۲۵	۲/۳۰۵۴
۲۷	NJ	۱	۰/۲۷۰۷	۱/۹۶۵۱	۲/۶۱۳۷
۲۸	OH	۱	۰/۴۵۱۱	۰/۶۶۷۸	۱/۵۹۲۰
۲۹	OJ	۲	۰/۵۴۱۴	۳/۹۳۰۲	۵/۲۲۷۳
۳۰	OK	۱	۰/۴۲۱۱	۰/۷۹۶۱	۱/۷۳۰۰

جدول (۳). ژنوتیپ‌های اختصاصی تاسماهی ایرانی در سه منطقه مورد بررسی

ردیف	منطقه سفیدرود	منطقه بندرترکمن	منطقه غرب گیلان
۱	GN	EI	JM
۲	BK	EE	FJ
۳	AF	FH	IK
۴	JO	LL	FG
۵	EO	JN	GI
۶	EJ	EH	LL
۷	JO	GM	
۸	DJ		
۹	KO		

فراوانی ژنوتیپ در لوکوس ۲ (۲- PPP) با لوکوس ۱ متفاوت بوده که میزان مشاهده شده و قابل انتظار در جدول (۴) ارائه شده است.

جدول (٤). ژنوتیپ‌ها، تعداد و فراوانی مشاهده شده و قابل انتظار در لوکوس دوم تاسماهی ایرانی

ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	فراوانی قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)^2}{E}$	$2\times O\times Ln(O/E)$	ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	فراوانی قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)^2}{E}$	$2\times O\times Ln(O/E)$
۱	CA	۱	۰/۰۶۰۲	۱۴/۶۸۵۲	۵/۶۲۱۸	۳۱	PE	۱	۰/۳۸۳۳	۱/۲۹۳۹	۲/۱۶۷۴
۲	DA	۳	۰/۳۰۰۸	۲۴/۲۲۵۸	۱۳/۸۰۰۵	۳۲	PG	۱	۰/۸۱۲۰	۰/۰۴۳۵	۰/۴۱۶۴
۳	EB	۱	۰/۰۷۵۲	۱۱/۳۷۵۲	۵/۱۷۵۵	۳۳	PH	۲	۱/۰۸۲۷	۰/۷۷۷۲	۲/۴۵۴۷
۴	GC	۱	۰/۱۸۰۵	۳/۷۲۲۱	۳/۴۲۴۶	۳۴	PI	۳	۱/۰۸۲۷	۳/۳۹۵۲	۶/۱۱۴۹
۵	GD	۱	۰/۹۰۲۳	۰/۰۱۰۶	۰/۲۰۵۷	۳۵	QH	۱	۰/۴۸۱۲	۰/۵۵۹۳	۱/۴۶۲۹
۶	GG	۲	۰/۴۹۶۲	۴/۵۵۶۸	۵/۵۷۵۴	۳۶	QI	۲	۰/۴۸۱۲	۴/۷۹۳۷	۵/۶۹۸۵
۷	HF	۲	۱/۰۸۲۷	۰/۷۷۷۲	۲/۴۵۴۷	۳۷	RJ	۱	۰/۱۰۵۳	۷/۶۰۵۳	۴/۵۰۲۶
۸	HH	۲	۰/۹۰۲۳	۱/۳۳۵۶	۳/۱۸۴۰	۳۸	PK	۱	۰/۳۶۸۴	۱/۰۸۲۷	۱/۹۹۷۱
۹	ID	۲	۱/۲۰۳۰	۰/۵۲۸۰	۲/۰۳۳۳	۳۹	PM	۱	۰/۳۱۵۸	۱/۴۸۲۵	۲/۳۰۵۴
۱۰	IE	۲	۰/۶۰۱۵	۳/۲۵۱۵	۴/۸۰۵۹	۴۰	RR	۲	۰/۱۵۷۹	/۴۹۱۲ ۲۱	۱۰/۱۵۵۹
۱۱	IG	۲	۱/۴۴۳۶	۰/۲۱۴۴	۱/۳۰۴۰	۴۱	SF	۱	۰/۲۰۳۰	۳/۱۲۸۹	۳/۱۸۹۰
۱۲	II	۱	۰/۹۰۲۳	۰/۰۱۰۶	۰/۲۰۵۷	۴۲	SH	۱	۰/۳۶۰۹	۱/۱۳۱۷	۲/۰۳۸۳
۱۳	JD	۱	۰/۱۵۰۴	۴/۸۰۰۶	۳/۷۸۹۲	۴۳	SP	۱	۰/۲۰۳۰	۳/۱۲۸۹	۳/۱۸۹۰
۱۴	KD	۲	۰/۵۲۶۳	۴/۱۲۶۳	۵/۳۴۰۰	۴۴	XH	۱	۰/۳۶۰۹	۱/۱۳۱۷	۲/۰۳۸۳
۱۵	KF	۱	۰/۴۷۳۷	۰/۵۸۴۸	۱/۴۹۴۴	۴۵	XP	۱	۰/۲۰۳۰	۳/۱۲۸۹	۳/۱۸۹۰
۱۶	KG	۱	۰/۶۳۱۶	۰/۲۱۴۹	۰/۹۱۹۱	۴۶	XQ	۱	۰/۰۹۰۲	۹/۱۷۳۶	۴/۸۱۰۹
۱۷	KI	۱	۰/۸۴۲۱	۰/۰۲۹۶	۰/۳۴۳۷						
۱۸	LB	۱	۰/۱۲۰۳	۶/۴۳۲۸	۴/۲۳۵۵						
۱۹	LE	۱	۰/۳۰۰۸	۱/۶۲۵۸	۲/۴۰۲۹						
۲۰	LF	۴	۰/۵۴۱۴	۲۲/۰۹۶۹	۱۵/۹۹۹۸						
۲۱	LL	۱	۰/۲۱۰۵	۲/۹۶۰۵	۳/۱۱۶۳						
۲۲	MD	۱	۰/۴۵۱۱	۰/۶۶۷۸	۱/۵۹۲۰						
۲۳	MH	۳	۰/۷۲۱۸	۷/۱۹۰۶	۸/۵۴۷۷						
۲۴	MI	۱	۰/۷۲۱۸	۰/۱۰۷۲	۰/۶۵۲۰						
۲۵	NG	۲	۰/۴۵۱۱	۵/۳۱۷۸	۵/۹۵۶۶						
۲۶	NK	۱	۰/۲۶۳۲	۲/۰۶۳۲	۲/۶۷۰۰						
۲۷	NN	۱	۰/۰۷۵۲	۱۱/۳۷۵۲	۵/۱۷۵۵						
۲۸	OF	۱	۰/۲۷۰۷	۱/۹۶۵۱	۲/۶۱۳۷						
۲۹	OH	۲	۰/۴۸۱۲	۴/۷۹۳۷	۵/۶۹۸۵						
۳۰	OI	۱	۰/۴۸۱۲	۰/۵۵۹۳	۱/۴۶۲۹						

براساس جدول (۴) بیشترین فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ LF بوده که در ۴ نمونه مشاهده شده است و پس از آن ژنوتیپ‌های DA، MH، PI بودند که بطور مشترک هریک ۳ بار مشاهده شدند و ژنوتیپ‌های GG، HF، HH ، ID، IE، IG، KD، NG، OH، PH، QI و RR هریک ۲ بار و بقیه ژنوتیپ‌ها فقط ۱ بار مشاهده شدند.

محاسبات آماری نشان داد که در لوکوس اول (۱- PPP) ۱۵ الل و در لوکوس دوم (۲- PPP) بیست الل و در این بررسی بطور میانگین ۳/۵۳۶ ± ۱۷/۵ الل مشاهده شد. شاخص اطلاعاتی Shannon براساس روش ذکر شده در (Lewontin 1972) برای لوکوس ۱ معادل ۲/۳۱۹۷ و برای لوکوس ۲ معادل ۲/۸۱۴۱ و بطور میانگین ۰/۳۴۹۶± ۲/۵۶۶۹ بوده است (جدول ۵).

جدول (۵). تعداد الل و شاخص شانون در لوسای بررسی شده در تاسماهی ایرانی

لوکوس	تعداد نمونه بررسی شده	تعداد الل‌های مشاهده شده	شاخص Shannon (I)
۱- PPP	۱۳۴	۱۵	۲/۳۱۹۷
۲- PPP	۱۳۴	۲۰	۲/۸۱۴۱
میانگین	۱۳۴	۱۷/۵	۲/۵۶۶۹
انحراف از معیار		۳/۵۳۵۵	۰/۳۴۹۶

تعداد لوکوس بررسی شده در این مطالعه دو لوکوس بوده که هر دوی آنهای پلی‌مورفیک بودند در واقع ۱۰۰درصد لوسای بررسی شده پلی‌مورفیسم بودند. شاخص تثبیت الل که اصطلاحاً به آن Fixation index (F_{is}) بعنوان یک معیار اندازه‌گیری برای نشان دادن افزایش یا کاهش هتروزیگوت می‌باشد که طبق جدول (۶) اندازه‌گیری شد. مجموع Fi در لوکوس اول ۰/۵۲۷۱ ولی در لوکوس دوم میزان آن معادل ۰/۰۶۹۹ بوده است.

جدول (٦). الل و شاخص تثبیت اللها در لوسای مختلف در تاسماهی ایرانی

الل	لوکوس اول (PPP -١)	لوکوس دوم (PPP -٢)
A	٠/٠٠٧٥	٠/٠٣٠٨
B	٠/۴٨۴۶	٠/٠١۵٢
C	٠/٠٠٧۵	٠/٠١۵٢
D	٠/٠٠٧۵	٠/٠٨٠۶
E	٠/٣٠٢١	٠/٠٣٨٨
F	٠/۵٧٠٧	٠/٠٧٢٠
G	٠/٧١٧٧	٠/٢۶٧٨
H	٠/٧٧۴٨	٠/١۴٨٣
I	٠/۴٩١٨	٠/٠٠۶۴
J	٠/۴٨۶۶	٠/٠١۵٢
K	٠/۵٢١۴	٠/٠۵۵١
L	١/٠٠٠٠	٠/٢٠٢۴
M	٠/٠٢٢٩	٠/٠۴۶٩
N	٠/٠١۵٢	٠/٣٧۶٧
O	٠/٠٣٠٨	٠/٠٣٠٨
P	****	٠/٠٧٢٠
Q	****	٠/٠٣٠٨
R	****	٠/۵۴٧٨
S	****	٠/٠٢٢٩
T	****	****
U	****	****
V	****	****
W	****	****
X	****	****
جمع	**٠/۵٢٧١**	**٠/٠۶٩٩**

میزان مهاجرت ژنی برای تمام لوسای براساس فرمول محاسبه ژنتیک مولکولی تکامل (Nei, 1987) محاسبه شد و در جدول (٧) ارائه شده که میزان Fis برای لوکوس اول ٠/۴٩۵١ ولی برای لوکوس دوم ٠/٠۵٣٨ و میزان Fit در لوکوس اول و دوم به ترتیب ٠/۵١٧۶ و ٠/٠٧٨۵ و میزان Fst برای دو لوسای به ترتیب

۰/۰۴۴۵ و ۰/۰۲۶۰ و میزان مهاجرت ژنی (Gene flow) تخمین زده شده بطور متوسط ۶/۸۹ می‌باشد. میزان مهاجرت ژنی براساس فرمول $F_{st} = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ محاسبه شده است.

جدول (۷). محاسبه مقادیر F_{is} ، F_{it}، F_{st} و N_m در تاسماهی ایرانی

لوکوس	تعداد الل‌های بررسی شده	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
PPP –۱	۱۳۴	۰/۴۹۵۱	۰/۵۱۷۶	۰/۰۴۶۴۵	۵/۳۶۹۳
PPP –۲	۱۳۴	۰/۰۵۳۸	۰/۰۷۸۵	۰/۰۲۶۰	۹/۳۵۱۲
میانگین	۱۳۴	۰/۲۶۶۷	۰/۲۹۲۳	۰/۰۳۵۰	۶/۸۸۷۸

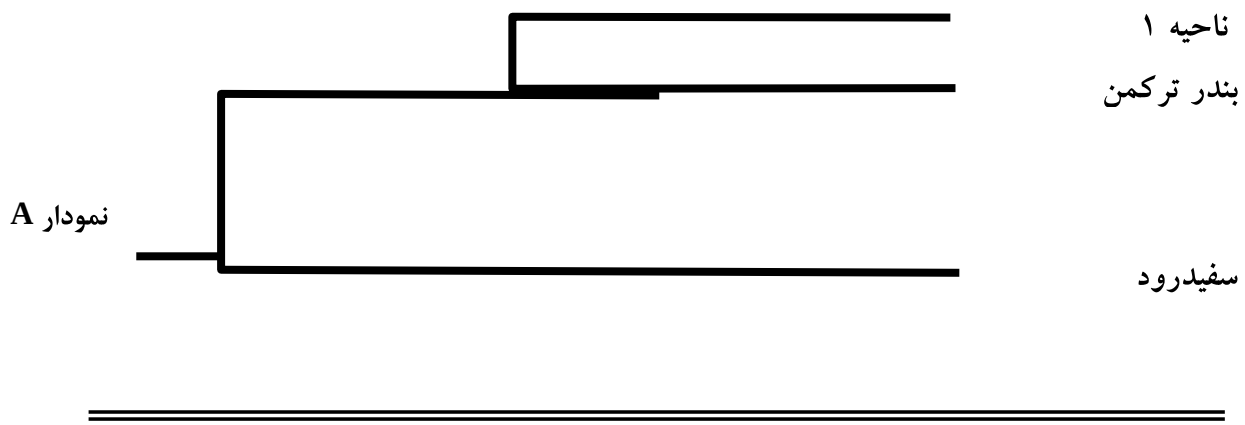
میزان فاصله و شباهت ژنتیکی که براساس فرمول Nei (1972) محاسبه شد برای سه منطقه مورد بررسی بشرح جدول (۸) می‌باشد. میزان شباهت ژنتیکی در قسمت مثلث بالا و میزان فاصله ژنتیکی در مثلث پائین می‌باشد. بنحویکه بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های منطقه سفیدرود با دو منطقه دیگر و کمترین بین ناحیه ۱ و منطقه بندرترکمن می‌باشد.

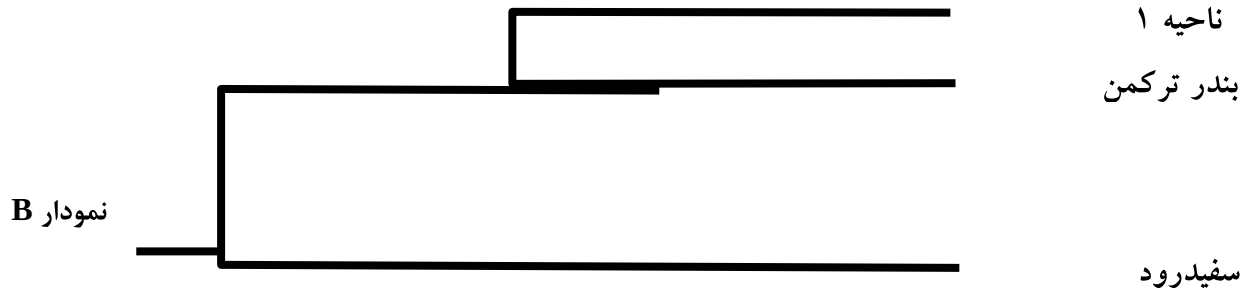
جدول (۸). میزان فاصله ژنتیکی (مثلث پائین) و شباهت ژنتیکی (مثلث بالا) تاسماهی ایرانی در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مورد بررسی

منطقه مورد بررسی	ناحیه ۱	منطقه سفیدرود	منطقه بندرترکمن
ناحیه ۱		۰/۲۷۶۶	۰/۶۷۹۹
منطقه سفیدرود	۰/۳۹۰۷		۰/۵۰۰۳
منطقه بندرترکمن	۰/۳۸۵۹	۰/۶۹۲۶	

۲-۱-۳- رابطه و درخت تکاملی تاسماهی ایرانی در مناطق مورد بررسی:

براساس فاصله ژنتیکی Nei (1972) و روش UPGMA که شکل تغییر یافته روش NEIGHBOR می‌باشد نمودار (A) و همچنین براساس unbiased برمبنای شباهت و فاصله ژنتیکی براساس روش Nei (1978) نمودار (B) مشخص گردید که جمعیت تاسماهی ایرانی به سه گروه مجزا تقسیم می‌شود. گروه تاسماهی جمع‌آوری شده از رودخانه سفیدرود بطور مجزا یک جمعیت شاخص را تشکیل داده ولی دو جمعیت مربوط به ناحیه ۱ شیلات (غرب استان گیلان) و منطقه بندرترکمن بیشتر شبیه هم می‌باشد و از لحاظ درخت تکاملی در یک شاخه قرار گرفتند.





۳-۱-۳- ساختار جمعیت و تست هتروژنی

تست هتروژنی بمنظور مقایسه ساختار جمعیت نمونه‌ها در مناطق نمونه‌برداری شده صورت می‌گیرد که براساس محاسبه میزان تمایز یا تفاوت جمعیت‌ها (X^2) و یا میزان شباهت جمعیت‌ها (G^2) بر روی کل نمونه‌های مورد بررسی انجام می‌پذیرد که مقادیر آن برای سه منطقه مورد بررسی با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام پذیرفت و نتایج آن بر حسب لوکوس به شرح جدول (۹) بوده است.

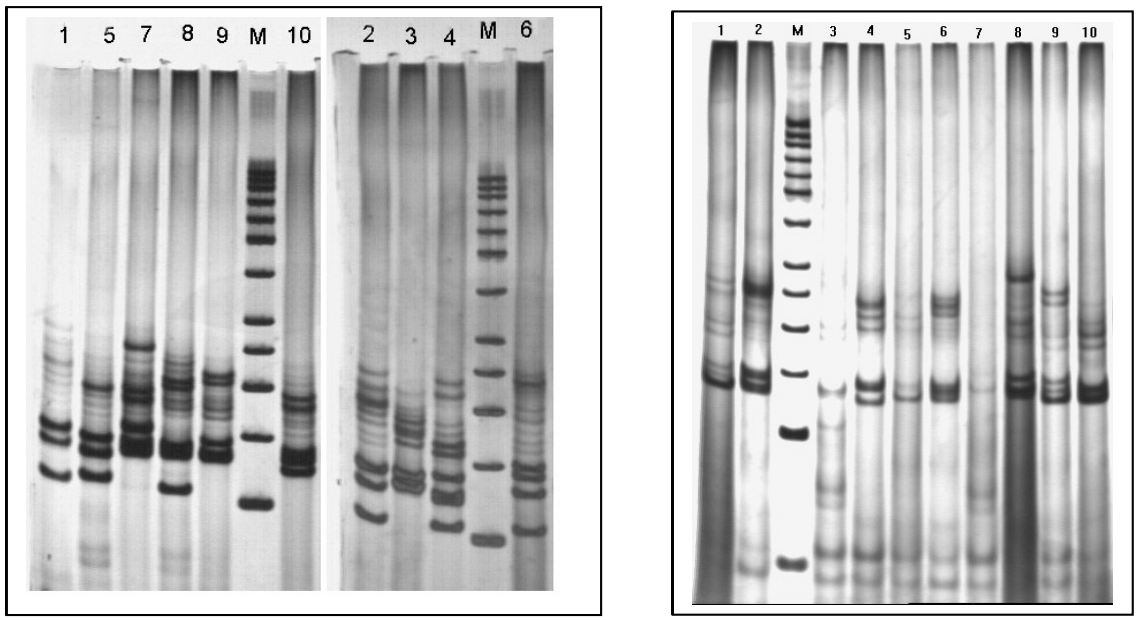
جدول (۹). مقادیر X^2 و G^2 بدست آمده برحسب لوکوس ۱ و ۲ در تاسماهی ایرانی

لوکوس / پارامترها	لوکوس اول (PPP -۱)	لوکوس دوم (PPP -۲)
X^2	۶۰/۳۳۵۷	۵۵/۳۱۸۴
درجه آزادی	۲۸	۳۸
مقدار P	۰/۰۰۰۳۶۹	۰/۰۳۴۳۷
G^2	۶۷/۵۸۶۵	۶۸/۹۷۰۱۷
درجه آزادی	۲۸	۳۸
مقدار P	۰/۰۰۰۰۴۰	۰/۰۰۱۵۵

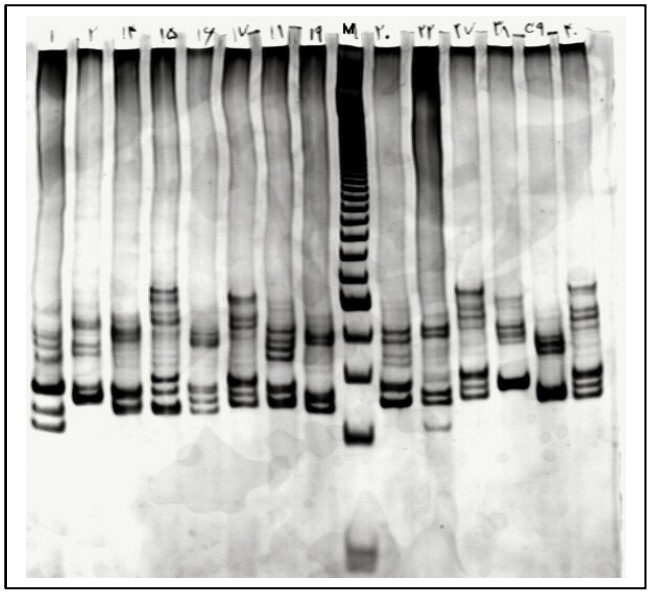
بر اساس نتایج فوق مشخص گردید که جمعیت‌های بررسی شده دارای اختلاف معنی‌داری بوده و از جمعیت‌های متفاوتی تشکیل یافتند بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود از دو منطقه دیگر (ناحیه ۱ و منطقه بندرترکمن) از همدیگر متمایز می‌باشند و برای حفظ ذخایر و بهره‌برداری پایدار آن برنامه‌ریزی جداگانه‌ای باید اعمال نمود.

۲-۳- ماهی ازون‌برون

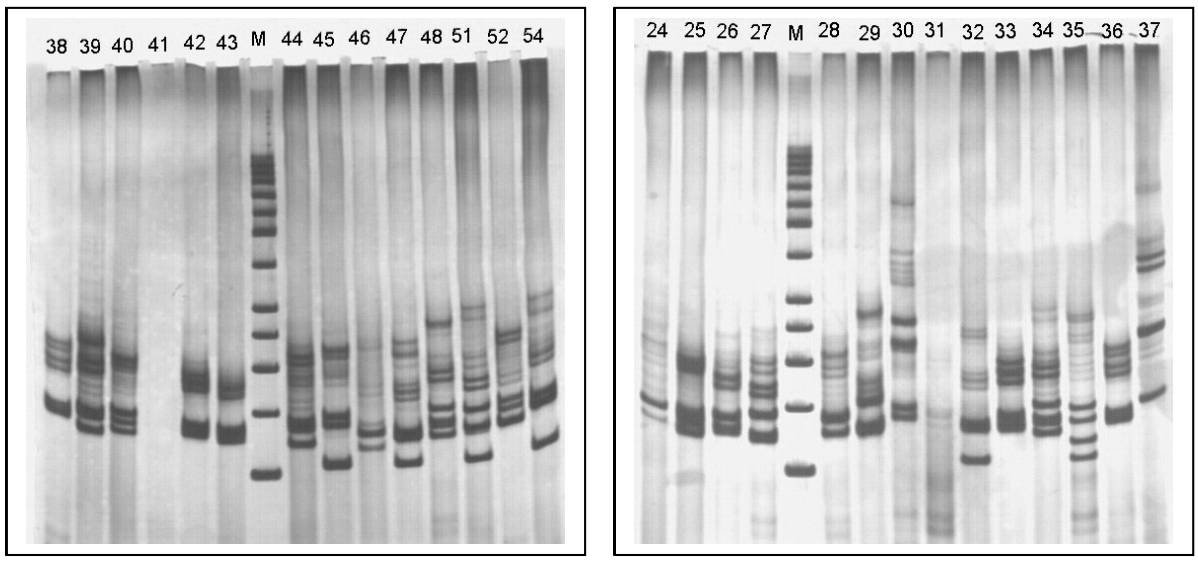
پرایمر Afu-۶۸ تنوع و پلی‌مورفیسم بسیار خوبی در تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در ماهی ازون‌برون نشان داد. این پرایمر در ۲ لوکوس (Sta-۱) و (Sta-۲) پلی‌مورفیک بود و آرایش باندهای پلی‌مورفیسم آن بخوبی قابل رویت و شمارش بوده است. آرایش باندها و شدت رنگ آنها در لوکوس اول (Sta-۱) بیشتر از لوکوس دوم بود. تصاویر ۴ الی ۸ نمونه‌ای از ژلهای تهیه شده از نمونه‌های بررسی شده در این تحقیق را نشان می‌دهد.



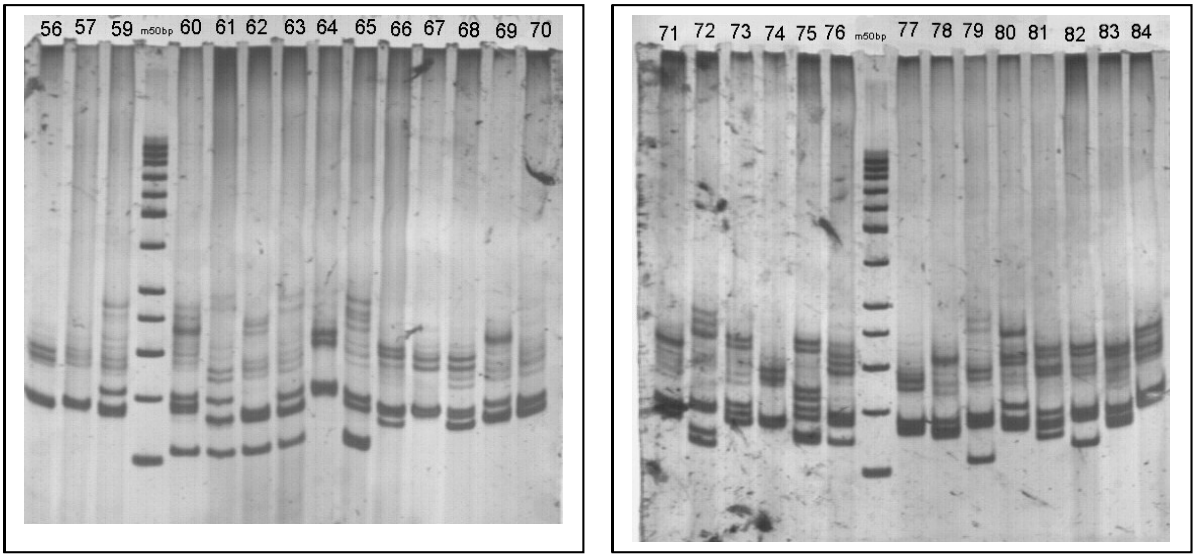
تصویر ٤: آرایش باندهای پلی‌مورفیسم در ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده در منطقه سفیدرود با استفاده از پرایمر Afu -٦٨



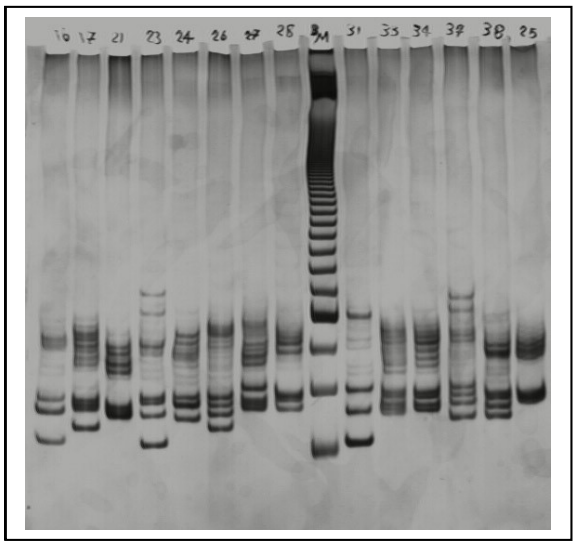
تصویر ٥- پلی‌مورفیسم در ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده از منطقه جنوب شرقی دریای خزر با استفاده از پرایمر
Afu -٦٨



تصویر٦- پلی‌مورفیسم در ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده از رودخانه کورا (آذربایجان) با استفاده از پرایمر
Afu -٦٨



تصویر ۷- پلی‌مورفیسم در ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده از رودخانه اورال (قزاقستان) با استفاده از پرایمر Afu -٦٨



تصویر ۸- پلی‌مورفیسم در ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده از رودخانه ولگا (روسیه) با استفاده از پرایمر Afu -٦٨

۱-۲-۳- فراوانی اللی و ژنوتیپ

در مجموع ۳۸ الل در این بررسی مشاهده شد که تعداد آن در لوکوس اول کمتر و ۱۴ الل بوده ولی در لوکوس دوم ۲۴ الل مشاهده شد ولی فراوانی آنها با همدیگر متفاوت بوده است.

در لوکوس اول بیشترین فراوانی مربوط به الل G بوده که معادل ۰/۱۹۲۹ و سپس اللهای H (۰/۱۷۵۰) و الل F (۰/۱۵۳۶) بیشترین فراوانی را داشتند. ولی در لوکوس دوم بیشترین فراوانی معادل ۰/۱۰۳۶ مربوط به الل J بوده و

اللها I، H، J که دارای فراوانی به میزان ۰/۰۷۱۴، ۰/۰۶۷۹ و ۰/۰۶۴۳ بودند در مراحل بعدی قرار داشتند. فراوانی هریک از اللها در لوکوس ۱ و ۲ در جدول (۱۰) ارائه شده است.

جدول (۱۰). الل‌ها و فروانی آن در لوکوس اول و دوم در ماهی ازون‌برون

ردیف	الل	لوکوس اول	لوکوس دوم	اندازه DNA (bp)	
				لوکوس اول	لوکوس دوم
۱	A	۰/۰۲۵۰	۰/۰۱۴۳	۱۰۴	۱۶۰
۲	B	۰/۰۵۳۶	۰/۰۱۰۷	۱۰۸	۱۶۴
۳	C	۰/۰۴۲۹	۰/۰۲۵۰	۱۱۲	۱۶۸
۴	D	۰/۰۴۲۹	۰/۰۵۰۰	۱۱۶	۱۷۲
۵	E	۰/۰۸۵۷	۰/۰۴۲۹	۱۲۴	۱۷۶
۶	F	۰/۱۵۳۶	۰/۰۶۷۹	۱۲۸	۱۸۰
۷	G	۰/۱۹۲۹	۰/۰۶۴۳	۱۳۲	۱۸۴
۸	H	۰/۱۷۵۰	۰/۰۶۷۹	۱۳۶	۱۸۸
۹	I	۰/۰۷۱۴	۰/۰۷۱۴	۱۴۰	۱۹۲
۱۰	J	۰/۰۶۷۹	۰/۱۰۳۶	۱۴۴	۱۹۶
۱۱	K	۰/۰۵۳۶	۰/۰۶۷۹	۱۴۸	۲۰۰
۱۲	L	۰/۰۱۰۷	۰/۰۵۳۶	۱۵۲	۲۰۴
۱۳	M	۰/۰۱۴۳	۰/۰۴۲۹	۱۵۶	۲۰۸
۱۴	N	۰/۰۱۰۷	۰/۰۶۷۹	۱۶۰	۲۱۲
۱۵	O		۰/۰۴۲۹		۲۱۶
۱۶	P		۰/۰۳۲۱		۲۲۰
۱۷	Q		۰/۰۳۲۱		۲۲۴
۱۸	R		۰/۰۲۸۶		۲۲۸
۱۹	S		۰/۰۴۶۴		۲۳۲
۲۰	T		۰/۰۱۴۳		۲۳۶
۲۱	U		۰/۰۰۷۱		۲۴۰
۲۲	V		۰/۰۲۱۴		۲۴۸
۲۳	W		۰/۰۱۷۹		۲۵۲
۲۴	X		۰/۰۰۷۱		۲۶۰

بطور میانگین در لوکوس اول و دوم، معادل ۷/۰۷۱۱ ± ۱۹ الل مورد بررسی قرار گرفت و میانگین شاخص شاخص شانون (Shannon's index) ۰/۴۷± ۲/۶۵ بوده است (جدول ۱۱). هر دو لوکوس پلی‌مورفیک بوده و می‌توان اعلام نمود که ۱۰۰٪ لوسای بررسی شده پلی‌مورفیک بودند.

جدول (۱۱). تعداد نمونه‌های بررسی شده، تعداد الل و شاخص شانون براساس روش (Lewontin, 1972)

لوکوس	تعداد نمونه بررسی شده	تعداد الل	شاخص شانون
لوکوس اول	۲۸۰	۱۴	۲/۳۲۵۵
لوکوس دوم	۲۸۰	۲۴	۲/۹۹۳۷
میانگین	۲۸۰	۱۹	۲/۶۵۹۶
انحراف از معیار		۷/۰۷۱۱	۰/۴۷۲۵

در لوکوس اول در مجموع نمونه‌های بررسی شده در ۵ منطقه نمونه‌برداری ۴۳ ژنوتیپ مختلف مشاهده شد. بیشترین فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده در لوکوس اول مربوط به ژنوتیپ‌های GG (نوزده مورد)، HH (۱۸ مورد) و FF (۱۵ مورد) و EE (۹ مورد) مشاهده شدند. ژنوتیپ‌های دیگر مشاهده شده در لوکوس اول از فراوانی کمتری برخوردار بودند و حداکثر فراوانی ژنوتیپ در ۴ مورد و بقیه در حد ۱ الی ۳ مورد مشاهده شدند (جدول ۱۲).

تعداد ژنوتیپ‌های مشاهده شده در لوکوس دوم بمراتب بیشتر از لوکوس اول بوده و ۶۳ ژنوتیپ مختلف مشاهده شد. ولی فراوانی ژنوتیپ‌های کمتر از لوکوس اول بوده است. بیشترین فراوانی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ‌های MJ (۸ مورد)، JH (۷ مورد)، HF (۶ مورد) و FD (۱۵ مورد) بوده است و تکرار ژنوتیپ‌های دیگر پائین‌تر از مقادیر فوق بوده است (جدول ۱۳) .

جدول (۱۲). ژنوتیپ‌ها و تعداد مشاهده شده (O)، تعداد قابل انتظار (E) در لوکوس اول ماهی ازون‌برون

ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	تعداد قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)}{E}$	$2\times O\times L_n(O/E)$	ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	تعداد قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)}{E}$	$2\times O\times L_n(O/E)$
۱	BB	۲	۰/۳۷۶۳	۷/۰۰۴۹	۶/۶۸۱۶	۲۴	HH	۱۸	۴/۲۱۵۱	۴۵/۰۸۲	۵۲/۲۶۲
۲	CC	۳	۰/۲۳۶۶	۳۲/۲۸۲۰	۱۵/۲۴۱۰	۲۵	IC	۲	۰/۸۶۰۲	۱/۵۱۰۲	۳/۳۷۴۹
۳	DB	۱	۰/۶۴۵۲	۰/۱۹۵۲	۰/۸۷۶۵	۲۶	ID	۳	۰/۸۶۰۲	۵/۳۲۲۷	۷/۴۹۵۱
۴	DD	۲	۰/۲۳۶۶	۱۳۰۱۴۵۷	۸/۵۳۸۸	۲۷	IF	۳	۳/۰۸۲۴	۰/۰۰۲۲	۰/۱۶۲۶
۵	EB	۱	۱/۲۹۰۳	۰/۰۶۵۳	۰/۵۰۹۸	۲۸	IG	۲	۳/۸۷۱۰	۰/۹۰۴۳	۲/۶۱۱۴
۶	EC	۱	۰/۰۳۲۳	۰/۰۰۱۰	۰/۰۶۳۵	۲۹	II	۴	۰/۶۸۱۰	۱۶/۱۷۵۷	۱۴/۱۳۶۹
۷	EE	۹	۰/۹۸۹۲	۶۴/۸۷	۳۹/۷۵	۳۰	JB	۱	۱/۰۲۱۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۴۲۶
۸	FA	۳	۰/۰۷۸۹	۳/۴۲۱۰	۶/۱۳۶۳	۳۱	JF	۱	۲/۹۲۸۳	۱/۲۶۹۸	۲/۱۴۸۹
۹	FB	۱	۲/۳۱۱۸	۰/۷۴۴۴	۱/۶۷۶۱	۳۲	JG	۱	۳/۶۷۷۴	۱/۹۴۹۳	۲/۶۰۴۴
۱۰	FC	۱	۱/۸۴۹۵	۰/۳۹۰۲	۱/۲۲۹۸	۳۳	JH	۲	۳/۳۳۶۹	۰/۵۳۵۶	۲/۰۴۷۶
۱۱	FD	۱	۱/۸۴۹۵	۰/۳۹۰۲	۱/۲۲۹۸	۳۴	JJ	۷	۰/۶۱۲۹	۶۶/۵۶۰	۳۴/۰۹۶
۱۲	FF	۱۵	۳/۲۳۶۶	۰/۳۹۰۲	۱/۲۲۹	۳۵	KG	۱	۲/۹۰۳۲	۱/۲۴۷۷	۲/۱۳۱۶
۱۳	GA	۴	۱/۳۵۴۸	۴۲/۷۵۵	۴۶/۰۰۶	۳۶	KF	۱	۲/۳۱۱۸	۰/۷۴۴۴	۱/۶۷۶۱
۱۴	GB	۵	۲/۹۰۳۲	۵/۱۶۴۴	۸/۶۶۰۹	۳۷	KI	۱	۱/۰۷۵۳	۰/۰۰۵۳	۰/۱۴۵۱
۱۵	GD	۱	۲/۳۲۲۶	۱/۵۱۴۳	۵/۴۳۶۲	۳۸	KK	۶	۰/۳۷۶۳	۸۴/۰۳۴	۳۳/۲۲۸
۱۶	GE	۲	۴/۶۴۵۲	۰/۷۵۳۱	۱/۶۸۵۴	۳۹	LH	۱	۰/۵۲۶۹	۰/۴۲۴۸	۱/۲۸۱۶
۱۷	GG	۱۹	۵/۱۲۹۰	۱/۵۰۶۳	۳/۳۷۰۷	۴۰	LI	۱	۰/۲۱۵۱	۲/۸۶۵۱	۳/۰۷۳۷
۱۸	HB	۲	۲/۶۳۴۴	۳۷/۵۱۳	۴۹/۷۶۲	۴۱	MM	۲	۰/۰۲۱۵	۱۸/۰۲۵۱	۱۸/۱۳۰۴
۱۹	HC	۲	۲/۱۰۷۵	۰/۱۵۲۸	۱/۱۰۲۰	۴۲	NL	۱	۰/۰۳۲۳	۲۹/۰۳۲۳	۶/۸۶۸۰
۲۰	HD	۲	۲/۱۰۷۵	۰/۰۰۵۵	۰/۲۰۹۵	۴۳	NN	۱	۰/۰۱۰۸	۹۱/۰۱۱	۹/۰۶۵۲
۲۱	HE	۲	۴/۲۱۵۱	۰/۰۰۵۵ ۱/۱۶۴۰	۰/۲۰۹۵ ۲/۹۸۲۱						
۲۲	HF	۲	۷/۵۵۲۰	۴/۰۸۱۶	۵/۳۱۴۶						
۲۳	HG	۰	۹/۴۸۳۹	۹/۴۸۳۹	۰۰۰۰						

جدول (۱۳). ژنوتیپ‌ها و تعداد مشاهده شده (O) ، تعداد قابل انتظار (E) در لوکوس دوم در ماهی ازون‌برون

ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	تعداد قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)}{E}$	$2\times O\times L_n(O/E)$	ردیف	ژنوتیپ‌ها	تعداد مشاهده شده (O)	تعداد قابل انتظار (E)	$\frac{(O-E)}{E}$	$2\times O\times L_n(O/E)$
۱	BA	۱	۰/۰۴۳۰	۲۱/۲۹۳	۶/۲۹۲۶	۳۵	LL	۱	۰/۳۷۶۳	۱/۰۳۳۵	۱/۹۵۴۵
۲	CA	۲	۰/۰۷۵۳	۴۹/۲۱۸	۱۳/۱۱۹	۳۶	MJ	۸	۱/۲۴۷۳	۳۶/۵۵۸	۲۹/۷۳۵
۳	DA	۲	۰/۰۲۰۰۷	۱۶/۱۲۹	۹/۱۹۶۰	۳۷	MK	۲	۰/۸۱۷۲	۱/۷۱۱۹	۳/۵۸۰۱
۴	DB	۱	۰/۱۵۰۵	۴/۷۹۳۴	۳/۷۸۷۱	۳۸	MM	۱	۰/۲۳۶۶	۲/۴۶۳۸	۲/۸۸۳۱
۵	DD	۱	۰/۳۲۶۲	۱/۳۹۲۱	۲/۲۴۰۷	۳۹	NI	۲	۱/۳۶۲۰	۰/۲۹۸۸	۱/۵۳۶۳
۶	EB	۱	۰/۱۲۹۰	۵/۸۷۹۰	۴/۰۹۵۴	۴۰	NJ	۴	۱/۹۷۴۹	۲/۰۷۶۵	۵/۶۴۶۲
۷	EC	۲	۰/۳۰۱۱	۹/۵۸۶۸	۷/۵۷۴۲	۴۱	NK	۳	۱/۲۹۳۹	۲/۲۴۹۶	۵/۰۴۵۷
۸	FC	۱	۰/۴۷۶۷	۰/۵۷۴۴	۱/۴۸۱۷	۴۲	NL	۲	۱/۰۲۱۵	۰/۹۳۷۳	۲/۶۸۷۵
۹	FD	۵	۰/۹۵۳۴	۱۷/۱۷۵	۱۶/۵۷۱۵	۴۳	NN	۲	۰/۶۱۲۹	۳/۱۳۹۲	۴/۷۳۰۸
۱۰	FF	۱	۰/۶۱۲۹	۰/۲۴۴۵	۰/۹۷۹۱	۴۴	OL	۳	۰/۶۴۵۲	۸/۵۹۵۲	۹/۲۲۱۲
۱۱	GD	۳	۰/۹۰۳۲	۴/۸۶۷۵	۷/۲۰۲۴	۴۵	OO	۲	۰/۲۳۶۶	۱۳/۱۴۵۷	۸/۵۳۸۸
۱۲	GG	۲	۰/۵۴۸۴	۳/۸۴۲۵	۵/۱۷۵۷	۴۶	PL	۲	۰/۴۸۳۹	۴/۷۵۰۵	۵/۶۷۶۳
۱۳	HD	۱	۰/۹۵۳۴	۰/۰۰۲۳	۰/۰۹۵۴	۴۷	PP	۲	۰/۱۲۹۰	۲۷/۱۲۹۰	۱۰/۹۶۳
۱۴	HE	۲	۰/۸۱۷۲	۱/۷۱۱۹	۳/۵۸۰۱	۴۸	QA	۱	۰/۱۲۹۰	۵/۸۷۹۰	۴/۰۹۵۴
۱۵	HF	۶	۱/۲۹۳۹	۱۷/۱۱۷	۱۸/۴۰۹۱	۴۹	QN	۲	۰/۶۱۲۹	۳/۱۳۹۲	۴/۷۳۰۸
۱۶	HH	۲	۰/۶۱۲۹	۳/۱۳۹۲	۴/۷۳۰۸	۵۰	QQ	۲	۰/۱۲۹۰	۲۷/۱۲۹	۱۰/۹۶۳
۱۷	IE	۴	۰/۸۶۰۲	۱۱/۴۶۰	۱۲/۲۹۴۹	۵۱	RI	۱	۰/۵۷۳۵	۰/۳۱۷۲	۱/۱۱۲۱
۱۸	IF	۳	۱/۳۶۲۰	۱/۹۶۹۹	۴/۷۳۷۹	۵۲	RN	۲	۰/۵۴۴۸	۳/۸۸۶۹	۵/۲۰۱۹
۱۹	IG	۱	۱/۲۹۰۳	۰/۰۶۵۳	۰/۵۰۹۸	۵۳	RO	۱	۰/۳۴۴۱	۱/۲۵۰۳	۲/۱۳۳۷
۲۰	IH	۱	۱/۳۶۲۰	۰/۰۹۶۲	۰/۶۱۷۹	۵۴	RR	۲	۰/۱۰۰۴	۳۵/۹۵۷۵	۱۱/۹۶۹
۲۱	II	۲	۰/۶۸۱۰	۲/۵۵۴۷	۴/۳۰۹۳	۵۵	SO	۳	۰/۵۵۹۱	۱۰/۶۵۵۳	۱۰/۰۷۹
۲۲	JF	۱	۱/۹۷۴۹	۰/۴۸۱۳	۱/۳۶۱۰	۵۶	SP	۲	۰/۴۱۹۴	۵/۹۵۷۸	۶/۲۴۸۷
۲۳	JG	۷	۱/۸۷۱۰	۱۴/۰۶۱	۱۸/۴۷۲	۵۷	TO	۱	۰/۱۷۲۰	۳/۹۸۴۵	۳/۵۲۰۰
۲۴	JH	۱	۱/۹۷۴۹	۰/۴۸۱۳	۱/۳۶۱۰	۵۸	TP	۱	۰/۱۲۹۰	۵/۸۷۹۰	۴/۰۹۵۴
۲۵	JJ	۴	۱/۴۵۵۲	۴/۴۵۰۳	۸/۰۸۹۲	۵۹	TT	۱	۰/۰۲۱۵	۴۴/۵۲۲	۷/۶۷۸۹
۲۶	KE	۱	۰/۸۱۷۲	۰/۰۴۰۹	۰/۴۰۳۷	۶۰	UQ	۱	۰/۰۶۴۵	۱۳/۴۶۵	۵/۴۸۱۷
۲۷	KG	۳	۱/۲۲۵۸	۲/۵۶۷۹	۵/۳۷۰۱	۶۱	US	۱	۰/۰۹۳۲	۸/۸۲۴۰	۴/۷۴۶۲
۲۸	KH	۳	۱/۲۹۳۹	۲/۲۴۹۶	۵/۰۴۵۷	۶۲	VS	۱	۰/۲۷۹۶	۱/۸۵۶۵	۲/۵۴۹۰
۲۹	KI	۱	۱/۳۶۲۰	۰/۰۹۶۲	۰/۶۱۷۹	۶۳	VV	۲	۰/۰۵۳۸	۷۰/۴۵۴	۱۴/۴۶۵
۳۰	KK	۳	۰/۶۱۲۹	۹/۲۹۷۱	۹/۵۲۹۰	۶۴	WI	۱	۰/۳۵۸۴	۱/۱۴۸۲	۲/۰۵۲۱
۳۱	LE	۲	۰/۶۴۵۲	۲/۸۴۵۲	۴/۵۲۵۶	۶۵	WW	۲	۰/۰۳۵۸	۱۰۷/۶۳	۱۶/۰۸۷
۳۲	LF	۱	۱/۰۲۱۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۴۲۶	۶۶	XQ	۱	۰/۰۶۴۵	۱۳/۵۶۴۵	۵/۴۸۱۷
۳۳	LH	۱	۱/۰۲۱۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۴۲۶	۶۷	XV	۱	۰/۰۴۳۰	۲۱/۲۹۳۰	۶/۲۹۲۶
۳۴	LI	۲	۱/۰۷۵۳	۰/۷۹۵۳	۲/۴۸۲۳						

بعضی از ژنوتیپ‌های مشاهده شده در بین مناطق نمونه‌برداری بطور مشترک بودند ولی تعدادی ژنوتیپ‌های اختصاصی بودند که فقط در یک منطقه نمونه‌برداری مشاهده شد و می‌توان آنها را بعنوان ژنوتیپ اختصاصی نام برد. ژنوتیپ‌های اختصاصی هریک از مناطق نمونه‌برداری به تفکیک در جدول (۱۴) ارائه شده است.

جدول (١٤). ژنوتیپ‌های اختصاصی مشاهده شده در مناطق نمونه‌برداری. لوکوس اول با حروف انگلیسی بزرگ و لوکوس دوم با حروف کوچک

ردیف	سفیدرود		کورا		اورال		ولگا		جنوب شرقی خزر	
	لوکوس اول	دوم	لوکوس اول	دوم	لوکوس اول	دوم	لوکوس اول	دوم	لوکوس اول	دوم
۱	IL	cl	AF	tt	BJ	pp	BG	bh	BG	gj
۲	DH	ps	LN	ps	CI	fj	CC	ab	JJ	il
۳	BF	nn	EH	hi	IK	oo	FI	eo	BH	gk
۴	BD	in	BH	ad	FJ	hh	AF	eh	CH	kn
۵		ww	DG	be	FI	fi	CF	oo	CI	rr
۶		kk	AJ	ln	IM	cc	HL	jf	GJ	vv
۷		km	FK	aq	EM	ei	AG	ff	KK	sv
۸		ab	CE	vv		eh	GK	hh		qu
۹		dh	NN	nn		hj	JJ			cf
۱۰		hk		dd		vx				jm
۱۱		ce		ek		su				nq
۱۲				qq		pt				nr
۱۳				bd		ir				km
۱۴				ux		ik				ss
۱۵						or				ee
۱۶						rr				ac
۱۷						mm				fj
۱۸										gg
۱۹										dh
۲۰										df
۲۱										eh
۲۲										dd

ژنوتیپ‌های مشترک بین سفیدرود و کورا	←	GI, HJ
ژنوتیپ‌های مشترک بین سفیدرود و اورال	←	EG
ژنوتیپ‌های مشترک بین سفیدرود و ولگا	←	HH, GG, BD
ژنوتیپ‌های مشترک بین سفیدرود و جنوب شرقی خزر	←	KK, KM
ژنوتیپ‌های مشترک بین کورا و جنوب شرقی خزر	←	CC
ژنوتیپ‌های مشترک بین ولگا و جنوب شرقی خزر	←	FF, FH, FI

شاخص تثبیت Fixation index (Wright 1978) یا F_{is} بعنوان معیاری جهت اندازه‌گیری افزایش یا کاهش هتروزیگوت برای هریک از اللها و بطور مستقل برای هر لوکوس اندازه‌گیری شد. الل K در لوکوس اول با میزان عدد ۱ و الل w در لوکوس دوم با مقدار عددی F_{is} =۰/۷۹۶۴ بیشترین مقدار را داشتند. شاخص تثبیت کل در لوکوس اول مساوی با ۰/۵۷۸۴ و در لوکوس دوم معادل ۰/۲۲۰۴ بوده است (جدول ۱۵).

جدول (۱۵). مقادیر F_{is} برای اللهای مختلف در لوکوس اول و دوم ماهی ازون‌برون

ردیف	الل	F_{is}		ردیف	الل	F_{is}	
		لوکوس اول	لوکوس دوم			لوکوس اول	لوکوس دوم
۱		۰/۰۲۵۶	۰/۰۱۴۵	۱۳		۱/۰۰۰۰	۰/۱۲۹۴
۲	B	۰/۲۲۵۲	۰/۰۱۰۸	۱۴	N	۰/۶۶۳۱	۰/۱۵۳۱
۳	C	۰/۴۷۷۶	۰/۵۶۰۴	۱۵	O	***	۰/۳۰۳۵
۴	D	۰/۳۰۳۵	۰/۰۹۷۷	۱۶	P	***	۰/۴۲۶۰
۵	E	۰/۷۲۶۶	۰/۰۴۴۸	۱۷	Q	***	۰/۴۲۶۰
۶	F	۰/۶۴۲۸	۰/۰۴۰۱	۱۸	R	***	۰/۴۸۵۳
۷	G	۰/۶۳۲۹	۰/۱۶۸۸	۱۹	S	***	۰/۴۳۵۳
۸	H	۰/۶۷۸۴	۰/۱۵۳۱	۲۰	T	***	۰/۴۹۲۸
۹	I	۰/۳۵۳۸	۰/۱۳۸۵	۲۱	U	***	۰/۰۰۷۲
۱۰	J	۰/۷۱۷۷	۰/۱۹۲۲	۲۲	V	***	۰/۷۹۶۴
۱۱	K	۰/۷۸۸۷	۰/۲۶۶۰	۲۳	W	***	۰/۰۰۷۲
۱۲	L	۰/۱۰۸	۰/۰۸۴۳	۲۴	X	***	۰/۲۲۰۴
جمع						**۰/۵۷۸٤**	**۰/۲۲۰٤**

میزان F_{st} و مقدار مهاجرت ژنی (Gene flow) و تعداد ماهی در طی دوره رسیدن به سن بلوغ به مناطق مختلف مهاجرت می‌کنند (N_m) برای مجموع اللهای لوکوس اول و دوم محاسبه شد و مقادیر آن در جدول (۱۶) ارائه شده است. میزان N_m براساس فرمول $N_m = ۰/۲۵ (۱- F_{st})/F_{st}$ محاسبه شده است. بطور متوسط ۹ مولد در طی دوره زندگی به آبهای مختلف مهاجرت می‌کند.

جدول (۱۶). مقادیر F_{it} ، F_{st} ، F_{is} ، N_m در ماهی ازون‌برون

لوکوس	اندازه نمونه	F_{it}	F_{st}	F_{is}	N_m
لوکوس اول	۲۸۰	۰/۵۳۹۹	۰/۵۵۰۱	۰/۰۲۲۳	۱۰/۹۸۵۰
لوکوس دوم	۲۸۰	۰/۱۹۸۴	۰/۲۲۲۵	۰/۰۳۰۱	۸/۰۶۶۲
میانگین	۲۸۰	۰/۳۶۴۰	۰/۳۸۰۷	۰/۰۲۶۳	۹/۲۵۹۰

۲-۲-۳- میزان شباهت و فاصله ژنتیکی

براساس فرمول Nei (1972) میزان فاصله و شباهت ژنتیکی هریک از جمعیت‌ها محاسبه و در جدول (۱۷) ارائه شده است. فاصله ژنتیکی در مثلث پائین و شباهت ژنتیکی در مثلث بالا نشان داده شده است.

بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های ازون‌برون رودخانه ولگا و رودخانه سفیدرود وجود دارد که معادل ۰/۴۴۹۰ و سپس نمونه‌های جنوب شرقی دریای خزر (منطقه بندرترکمن) با رودخانه سفیدرود است که میزان آن برابر ۰/۳۳۶۱ می‌باشد. فاصله ژنتیکی جمعیت بین ازون‌برون رودخانه اورال و ولگا و همچنین جنوب شرقی دریای خزر با رودخانه ولگا در مراحل بعدی قرار دارد که مقادیر آن به ترتیب ۰/۳۸۲۱ و ۰/۳۸۱۶ می‌باشد (جدول ۱۷).

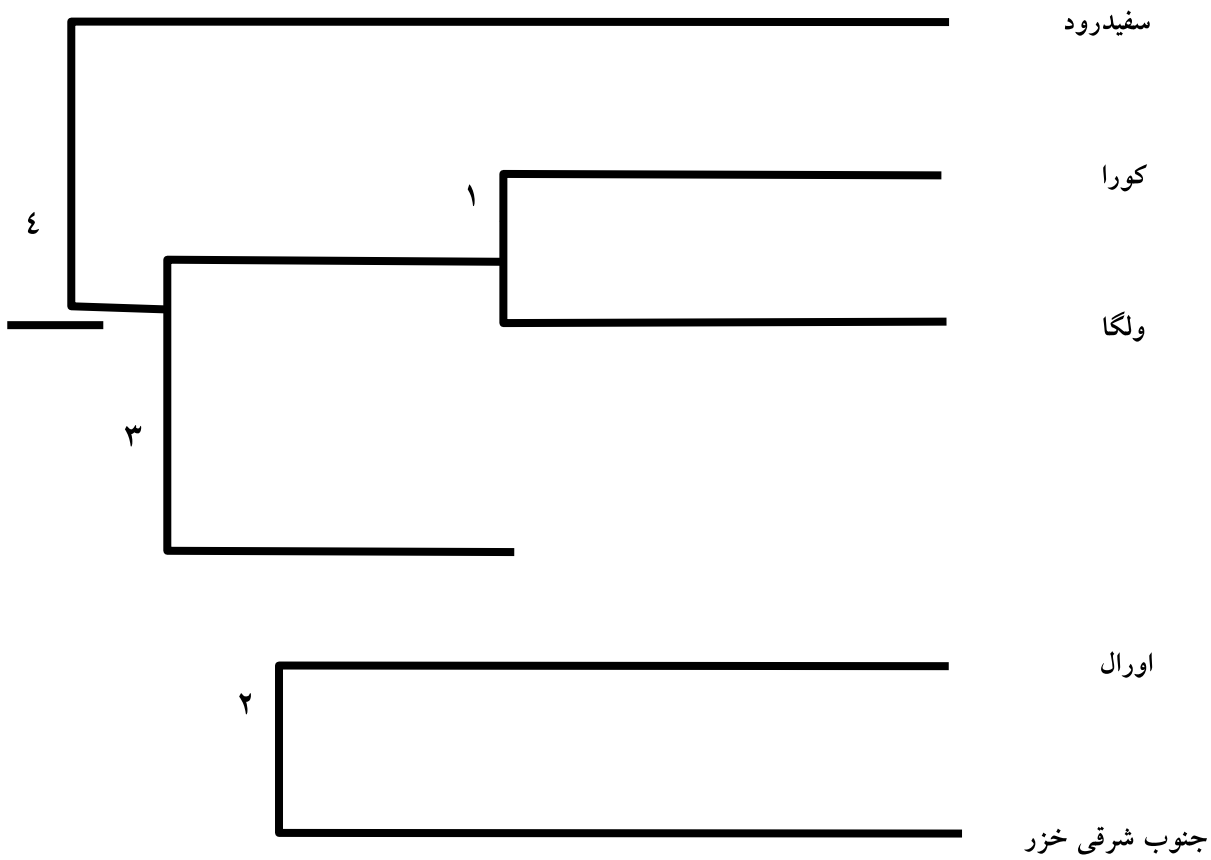
جدول (۱۷). میزان فاصله ژنتیکی (مثلث پائین) و شباهت ژنتیکی (مثلث بالا) ماهی ازون‌برون در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق پنج‌گانه مختلف

مناطق نمونه‌برداری	سفیدرود	کورا	اورال	ولگا	جنوب شرقی خزر
سفیدرود		۰/۷۷۳۰	۰/۷۵۴۳	۰/۶۳۸۳	۰/۷۱۴۶
کورا	۰/۲۵۷۴		۰/۸۰۴۲	۰/۸۱۳۹	۰/۷۸۲۱
اورال	۰/۲۸۱۹	۰/۲۱۲۸		۰/۶۸۲۴	۰/۷۵۷۹
ولگا	۰/۴۴۹۰	۰/۲۰۵۹	۰/۳۸۲۱		۰/۶۸۲۶
جنوب شرقی خزر	۰/۳۳۶۱	۰/۲۴۵۸	۰/۲۷۷۱	۰/۳۸۱۹	

۳-۲-۳- درخت تکاملی جمعیت‌های ماهی ازون‌برون

درخت تکاملی که براساس فاصله ژنتیکی Nei (1972) و بر مبنای روش UPGMA محاسبه شده پنج جمعیت ازون‌برون دریای خزر را بشرح ذیل در ۴ شاخه تکاملی تقسیم‌بندی نمود. ماهی ازون‌برون جمعیت رودخانه

سفیدرود بعنوان یک جمعیت مستقل بوده و کاملاً از جمعیت‌های دیگر ماهی ازون‌برون مستقل می‌باشد. ۲ کلاستر دیگر توسط درخت تکاملی تشکیل گردید که بر مبنای آن جمعیت‌های ازون‌برون رودخانه‌های کورا و ولگا با همدیگر و جمعیت‌های اورال و جنوب شرقی دریای خزر (منطقه ساری و گرگان) با همدیگر در یک گروه قرار گرفتند. میزان فاصله ژنتیکی جمعیت‌های اورال و جنوب شرقی دریای خزر نسبت به رودخانه سفیدرود کمتر از فاصله ژنتیکی جمعیت‌های ولگا و کورا است و ذخایر ازون‌برون این رودخانه مستقل‌تر و از لحاظ ژنتیکی به همدیگر نزدیکتر هستند (نمودار ۲).



نمودار (۲). درخت تکاملی ارتباط با جمعیت‌های ماهی ازون‌برون در دریای خزر

٤-٢-٣- ساختار جمعیت و تست هتروژنی

براساس محاسبات X^2 و G^2 برمبنای فراوانی اللهای مختلف در لوکوس اول و دوم با ۱۰۰۰ بار تکرار پذیری میزان متفاوت بودن جمعیت‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

در لوکوس اول میزان X^2=۸۸/۰۱۹۴ و درجه آزادی آن ۵۲ بوده و میزان P≤0.0013 محاسبه گردید. در حالیکه میزان G^2=۸۸/۶۲۷، درجه آزادی ۵۲ و میزان P≤0.0012 برآورده شده است و هر دو پارامتر X^2 و G^2 بیانگر آن است که از لحاظ هتروژنیتی اختلاف معنی‌داری در فراوانی اللها وجود دارد و هریک از جمعیت‌ها یک جمعیت مستقل هستند.

در لوکوس دوم میزان X^2=۱۶۲/۱۰۰ و G^2=۱۸۳/۷۷۷ و درجه آزادی آنها DF=۹۲ و میزان احتمال برای X^2 P≤0.000009 و برای G2 میزان احتمال P≤0.000000 بوده و بیانگر آن است که جمعیت‌های بررسی شده براساس فراوانی اللها در لوکوس دوم دارای اختلاف معنی‌داری بوده و از همدیگر متمایز بوده و هریک بعنوان جمعیت مستقل بشمار می‌روند.

٤- بحث و نتیجه گیری

تحقیق و مطالعه بر روی ساختار ژنتیک ذخایر آبزیان جهان از چند دهه پیش آغاز شده است. در اوایل از روش لوسای کدگذاری کننده پروتئین (آلوزایم) مورد استفاده قرار می گرفت (Utter *et al*., 1987) و در اواسط دهه ۱۹۸۰ روش mtDNA مورد استفاده قرار گرفت (Avise 2004) و اخیراً روش microsatellite بعنوان یک روش بسیار مناسب و قوی برای بررسی ساختار ژنتیکی ذخایر و همچنین ارتباط والدین با فرزندان ابداع و مورد استفاده قرار گرفت (Koskinen *et al*., 2002).

گرچه روشهای مختلف مولکولی برای ارزیابی ساختار ژنتیکی آبزیان وجود دارد ولی هر یک از آنها به تناسب نوع کاربردشان دارای مزایا و معایبی هستند. بعنوان مثال استفاده از مارکرهای بیوشیمیائی و آلوزایم نیاز به بافت تازه از اندامهای ماهیچه، کلیه، کبد و چشم می‌باشد که از سویی، حتماً ماهی یا هر نوع آبزی مورد مطالعه باید کشته شود و از سوی دیگر، نمونه بافت باید بنحوی به آزمایشگاه منتقل شود که آنزیم‌های مورد نظر شکسته نشده و قابل بررسی باشند. در روشهای mtDNA و RAPD گرچه می‌توان از باله ماهی (بدون آنکه ماهی کشته شود) برای استخراج DNA و آنالیز PCR استفاده نمود ولی در روش mtDNA شانس یافتن لوکوس پلی مورفیک کم است و هزینه آن برای خرید آنزیم‌های قطع کننده (Restriction Enzyme) بالاست و بیشتر وراثت مادری را تعقیب می نماید. و روش RAPD هم امکان تکرارپذیری نتایج وجود ندارد. در حالیکه اغلب لوسای میکروستلایت پلی مورفیک بوده و تعداد الل در هر لوکوس اغلب بیشتر از لوسای مطالعه شده به روش آلوزایم است (May *et al*., 1997). با توجه به دلایل فوق، طی چند سال اخیر روش مطالعه microsatellite یکی از مناسب‌ترین روش مطالعه مارکرهای مولکولی با دامنه کاربرد بسیار وسیع در انواع موجودات شناخته نشده است. برخورداری از درصدپلی‌مورفیسم بالا و ساده بودن روش شمارش باندهای DNA دو دلیل اصلی شناخته شده برتری روش میکروستلایت نسبت به سایر روشهای مولکولی اعلام گردیده است. طی بررسی انجام شده طی سالهای ۲۰۰۱-۲۰۰۰ فقط برای روش جداسازی مایکروستلایت در موجودات مختلف بیش از ۳۰۲ گزارش مشاهده گردید (Zane *et al*., 2002) این امر بیانگر آن است که روش مایکروستلایت دامنه کاربرد وسیعی در مطالعات ژنتیک مولکولی داشته و دقت و سرعت آن بمراتب بیشتر از سایر روشهای مولکولی متداول بوده است. هدف اصلی بکارگیری مارکرهای مولکولی برای حفاظت و بهره‌برداری پایدار ذخایر، یافتن تمایز جمعیت‌ها و

ذخایر متفاوت متعلق به یک گونه و قرار دادن اطلاعات و آمار فوق در اختیار تصمیم‌سازان برای اعمال مدیریت اصولی و پایدار است (Carvalho and Pitcher, 1994).

از لحاظ مدیریت شیلاتی، هدف اصلی تعیین ساختار جمعیت بین و یا درون گونه‌ای مشخص کردن، گله‌ها یا جمعیت‌هایی که تبادل ژنی محدود (Limited gene flow) دارند، می‌باشند. اگر ذخایر چنین جمعیت‌هایی بیش از حد مجاز صید و بهره‌برداری شود از آنجائیکه تبادل ژنی و مهاجرت بین آنها صورت نمی‌گیرد، ذخایر جمعیت و گله آبزیان فوق بشدت کاهش و در مدت بسیار اندک منقرض خواهد شد. به همین دلیل است که در کشورهای پیشرفته نه تنها مدیریت ذخایر گونه‌ای بلکه به زیرگونه و جمعیت‌های مختلف تشکیل دهنده یک گونه اهمیت و توجه خاص قائل هستند و در مدیریت برنامه‌ریزی خود الحاظ می کنند.

براساس مروری که بر مطالعات انجام شده در ساختار ژنتیک جمعیت آبزیان آبهای شیرین و آبهای دریائی صورت گرفت (Ward *et al*., 1994, Dewoody & Avise 2000) مشخص گردید که میزان سطح تنوع ژنتیکی در این دو سری از آبزیان با همدیگر متفاوت است. میزان تفاوت و یا تمایز ژنتیکی بین جمعیتی در آبزیان دریای زی کمتر از آبزیان آبهای شیرین است (Dewoody and Avise 2000) . علت پائین بودن تنوع ژنتیکی در آبزیان دریائی بالا بودن اندازه جمعیت مؤثر و یا بالا بودن میزان مهاجرت در آبزیان دریائی در مقایسه با آبزیان آب شیرین در رودخانه‌ها و یا دریاچه‌ها مختلف که امکان مهاجرت فی‌مابین آنها از یک رودخانه بر رودخانه دیگر کمتر است. با توجه به پائین بودن اندازه جمعیت مؤثر آبزیان آبهای شیرین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که احتمال انقراض گونه‌های آب شیرین و همچنین ماهیان مهاجر (رود کوچ مثل تاسماهیان) بیشتر از گونه‌های دریائی است، گرچه نمی‌توان نتیجه‌گیری نمود که ماهیان دریائی از این مستثنی هستند زیرا که فشار صید و آلودگی‌ها می‌تواند نتایج و اثر مشابه‌ای داشته باشد.

با توجه به کلیات فوق به بحث و تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از مطالعات میکروستلایت به تفکیک در گونه‌های تاسماهی ایرانی و ماهی ازون‌برون بشرح ذیل اشاره می‌گردد.

۱-٤- تاسماهی ایرانی

براساس مطالعات انجام شده توسط (Pervaryukha, 1995) ۲ نژاد بهاره و پائیزه از تاسماهی ایرانی در دریای خزر وجود دارد و براساس مطالعات آنتی‌ژن اختصاصی می‌توان این دو نژاد را بخوبی از همدیگر تفکیک نمود. مطالعات فوق مربوط به آبهای شوروی سابق بوده است. در آبهای ایران براساس مطالعات انجام شده توسط Rostami, 1961 دو نژاد بهاره و پائیزه از تاسماهی ایرانی در فصل مهاجرت در رودخانه سفیدرود گزارش شده است. نتایج تحقیق فوق به بیش از ۴۴ سال قبل بر می‌گردد و شرایط فعلی رودخانه سفیدرود با توجه به سد احداث شده در این رودخانه و فشار صید ذخایر تاسماهی ایرانی و از همه مهمتر توجه ویژه به تکثیر مصنوعی نژاد بهاره در مراکز تکثیر وپرورش تاسماهی ایرانی، بنظر می‌رسد که نژاد پائیزه شانس تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی را نداشته باشد و در صورت بی توجهی و برنامه‌ریزی دقیق احتمال انقراض نژاد پائیزه آن در زیستگاه اصلی این گونه می‌رود.

اولین مطالعات مولکولی بر مبنای DNA برروی تاسماهی ایرانی توسط Pourkazemi, 1996 صورت گرفت که براساس آن بخشی از ژن ND5 در میتوکندری، کلون و توالی‌یابی شد و این توالی با توالی تاسمای روسی مورد مقایسه قرار گرفت . نتایج نشان داد که بین این دو گونه در همین قطعه کوچک از ژن ND5 ۲/۲درصد تفاوت ژنتیکی وجود دارد و براساس مقیاس و محاسبات تکاملی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این دو گونه بیش از یک میلیون سال پیش از همدیگر تفکیک شده‌اند. اولین مطالعه مولکولی به روش Direct Sequencing در تاسماهی ایرانی توسط Rezvani, 1997 صورت گرفت. در این بررسی توالی بخشی از ژن ND5 که توسط Pourkazemi, 1996 جداسازی شده بود برای مطالعه تاسماهی ایرانی در ناحیه ۱ (استان گیلان) و ناحیه۴ (بندر ترکمن) مورد استفاده قرار گرفت. و ۳ نمونه از ناحیه ۱ و ۲ نمونه از ناحیه ۴ توالی ND5 مشخص شد و مجموعاً ۲۱۳ و ۲۸۰ جفت باز برای ۵ نمونه بدست آمد و پس از آنالیز آماری نتایج نشان داد که گرچه توالی‌های فوق اطلاعات بسیار ارزشمندی برای فیلوژنی گونه فوق ارائه می‌دهد ولی اطلاعات کمتری برای مطالعه ساختار جمعیت تاسماهی ایرانی می‌توان استخراج نمود و اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های بررسی شده مشاهده نشد.

عطایی (۱۳۸۱) با استفاده از ژن ناحیه D- Loop میتوکندری ۹۰ نمونه تاسماهی ایرانی جمع‌آوری شده از غرب گیلان (۳۰ نمونه)، منطقه سفیدرود (۳۰ نمونه) و منطقه بندرترکمن (۳۰ نمونه) با استفاده از روش PCR تکثیر و

سپس با آنزیم‌های قطع کننده آنها را برش داد و فراوانی الل، ژنوتیپ و هاپلوتیپ‌ها را مورد مقایسه قرار داد. گرچه تنوع ژنتیکی (پلی مورفیسم) و همچنین هتروپلاسمی در بین نمونه‌ها مشاهده شده ولی تست Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار مشابه‌سازی اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از سه منطقه از خود نشان نداد.

نتایج این بررسی با استفاده از روش میکروستلایت که برای اولین بار صورت می گیرد نشان داد که اولاً روش میکروستلایت روشی بسیار مناسب برای نشان دادن پلی‌مورفیسم در تاسماهی ایرانی است. در مجموع ۳۵ الل در لوکوس اول و دوم مشاهده شد که رقم بسیار قابل توجهی است. همچنین ۳۰ ژنوتیپ مختلف در لوکوس اول و ۴۶ ژنوتیپ در لوکوس دوم نشانگر درصد بالا تنوع ژنتیکی در این گونه است. ژنوتیپ‌های مشترک نشان می‌دهد که تاسماهی ایرانی در طول دوره زندگی خود به تمام سواحل شرقی و غربی از آستارا تا بندرترکمن مهاجرت می‌کند ولی در عین حال ژنوتیپ‌های اختصاصی برای هریک از نقاط نمونه‌برداری (جدول ۳) مشاهده شد که بیانگر مارکر مولکولی و اختصاصی هریک از جمعیت‌ها می‌باشد.

تمایز جمعیت‌ها و رابطه درخت تکاملی بیانگر آن است که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود بعنوان یک جمعیت مستقل بوده و حتی در سواحل جنوبی دریای خزر از همدیگر متمایز می‌باشند و از لحاظ فراوانی الل و ژنوتیپ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. نکته حائز اهمیت این است که نمونه‌های تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود علیرغم اینکه از لحاظ موقعیت جغرافیائی در حد واسط ۲ منطقه دیگر مورد بررسی (ناحیه ۱ شیلات آستار تا بندرانزلی و ناحیه ۴ منطقه بندرترکمن) واقع شده است ولی جمعیت تاسماهی ایرانی آن متمایز از سایر جمعیت‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج فوق می‌بایست برنامه‌ریزی جامع برای حفظ ذخایر ژنتیکی تاسماهی ایرانی خاص رودخانه سفیدرود نمود، از لحاظ تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی به این امر باید توجه خاص صورت پذیرد. با توجه به فشار صید قانونی و غیرقانونی بر ذخایر تاسماهیان ضرورت دارد که طرح مدیریت ذخایر گونه‌ای و حتی برحسب جمعیت‌ها تدوین گردد تا در تکثیر مصنوعی :

الف) از مولدین خاص رودخانه سفیدرود برای تکثیر طبیعی و یا مصنوعی استفاده شود و از تلاقی با جمعیت‌های دیگر تاسماهی ایرانی جداً خودداری گردد.

ب) میزان فراوانی این جمعیت خاص در کل صید تاسماهی ایرانی در آبهای ایران مشخص شود و در صورت امکان از فشار صید بر روی جمعیت در حال انقراض جلوگیری گردد.

ج) تشکیل بانک ژنی زنده از بچه ماهیان تولید شده خاص رودخانه سفیدرود در اولویت قرار گیرد تا در صورت انقراض احتمالی در دریا بتوان با رعایت اصول ژنتیکی ذخایر ارزشمند این گونه را بازسازی نمود.

۲-٤- ماهی ازون‌برون

ذخایر ماهی ازون‌برون در دریای خزر بعنوان یکی از ذخایر مشترک تاسماهیان محسوب می‌شود زیرا این گونه از یک طرف به رودخانه‌های اصلی کشورهای آذربایجان، روسیه، قزاقستان و ایران برای تخم‌ریزی مهاجرت می‌کند و از طرف دیگر توسط ۵ کشور ساحلی خزر مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. در گذشته ماهی ازون‌برون یکی از گونه‌های اصلی صید تجاری تاسماهیان را تشکیل می‌داد و در بعضی از کشورهای حاشیه خزر مثل قزاقستان تا ۸۰درصد مولدین مهاجر را تشکیل می‌دهد. در شرایط فعلی دریای خزر یکی از گونه‌هایی که بیشترین کاهش را از لحاظ صید نشان می‌دهد گونه ازون‌برون می‌باشد که علت اصلی آن صید بی‌رویه در دریای خزر، کاهش تخم‌ریزی طبیعی، کاهش بازسازی ذخایر و همچنین اثر آلودگی‌های دریای خزر می‌باشد. با توجه به مشترک بودن ذخایر این گونه انجام مطالعات ژنتیک جمعیت، شناسایی و تفکیک هریک از جمعیت‌های ازون‌برون در اولویت خاص قرار می‌گیرد که در این بررسی تا حدی به آن اشاره شده است.

براساس اولین تقسیم‌بندی ماهی‌شناسی که Berg در سال ۱۹۳۳ انجام داد، دو شکل یا فرم از ماهی ازون‌برون در شمال و جنوب دریای خزر گزارش نمود که از لحاظ بیولوژی، زمان تخم‌ریزی، سرعت رشد و هم‌آوری با همدیگر متفاوت بودند و بعدها این امر توسط Borzenko در سالهای ۱۹۶۲ و ۱۹۶۴ گزارش گردید. Pervaryukha در سال ۱۹۹۵ براساس مطالعات آنتی ژنی سه جمعیت ازون‌برون ولگا، اورال و کورا را گزارش نمودند. مطمئناً بررسی‌های وی براساس نمونه‌های جمع‌آوری شده از ماهی ازون‌برون در آبهای شوروی سابق دریای خزر می‌باشد و نتوانسته از آبهای جنوبی دریای خزر (آبهای ایران) نمونه‌برداری نماید. وی همچنین اعتقاد دارد که هریک از جمعیت‌های فوق از دو نژاد بهاره و پائیزه هم تشکیل یافته است.

Chikachev (1983) اولین فردی بود که مطالعات بیوشیمیایی به روش آلوزایم برروی ماهی ازون‌برون دریای خزر (از بخش شمالی خزر) انجام داد وی در لوسای پلی‌مورفیک را ۲۶/۸ درصد و متوسط هتروزیگوسیتی را ۰/۰۶۱ درصد گزارش نمود. تعداد الل در هر لوکوس در حد ۱/۷۵ گزارش گردید.

Rybova and Kutergina در سال ۱۹۹۰ مطالعات بیوشیمیایی (آلوزایم) بر روی ۹۰۰ نمونه ماهی ازون‌برون جمع‌آوری شده از بخش شمالی دریای خزر را مورد مطالعه قرار دادند.

درصد لوسای پلی‌مورفیک در بررسی فوق ۳۷/۵ درصد و درصد هتروزیگوسیتی در حد ۰/۰۹۳ درصد بوده است تعداد الل درهر لوکوس در حد ۱/۵ عدد گزارش شده است.

Pourkazemi در سال ۱۹۹۶ مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی بر روی ذخایر جمعیت ماهی ازون‌برون در جنوب دریای خزر انجام داد. براساس نتایج بررسی از طریق آلوزایم سطح پلی‌مورفیسم بالایی درتمامی نمونه‌های مورد بررسی شده مشاهده نمود و درصد هتروزیگوسیتی آن در حد ۰/۰۲ ± ۰/۱۰۸ تقریباً دو برابر سایر گونه‌ها بوده است. حالت دوبرابر شدن ژنی (gene duplication) در ۱۰ آنزیم مشاهده نمود و۶۴/۳درصد لوسای بررسی شده حالت پلی‌مورفیک داشتند. ولی میزان فاصله ژنتیکی مناطق مورد بررسی پائین Nei, D=0.01 و تست هتروژینیتی اختلاف معنی‌داری را بین مناطق بررسی شده نشان نداد.

ژن ND 5/6 میتوکندری ماهی ازون‌برون جنوب دریای خزر جمع‌آوری شده از مناطق آستارا در استان گیلان تا بندرترکمن در استان گلستان به روش RFLP مورد بررسی قرار گرفت (Pourkazemi, 1996) . محصول PCR با ۲۱ آنزیم قطع کننده بررسی شد و ۹ هاپلوتیپ مختلف در جمعیت ماهی ازون‌برون مشاهده گردید ولی اختلاف معنی‌داری براساس تست Monte-Carlo در مناطق نمونه‌برداری مشاهده نگردید.

بررسی جمعیت‌های ماهی ازون‌برون دریای خزر به روش مایکروستلایت برای اولین بار در این تحقیق صورت گرفته است و تاکنون گزارشی نشده است . نتایج این بررسی نشان می‌دهد که روش مایکروستلایت روش بسیار قوی برای تمایز جمعیت‌ها از همدیگر می‌باشد زیرا که ۳۸ الل در دو لوسای مشاهده شد که ۱۴ الل مربوط به لوکوس اول و ۲۴ الل در لوکوس دوم و بطور میانگین ۷ ± ۱۹ الل بررسی شد که چندین برابر بیشتر از مطالعات قبلی است. با توجه به بالا بودن تعداد الل در هر لوکوس مجموعاً ۱۱۰ ژنوتیپ در۵ منطقه مورد بررسی مشاهده شد که ۴۳ ژنوتیپ مربوط به لوکوس اول و ۶۷ ژنوتیپ مربوط به لوکوس دوم بوده است. بالا بودن تعداد ژنوتیپ‌ها از سویی بیانگر توانایی بسیار بالا روش مایکروستلایت در مطالعات ژنتیک جمعیت است و از سوی دیگر، به رغم فشار صید پیرامون ذخایر ازون‌برون هنوز پلی‌مورفیسم و تنوع درون جمعیتی در ماهی ازون‌برون

دریای خزر وجود دارد. گرچه در صورت انجام این گونه مطالعات در گذشته و مقایسه آن با نتایج فعلی می‌توان میزان کاهش و مقدار از دست دادن تنوع ژنتیکی را ارزیابی کرد.

مشاهده ژنوتیپ‌های اختصاصی و مشترک از ماهی ازون‌برون کاربردهای متعددی را می‌توان داشته باشد با استفاده از ژنوتیپ‌های اختصاصی می‌توان بانک ژنی جمعیت مزبور را تشکیل داد و در تکثیر مصنوعی و یا طبیعی از ذخایر فوق استفاده کرد. بویژه اینکه نمونه‌های مطالعه شده در این بررسی از داخل رودخانه‌ها جمع‌آوری گردیده است (بغیر از تعدادی از رودخانه‌های حاشیه رودخانه سفیدرود و احتمالاً رودخانه کورا که از مصب آن و در دریا جمع‌آوری شده است).

ژنوتیپ‌های مشترک بین رودخانه‌های ولگا و اورال با سواحل جنوبی دریای خزر از کورا، سفیدرود و جنوب شرقی دریای خزر (منطقه ساری و بندرترکمن) بیانگر آن است که ماهی ازون‌برون رودخانه ولگا و اورال برای تغذیه به سواحل جنوبی خزر مهاجرت کرده و مورد صید و بهره‌برداری قرار می‌گیرند و از طرف دیگر ۱۲ ژنوتیپ دیگر ۱۲ ژنوتیپ مشترک گزارش شده اثبات دیگری بر مهاجرت بین جمعیت‌های مختلف ازون‌برون دریای خزر است که از لحاظ مدیریتی باید به آن توجه خاص معطوف داشت.

بیشترین فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) بین نمونه‌های ازون‌برون رودخانه ولگا و رودخانه سفیدرود و در حد ۰/۴۴۹ نشان داد و سپس نمونه‌های شرق و غرب بخش جنوبی دریای خزر بیشترین تمایز ژنتیکی را نشان دادند.

درخت فیلوژنی حاصل از محاسبات UPGMA وضعیت بسیار روشن و جالبی از جمعیت‌های مختلف ازون‌برون دریای خزر نشان داد و به ۴ کلاستر تقسیم‌بندی نمود. نمونه‌های رودخانه سفید با بیشترین فاصله ژنتیکی در یک شاخه قرار گرفت. نمونه‌های رودخانه کورا و ولگا در یک گروه تقسیم‌بندی شدند و شباهت ژنتیکی نزدیک به همدیگر دارند و احتمال می‌رود نمونه‌های ارسالی از آذربایجان از سواحل این کشور جمع‌آوری شده باشد و از ماهیان ازون‌برون کشور روسیه که به سواحل جمهوری آذربایجان مهاجرت کرده بودند صید گردیدند. نمونه‌های رودخانه اورال و جنوب شرقی دریای خزر در یک تقسیم‌بندی و کلاستر قرار گرفتند که از یک طرف شباهت ژنتیکی این دو منطقه را نشان می‌دهد و از طرف دیگر بیانگر آن است که ماهی ازون‌برون رودخانه اورال جهت تغذیه به سواحل جنوب شرقی دریای خزر هم مهاجرت می‌کند.

تست هموژینیتی با احتمال $P\leq0.001$ و حتی $P\leq0.000$ متمایز بودن جمعیت‌ها را نشان داده است و اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها و جمعیت‌های مناطق مورد بررسی نشان داده است.

۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۱- نتایج حاصله از این بررسی نشان داد که روش مایکروستلایت روشی بسیار قوی برای تمایز جمعیت‌ها و ذخایر یک گونه بوده و براحتی قادر است جمعیت‌های مختلف یک گونه را در یک اکوسیستم مشترک از همدیگر تفکیک نماید. با توجه به مقایسه انجام شده در این بررسی بین روش آلوزایم، DNA میتوکندری، RAPD و روش مایکروستلایت، مشخص گردید که این روش از توانایی بسیار بالاتری برخوردار است و توصیه می‌گردد در مطالعات ژنتیک جمعیت از این روش استفاده گردد.

۲- براساس الل‌ها و ژنوتیپ‌های مشاهده شده در تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر، مشخص گردید که حداقل ۳ جمعیت از تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد. جمعیت بسیار متمایز رودخانه سفیدرود و جمعیت‌های غرب و شرق در سواحل جنوبی دریای خزر. در مرحله اول توصیه می‌گردد ذخایر جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود به بهترین نحو و بر مبنای اصول ژنتیکی مورد حفاظت قرار گیرد و طرح جامع حفاظت آن در دستور کار قرار گیرد. ثانیاً در بازسازی ذخایر به روش تکثیر مصنوعی توجه ویژه‌ای به خلوص ژنتیکی آن مبذول شود. در سالهای اخیر با توجه به کاهش مولدین نر و ماده مهاجر به رودخانه سفیدرود باید برنامه‌ریزی اختصاصی برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه در رودخانه سفیدرود بعمل آید.

۳- نتایج بررسی ازون‌برون نشان داد که ماهی ازون‌برون رودخانه سفیدرود یک جمعیت مستقل بوده و سایر جمعیت‌های ولگا، اورال، کورا به راحتی قابل تفکیک هستند. همانند تاسماهی ایرانی توصیه می‌گردد توجه خاص به ذخایر ماهی ازون‌برون سفیدرود بشود بخصوص که ذخایر این جمعیت شدت در حال کاهش و در مرحله بسیار بحرانی در خطر انقراض قرار گرفته است. توصیه می‌گردد در تکثیر مصنوعی به این امر توجه ویژه‌ای بشود و از تلاقی ماهی ازون‌برون جمعیت‌های دیگر با ماهی ازون‌برون جمعیت سفیدرود جداً خودداری شود.

۴- توصیه می‌گردد برنامه جامع ژنتیکی حفاظت ذخایر تاسماهی ایرانی و ماهی ازون‌برون و حتی سایر گونه‌های تاسماهیان (فیلماهی، شیپ و تاسماهی روسی) نژاد سفیدرود تدوین و با حمایت مالی طی یک

برنامه ۵ ساله اجرا گردد تا با روند کاهش ذخایر و کمبود مولدین با مشکل اندازه جمعیت مؤثر مواجه نشویم.

۵- توصیه می‌گردد مطالعات جمعیت تاسماهیان بر روی ۵ گونه تاسماهیان دریای خزر و با استفاده از پرایمرهای مختلف ادامه یابد. علی‌الخصوص نمونه‌های صید شده در گشت ارزیابی ذخایر مورد مطالعه قرار گیرد تا مشخص شود که چه درصدی از ماهیان صید شده متعلق به کدام منشاء و نژاد هستند.

منابع

آرتوخین، ی. ی. (۱۹۸۳). تمایز جمعیت‌های تاسماهی ایرانی و امکان تکثیر مصنوعی آنها در منطقه ولگا، ترجمه یونس عادلی. مرکز تحقیقات شیلات گیلان. بندرانزلی.

بارانیکووا، ا. (۱۳۷۷). فیزیولوژی و بیوشیمی تاسماهیان. گزارش دوره آموزشی گردآوری شده توسط کاظمی، ر. بهمنی، م. پورکاظمی، م و ب. تیزکار. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۲۱ صفحه.

پرواریوخا، یو. ن. (۱۳۷۴). مطالعه ژنتیک جمعیتی در استفاده صنعتی از تاسماهیان. مجموعه سخنرانی‌ها. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری. رشت.

قرائی، ا (۱۳۸۰). تشخیص مولکولی دو گونه تاسماهی ایران و تاسماهی روس با استفاده از روش RAPD، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته شیلات، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران.

کیوانفر، ا. (۱۹۷۸). پایان‌نامه دکترای علوم ماهی‌شناسی. ارائه شده در ارتباط با ماهیان خاویاری سواحل جنوبی دریای خزر. دانشگاه پی‌یر ماری کوری پاریس. ص ۵۱-۴۳.

نصری چاری، ع (۱۳۷۲). بررسی مقایسه‌ای پارامترهای مورفوبیولوژیک چالباش و قره‌برون سواحل جنوبی دریای خزر در جهت تغذیه استقلال قره‌برون به عنوان گونه تاسماهی ایران. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، رشته شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Allendorf, F., Ryman, N. and Utter, F. (1987). Genetics and fishery management: past, present and future. In Ryman, N. and Utter, F., eds. Population Genetics and Fishery Management SeattIe and london: Univ. Washington press. 1-20.

Artyukhin, E. N., (1979). Persian sturgeon in the rivers of the North Caspian and prospects of its use in sturgeon fishery. In Biological bases of sturgeon fishery in water reservoirs of the USSR M. pp: 105-115 (in Russia).

Artyukhin, E. N., (1983). Differentiation of Persian sturgeon population and possibilities of its inbreeding on Volga. In Biological Bases of sturgeon culture. Ed. Nauka. M., 54-61 (in Russia)

Artyukhin, E. N., and Zarkua, Z. G., (1986). Taxonomic status of sturgeon of the Rioni River (Black Sea basin). Voprosy Ikhtiologii 1: 61-67.

Avise, J. C., Berminghom, E., Kessler, L. G. and Saunder, N. C. (1984). Characterisation of mtDNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish *(L. macrochinus).* Evolution. 38. 931-41.

Avise, J. C. (2004). Molecular markers, natural history and evolution, 2nd edition. Chapman & Hall, New York, USA, 511 pp.

Bentzen, P., Harris, A. S. and Wright, J. M. (1991). Clonning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprints of important aquaculture species of salmonids and tilapia. In Burke, T., Dolf, G. eds. DNA fingerprinting Approaches and Application. Basel , Switzerland, pp. 243-262.

Berg, L. S., (1933). Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Part 2., Nauka, USSR, Moscow.

Blankenship, H. L., Leber, U. M., (1995). A responsible approach to marine stock enhancement. American Fisheries Society Symposium. 15: 167-175.

Borzenko, M. P., (1942). "The Caspian sturgeon", No. 7, Izv. Azerbaidzhansk. Naucho-Issl. Rybokhoz. Stantsii, Baku, p.114.

Borzenko, M. P., (1964). Sovremennoe sostoyanie I prognoz izmeneii zapasov sevryugi v Kaspiiskom more pri zaregulirovannom stoke. Trudy VNIRo 52:259-286.in *Freshwater fishes of Europe*, vol. 1, part 2. page 402, General introduction to fisheses. Acipenseriforms edt. J. Holcik. AULA. Verlag. Wiesbaden, Germany.

Carvalho, G. R. and Pitcher T. J. (1994). Molecular genetic in fisheries. Chapman & Hall, London, 131 pp.

Chikhachev, A. S., (1983). Monitoring the genetic structure of populations and hybridizations of valuable fish species in artificial culture. In *Biological fundamentals of fish culture: problems of genetics and selection).* Leningrad, Nauka, 91-102.

Chugunov, N. L., and Chugunova, N. I. (1964). Comparative commercial-biological characteristics of the Azov Sea sturgeons. *Tr. VNII morsk. ryb.khoz-va Iokeanogr* 52: 87-182.

DeWoody, J. A. and Avise J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, 54, 461-473.

Gauldic, R. W. (1988). Tagging and genetically isolated stocks of fish. a test of one stock hypotesis and the development of another. J. appl. Ichthyol. 4, 168-73.

Gauldic, RW. (1991). Taking stock of genetic concepts in fisheries management. Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 48, 722-31.

Grewe, P. M. and Hebert, P. D. N. (1988). Mitochondrial DNA diversity among broodstocks of the lake trout, S. *namaycush.* Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 45, 2114-22.

Hancock, J. M. (2000). Microsatellite and other simple sequence. In the microsatellite, Evolution and application. Editor by D. B. Goldstein and C. Schlotterer. Oxford University press P: 1-11.

Hartl, DL., Clark AG (1989). Principle of population genetics. 2nd edt. Sinauer Associates Sunderland, MA.

Holcik, J., (1989). The freshwater fishes of Europe, Vol. I part2. General introduction to fishes. Acipenserformes. Verlag. Wiesbaden, Germany.

Ihssen, P. E., Booke, H. E. Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R. and Utter, F. M. (1981). Stock identification: materials and methods. Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 38, 1838-55.

Jeffreys, A J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985). Individual-Specific fingerprints of human DNA. Nature 316, 76-73.

Karl, S. A. and Avise, J. C. (1993). PCR-based assays of mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. Mol. Biol. Evol. 10. 342-6l.

Koskinen MT, Ranta E, Piironen J, Veselov A, Nilsson J and Primmer C. R. (200). Microsatellite data detect low levels of intrapopulation genetic diversity and resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. Heridity 88: 391-401.

Lovetsky, A., (1834). Diagnosis piscium, ad genus *Acipensernum* pertinentium, praeprimis eorum, qui habitant in aquis Imperii Rossici. Nouv. Mem. Soc. Natur. Moscou 3: 253-263. in Freshwater fishes of Europe, vol. 1, part 2. page 403, General introduction to fisheses. Acipenseriforms edt. J. Holcik. AULA. Verlag. Wiesbaden, Germany.

Luk'yanenko, V. I., Umerov, Zh. G. and Karataeva, B. B. (1974). The South Caspian Sturgeon an independent species of Acipenser. Izv. An SSSR. 5: 736-739.

Manly, BFJ. (1985). The statistic of natural selection. Chapman and Hall. London.

Marti, V. Yu. (1940). Classification and biology of Russian sturgeon of the Caucasian coast of Black Sea. Zool. Zhurn 19(6): 865-872.

Martin, AP., Humphreys, R and Palumbi, S. R. (1992). Population genetic structure of the armorhead, *Pseudopentaceros wheeleri* in the North pacific ocean: application of the polymerase chain reaction to fishery problem. Can. J. Fish. Aquatic. Sci. 49, 2386-91.

May, B., Krueger, C. C. and H. L. Kincaid (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. Can J. Fish. Aquat. Sci. 54: 1542-1547.

McConnell, S. K. Hamilton, L., Morris, D., Cook, D., Pacquet, D., Bentzen, P. and Wright, J. M. (1995). Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. Aquaculture 137, 19-30.

McConnell, S. K. J., Beyon, C., Leamon, J. and D. O. F. Skibinski, (2000). Microsatellite marker based genetic linkage maps of O. *aureus* and O. *niliticus*: extensive linkage group segment homologies revealed. Animal genetics 31, 214-218.

Nei, M. (1972). Genetic distance between population. Am Nat. 106: 283-292.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nielsen, J. L. Gan, C. A., Wright, J. M. Morris, D. B. and Thomas, W. K. (1994). Biogeographic distributions of mitichondrial and nuclear markers of southern steelhead. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3, 281-293.

Nikol'skii, G. V., (1971): Chastnaya ikhtiologiya. Izd. Vysshaya shkola, Moskva. in Freshwater fishes of Europe, vol.1, part 2. pages 395-443 in General introduction to fisheses. Acipenseriforms edt. J. Holcik. AULA. Verlag. Wiesbaden, Germany.

O'Connell, M., Danzmann, R. G., Cornuet, J. M., Wright, J. M. and Ferguson, M. M. (1996). Differentiation of rainbow trout population in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54 (in press).

Oconnell, M. and J. M. Wright (1997). Microsatellite DNA in fishes, Reviews in Fish biol. And Fisheries 7, 331-363.

Ovenden, J. R. (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment. A review. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 41,835-53.

Pourkazemi, M. (1996). Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. thesis University of Wales. Swansea.

Pourkazemi, M., Skibinski, D. O. F. and J. A. Beardmore (2000). A preliminary study on phylogenetic

relationship between five sturgeon species in the Iranian coastline of the Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences 2(1), 1-12.

Prohdol, P.A, Taggart, J. B. and Ferguson, A. (1994). Clonning of highly variable minisatellite DNA single locus probes for brown trout *(Salmo trutta)* from a phagemid library. In Beaumont, A. R. ed. Genetic and Evolution of Aquatic organisems. London. Chapman and Hall pp. 263-270.

Rezvani Gilkolaei, S. (1997). Molecular population genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph. D. thesis, University of Wales, Swansea.

Robles, F., Herr?n, R., Ludwig, A., Rejon, C., R., Rejon M., R., and Garrido-Ramos M. A., (2004). Evolution of ancient satellite DNA in sturgeon genomes. Gene 338. 133-142.

Rostami, I., (1961). Biologie et explotation des esturgeons *(Acipenserides)* Caspians NarleDue (Meuse).

Rybova, G. D., and Kutergina, 1. G., (1990). Analysis of allozyme variability in the *Acipenser stellatus* (Pallas) from the Northern Caspian. *Genetika.* 26(5): 902-911.

Shannon, CE., Weaver, W, (1949). The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois press, Urbana.

Slatkin, M., Barton, NH., (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average level of gene flow. Evolution 43: 1349-1368.

Tautz, D. and Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12, 4127-4138.

Utter, F., P. Aebersold, and G. Winans (1987). Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. In N. Ryman and F. Utter [ed.] *Population genetics and fishery management.* University of Washington Press, Seattle, W A.

Ward, R. D. and Grewe, P. (1994). Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 300-325.

Weir BS., (1979). Inference about Linkage disequilibrium. Biometrics 35: 235-354.

Wirght, S. (1978). Variability within and among natural population. Vol. 4. The University of Chicago press. Chicago.

Wright, J. M. (1993). DNA fingerprinting of fishes. In the biochemistry and molecular biology of fishes. Edited by P. W. Hochacka and T. Mommsen . Elsevier press, New York. pp. 57-91.

Wright, J. M. and Bentzen, P. (1994). Microsatellite genetic marker for the future. Rev. Fish. Biol. Fish. 4. 384-388.

Zane, L., Bargelloni, L. and T. Patarnello (2000). Strategies for mircosatellite isolation: a review. Molecular Ecology (11), 1-16.

Zhao, N., Ai, W., Shao, Z., Zhu, B., Brosse S., and J. Chang, (2005). Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. J. Appl. Ichthyol. (21), 7-13.

Abstract

The fishery stocks of most commercial aquatic stocks in the world have shown declining trends in the past two decades. Several factors have been responsible for the decline of stocks the most important of which over fishing and over-exploitation, pollution, loss of natural habitats and natural spawning grounds, construction of dams and bridges across the important rivers which restrict the migratory routes of spawners, decrease in naural reproduction and rehabilitation of stocks through artificial breeding programs.

Over-exploitation of stocks and pollution directly affect decreasing stocks in an ecosystem. Not differentiating between different populations and stocks of a species found distributed in an aquatic ecosystem is considered one of the main factors which causes the depletion of stocks in most ecoystems in the world. In most cases this is because genetic variations in aquatic stocks in the wild are not taken into consideration.

Six species of sturgeons are found living in the Caspian Sea and its drainage basin which produce more than 85-90% of the world caviar. The Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and the stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) are the main sturgeon species of the Caspian Sea. The Persian sturgeon is mainly found in the south Caspian Sea while the stellate sturgeon stocks are considered shared stocks by the five Caspian littoral states. Due to over fishing in the past two decades the legal catch figures for sturgeon stocks in the Caspian Sea dropped from 28500 tons in 1985 to less than 1500 tons in 2004. Similarly caviar production also dropped from 3000 tons to 110 tons in 2005. With regard to the severe reduction in sturgeon stocks it is necessary to take essential steps before these valuable species are totally wiped out. The fisheries management of the five Caspian littoral states should focus their efforts on identifying the different populations and stocks found in the Caspian Sea. Concerted measures should be taken to study the distribution and biomass of the different populations in order to develop a scientific solution for the sustainable use of these endangered species and to secure the long term conservation of sturgeon stocks. The aim of present study was to evaluate the genetic structure of the population of two species *Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus* and to develop molecular markers to identify and differentiate different populations of these two species.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.