

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی

عنوان :

**بررسی ساختار ژنتیکی تاسماهیان در  
گشت ارزیابی ذخایر ماهیان خاویاری در  
حوضه جنوبی دریای خزر (آبهای ایران)**

مجری :

فریدون چکمه دوز قاسمی

شماره ثبت

۴۳۸۰۹

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان پروژه : بررسی ساختار ژنتیکی تاسماهیان در گشت ارزیابی ذخایر ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر  
(آبهای ایران)

شماره مصوب پروژه : ۸۸۰۴۶-۸۸۰۲-۱۲-۸۶-۱۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : فریدون چکمه دوز قاسمی

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

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : فریدون چکمه دوز قاسمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد حسن زاده صابر، محمود توکلی، محمدرضا بهروز خوشقلب، احمد غرقی، محمد

پورکازمی، شهروز برادران نویری، محمدرضا نوروز فشخامی، مهتاب یارمحمدی، لیلا عزیززاده پرمهر

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :-

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۸۸/۷/۱

مدت اجرا : ۳ سال و ۵ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۳

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

**«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»**

پروژه: بررسی ساختار ژنتیکی تاسماهیان در گشت ارزیابی ذخایر ماهیان

خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (آبهای ایران)

کد مصوب: ۱۲-۸۶-۱۲-۸۸۰۲-۸۸۰۴۶

شماره ثبت (فروست): ۴۳۸۰۹ تاریخ: ۹۲/۸/۸

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای فریدون چکمه دوز قاسمی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات (تکثیر و پرورش آبزیان) می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۹۲/۶/۴ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت کارشناس آزمایشگاه ژنتیک در پژوهشکده آبی پروری آبهای

داخلی مشغول بوده است.

صفحه	عنوان
۱	چکیده
۳	۱- کلیات
۳	۱-۱- مقدمه
۵	۱-۲- اهداف و فرضیه‌های تحقیق
۵	۱-۳- تاسماهی ایرانی ( <i>Acipenser persicus</i> Borodin, 1897)
۱۲	۱-۴- مروری بر منابع
۲۰	۲- روش کار
۲۰	۲-۱- نمونه برداری
۲۱	۲-۲- استخراج DNA
۲۲	۲-۳- ارزیابی کمی و کیفی DNA های استخراج شده
۲۳	۲-۴- آغازگر (Primer) ژن D-loop میتو کندریایی
۲۴	۲-۵- آغازگر (Primer) ژن <i>Cytochrom b</i> میتو کندریایی
۲۴	۲-۶- واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR)
۲۶	۲-۷- الکتروفورز ژل آگارز
۲۸	۲-۸- توالی یابی
۲۸	۳- نتایج
۲۸	۳-۱- نتایج حاصل از استخراج DNA
۲۸	۳-۲- نتیجه حاصل از PCR ژن D-loop تاسماهی ایرانی
۳۹	۳-۳- نتیجه حاصل از PCR ژن <i>Cytochrom b</i> تاسماهی ایرانی
۴۷	۳-۴- نتیجه گیری نهایی
۴۸	۴- بحث و نتیجه گیری
۵۶	منابع
۶۳	چکیده انگلیسی

## چکیده

ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی (*Acipensers persicus*) نواحی ۲، ۳، ۴ و رودخانه سفیدرود طی گشت ارزیابی ذخایر سال های ۱۳۹۱ - ۱۳۸۸ سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از روش تعیین توالی DNA DNA (sequencing) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۸ نمونه (۵ نمونه از ناحیه ۲، ۵ نمونه ناحیه ۳، ۵ نمونه ناحیه ۴ و ۳ نمونه رودخانه سفیدرود) با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج DNA گردید، کمیت و کیفیت آنها با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل ND1000) و ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. دو جفت آغازگر یا پرایمر (Forward و Reverse) D-loop و سیتوکروم *b* میتوکندریایی با استفاده از نرم افزار GeneRuner طراحی و پس از سنتز، نمونه های DNA با آغازگرهای فوق PCR شد. بررسی روابط ژنتیکی و ترسیم درخت هاپلوتایپی Neighbor-Joining بر اساس مدل Kimura 2-parameter با استفاده از نرم افزار Mega 4، شاخص های تنوع مولکولی شامل تعداد هاپلوتایپ ها، مکان های چندشکلی، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس آنها، شاخص توزیع شکل گاما (gamma distribution shape parameter) به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکانهای مورد بررسی، واگرایی ژنتیکی به صورت جفتی داخل و بین مناطق نمونه برداری (فاکتور  $F_{st}$ ) که نشانه جدایی جمعیت ها می باشد با ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی به منظور معنی دار یا عدم معنی دار بودن با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 و Dna SP محاسبه گردید. فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت ها با استفاده از آزمون دقیق (exact test) بر اساس اختلاف هاپلوتایپی بین جمعیت ها محاسبه شد. گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی (*Historical demographic and spatial expansions*) با دو روش تست تاجیما (*D-test of Tajima*) و تست  $F_u F_s$  بررسی شد.

بر اساس نتایج به دست آمده محصول PCR ژن D-loop پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد به همراه مارکر ۱۰۰bp در زیر اشعه UV، تولید باندهایی در محدوده ۵۰۰ جفت باز (bp) و ژن سیتوکروم *b* ۷۰۰ جفت باز (bp) نمودند. پس از ردیف (Align) کردن برای ژن های D-loop و سیتوکروم *b* بین مناطق مورد مطالعه به ترتیب ۱۳ و ۴ هاپلوتایپ، میانگین تنوع هاپلوتایپی ۰/۹۶۱ و ۰/۴۱۹، تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۸ و ۰/۰۰۲، شاخص توزیع شکل گاما بین مکانهای مورد بررسی ۰/۱۹ و ۰/۲۰ که نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون برای هر دو ژن در اینگونه بود. کمترین مقدار  $F_{st}$  محاسبه شده برای ژن D-loop بین جمعیت های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۴ شیلاتی (۰/۰۰۲-) دیده شد و برای ژن سیتوکروم *b* بین تمامی جمعیت ها ۰/۰۴ و غیر معنی دار با جریان ژنی ۵/۳۷ محاسبه شد. آزمون تفاوت جمعیت ها (non-differentiation exact *p* values) در داخل جمعیت ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای ژن D-loop بین رودخانه سفیدرود و سایر مناطق معنی دار بود و برای ژن سیتوکروم *b* اختلاف معنی داری بین مناطق مورد بررسی بدست نیامد. تاریخچه جمعیتی (demographic history) تاسماهی ایرانی با استفاده از آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی (mismatch distribution) و بر اساس بسط و گسترش ناگهانی (sudden expansion) برای هر دو ژن مورد بررسی قرار گرفت که غیر معین (unimodal) بوده و شبیه مدل بسط

ناگهانی بود. آزمون های بی طرفی (neutrality tests) تاجیما و شاخص  $F_u F_s$  برای ۱۸ و ۱۷ توالی بین مناطق و برای هر دو ژن به ترتیب ۰/۸۴- و ۰/۹۹- و ۰/۲۲۰- و ۰/۰۷۹- محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی دار نبودند ( $p \geq 0.01$ ). مقدار زمان بسط و گسترش جمعیتی تاسماهی ایرانی محاسبه شده توسط نرم افزار Arlequin برای ژن D-loop  $t = 13/65$  و از قبل از زمان حاضر و احتمالاً حدود ۱۵۰۱ سال و برای ژن سیتوکروم  $b$   $t = 0/98$  و از قبل از زمان حاضر ۷/۸۴ سال محاسبه شد. نتایج بدست آمده از ژن D-loop این بررسی نشان داد که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک خزانه ژنی مستقل و جداگانه از سایر مناطق دیگر می باشد بنابراین اعمال مدیریت شیلاتی بمنظور حفظ خزانه ژنی و افزایش ذخایر این ماهیان با ارزش قبل از انقراض کامل آنها قویاً توصیه می گردد.

## ۱- کلیات

## ۱-۱- مقدمه

دریای خزر با وسعت ۳۷۳۳۰۰۰ کیلومتر مربع بزرگترین دریاچه جهان است که یک مخزن آبی مشترک با پنج کشور، جمهوری اسلامی ایران، جمهوری آذربایجان، فدراتیو روسیه، جمهوری قزاقستان و ترکمنستان می باشد. ولگا مهمترین رودی است که به بخش شمالی این دریاچه می ریزد. مساحت این دریاچه ۴۳۸ هزار کیلومتر مربع و حداکثر طول آن ۱۲۰۰ کیلومتر مربع است. میانگین عمق آن ۱۹۷ متر و حداکثر آن ۱۰۶۰ متر (در نزدیکی بندرانزلی) می باشد. دارای ساحلی به طول ۶۳۷۹ کیلومتر است که ۹۹۲ کیلومتر آن از آستارا تا رودخانه اترک که جزء سواحل ایران به شمار می آید. ۲۵ درصد مساحت آن را قسمت شمالی تشکیل می دهد که عمق آن کم و در حدود ۵ متر می باشد (اسوبودوا، ۱۳۷۴، کردوانی، ۱۳۷۴). دریای خزر در عرض شمالی ۳۳° و ۳۶° (جنوبی ترین نقطه) تا ۷° و ۴۷° (شمالی ترین نقطه) تا ۵۰' و ۵۴° (شرقی ترین نقطه) از عرض جغرافیایی قرار گرفته است و دارای بیش از ۱۱۵ گونه و زیر گونه از انواع ماهیان است که از مهمترین آنها می توان به پنج گونه از ماهیان خاویاری شامل: فیل ماهی (*Huso huso*)، تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاسماهی روسی (*Acipenser guldenstaedti*)، ماهی شیب (*Acipenser nudiventris*)، ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) و از ماهیان استخوانی: ماهی سفید، کفال، سیم، سوف، کپور، ماهی آزاد، سس ماهی، کیلکا و ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) را می توان نام برد (کردوانی، ۱۳۷۴، زهزاد، ۱۳۶۹).

تاسماهیان (sturgeons) یکی از قدیمیترین گروه ماهیان می باشند که با توجه به قدمت ۲۰۰ میلیون ساله از زمان ژوراسیک تا زمان حال از آنها بعنوان فسیل های زنده نام می برند (Bemis et al., 1997). در حال حاضر بدلیل تاثیر عوامل انسانی از قبیل بهره برداری بیش از حد از ذخایر، تخریب زیستگاهها و افزایش عوامل آلودگی، تخریب مناطق تخمیزی و وجود موانع در مهاجرت آنها، جمعیت های این ماهیان در سراسر جهان منجمله ذخایر آنها در دریای خزر در معرض خطر انقراض قرار گرفته و سبب کاهش چشمگیر ذخایر تاسماهیان در این منبع آبی گردیده است (Pourkazemi, 2006). لذا اکثر تاسماهیان در لیست ماهیان در معرض خطر اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت IUCN قرار گرفته اند (Dugo et al., 2004; Pourkazemi, 2006). از ۲۷ گونه ماهیان خاویاری موجود در جهان (Raymarkers, 2002) ۶ گونه از تاسماهیان متعلق به دو جنس *Huso* و *Acipenser* در دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن وجود دارند که امروزه قسمت اعظم خاویار تولیدی جهان را به خود اختصاص می دهند (Pourkazemi, 2006). در سالهای اخیر بدلیل کاهش ذخایر تاسماهیان دریای خزر، تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از مهمترین و اصلی ترین گونه های تکثیری در مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر در ایران بوده است و همه ساله تعداد زیادی از مولدین این گونه بصورت مصنوعی تکثیر و بچه ماهیان حاصله جهت بازسازی ذخایر به رودخانه های محل مهاجرت رهاسازی می شوند. در حال حاضر سهمیه صادرات خاویار کشورهای حاشیه دریای خزر بر اساس مصوبات کنوانسیون CITES در نظر گرفته می شود که بر اساس آن این

کشورها موظف به انجام گشت های ارزیابی ذخایر و برآورد میزان تاسماهیان صید شده در هر منطقه می باشد. مطالعات مولکولی در زمینه ساختار ژنتیکی می تواند اطلاعات ارزشمندی را درخصوص شناخت جمعیت های احتمالی و بمنظور کمک به تصمیمات مدیریت شیلاتی و بقاء گونه های در معرض خطر را در اختیار مراجع ذیصلاح قرار می دهد (Rosenthal et al., 2006). هدف مدیریت شیلاتی حفاظت و بهره برداری پایدار از ذخایر ماهیان می باشد که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از کیفیت و پراکنش ذخایر این ماهیان است. هریک از ذخایر آبریان برحسب میزان صید یا تکثیر، عکس العمل مستقلی از خود نشان می دهند. بنابراین قبل از اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی ضرورت دارد تا ساختار ژنتیکی جمعیت های مربوطه را شناسایی و با روش های مولکولی مورد ارزیابی قرار داد و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن تدوین و اعمال نمود (رضوانی، ۱۳۸۰). ساختار ژنتیکی جمعیت تاسماهی ایرانی صید شده از گشت های ارزیابی ذخایر حوضه جنوبی دریای خزر تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر جمعیت ها با استفاده از صفات مرفومتريک و مریستیک انجام می گرفت ولی با توجه به حساسیت بالای این صفات به تغییرات محیطی و محدود بودن تفسیر این گونه داده ها و پیشرفت علم استفاده از مارک های مولکولی نظیر Microsatellite، AFLP<sup>۲</sup> RAPD<sup>۱</sup>، Alzyme، rFLP<sup>۳</sup>، DNA sequencing که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Adams and Hutchings, 2003).

به رغم تکثیر سالانه و رهاسازی بیش از دهها میلیون بچه ماهی خاویاری از کارگاه های بازسازی ذخایر از جمله تاسماهی ایرانی که بومی سواحل جنوبی دریای خزر می باشد، متاسفانه اطلاعات کاملی از ساختار ژنتیکی این گونه وجود نداشته و این ماهیان بدون آگاهی از ساختار ژنتیکی آنها مورد تکثیر قرار گرفته و چه بسا جمعیت یک منطقه در کارگاه بازسازی ذخایر منطقه دیگر مورد تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان حاصله قرار گیرند. بر اساس مصوبات کمیسیون منابع زنده دریای خزر مقرر گردید کشورهای ذینفع و بهره بردار از منابع تاسماهیان بایستی در گشت ارزیابی ذخایر ماهیان خاویاری شرکت نمایند که هدف اصلی آن ارزیابی و برآورد فراوانی و وزن توده زنده ماهیان خاویاری در سواحل آن کشور می باشد. در همین راستا پروژه فوق بمنظور بررسی های جمعیتی مناطق شیلاتی در گشت ارزیابی ذخایر و با استفاده از روش مایکروستلایت تصویب شد ولی عدم صید گونه های مختلف تاسماهیان در مناطق مورد مطالعه طی روند اجرایی گشت های ارزیابی ذخایر که توسط کشتی گیلان (اعماق بالای ۱۰ متر) و لنج سی سرای ۲ (اعماق زیر ۱۰ متر)، طی نامه شماره ۲۴۷/۰۲۴/۴۰۱۸ مورخ ۱۳۸۹/۳/۲۶ مدیر بخش زیست فناوری و فرآوری آبریان، روش تعیین توالی با نمونه های کمتر و برای سه منطقه جایگزین روش قبلی شد. متاسفانه بدلیل عدم وجود نمونه های کافی سایر ماهیان خاویاری (ازون برون،

۱. Random Amplification Polymorphic DNA

۲. Amplified Fragment Length Polymorphism

۳. Restriction Fragment length Polymorphism



شیپ، فیلماهی، تاسماهی روسی) در مناطق مورد مطالعه (جهت آنالیز مولکولی) تنها نمونه های در اندازه مناسب تاسماهی ایرانی مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفت.

بر این اساس با توجه به اهمیت و ارزش اقتصادی تاسماهی ایرانی و نیز ارزش صادراتی و شیلاتی، در راستای شناسایی جمعیت های این گونه در مناطق مختلف شیلاتی و بمنظور ارائه به کارگاههای بازسازی ذخایر آبزیان واقع در استان های ساحلی کشور جهت ازدیاد ذخایر، اهداف ذیل مورد بررسی قرار گرفت:

## ۲- ۱- اهداف و فرضیه های تحقیق

- تعیین ساختار ژنتیکی تاسماهی ایرانی مناطق مختلف شیلاتی
- تاسماهی ایرانی در مناطق نمونه برداری دارای تنوع ژنتیکی می باشد.
- تاسماهی ایرانی مناطق مورد مطالعه هر یک جمعیت مستقلی هستند.

## ۳- ۱- تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)



تاسماهی ایرانی (در زبان محلی قره برون) در سال ۱۸۹۷ برای اولین بار توسط محققى به نام Borodin بعنوان گونه ای از رودخانه اورال شناسایی شد. دانشمندی به نام Berg معتقد بود که این گونه زیرگونه ای از تاسماهی روسی بوده که فقط در رنگ بدن تفاوت دارند ولی در سال ۱۹۴۸ با مطالعات متعدد خود تاسماهی ایرانی را گونه ای مستقل دانست. Lukyanenko و همکاران در سال ۱۹۷۴ و Artyukin در سال ۱۹۸۳ با مطالعات خود در زمینه تفاوت های مورفولوژیکی، اکولوژیکی، بیولوژیکی و ایمونوالکتروفورتیک بین دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی نظریه جدا بودن تاسماهی ایرانی را بعنوان یک گونه مستقل مورد تایید قرار دادند. پرواریوخا در سال ۱۳۷۴ با مطالعات خود در زمینه آنتی ژن های سرم خون دو نژاد بهاره و پاییزه از تاسماهی ایرانی را شناسایی نمود و سپس نژاد رودخانه سفیدرود در زمان مهاجرت مولدین به این رودخانه گزارش گردید (Rostami, 1961).

بر اساس مطالعات آرتیوچین در سال ۱۹۸۳ ذخایر تاسماهی ایرانی در قسمتهای جنوبی دریای خزر بیشتر از قسمتهای شمالی می باشد. با توجه به برنامه های بازسازی ذخایر این گونه تخمین زمان کاهش جمعیت های طبیعی در دریای خزر مشکل می باشد ولی آن چیزی که مشهود است صید بیرویه می تواند کاهش ذخایر این گونه را بدنبال داشته باشد. از مهمترین عوامل کاهش ذخایر تاسماهیان در دریای خزر صید بیرویه می باشد و بر اساس برآورد CITES در سال ۲۰۰۰ این صید بیرویه ۱۰ - ۶ برابر بیشتر از صید قانونی صورت گرفته است.

### ۱-۳-۱ - رده بندی و مشخصات ظاهری

تاسماهی ایرانی از لحاظ رده بندی متعلق به سلسله جانوران، شاخه طنابداران، رده شعاع بالگان، راسته تاسماهی شکلان، خانواده تاسماهیان، جنس تاسماهی، گونه تاسماهی ایرانی و با نام علمی *Acipenser persicus* می باشد.

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Osteichthyes
Order	Acipenseriformes
Family	Acipenseridae
Genus	Acipenser
Species	<i>Acipenser persicus</i> Borodin

بدن کشیده و باریک و دارای پوزه ای نسبتا تیز می باشد. ارتفاع بدن ۱۶/۸ درصد طول کل بدن بوده، ارتفاع سر ۱۷/۲ درصد طول کل بدن می باشد. باله های سینه ای نسبتا کوچک و واجد یک شعاع استخوانی ضعیف که اغلب خمیده و مارپیچ بوده و از آن جهت تعیین سن آنها استفاده می شود. دهان تحتانی و دارای یک شکاف عرضی می باشد، دارای ۲ جفت سیلک بوده که به پوزه ماهی نزدیکترند. رنگ پشت بدن ماهی خاکستری سفید یا آبی متمایل به خاکستری و با یک درخشش آبی فولادی در قسمت پهلوهای است. رنگ قسمت شکمی بدن سفید و گاهی متمایل به زرد است (عقیلی نژاد، ۱۳۷۱). تعداد شعاع های غیرمنشعب باله پشتی ۵۱ - ۲۷ عدد، تعداد شعاع های غیرمنشعب باله مخرجی ۳۵ - ۱۶ عدد، تعداد صفحات استخوانی پشتی ۱۹ - ۷ عدد، تعداد صفحات استخوانی پهلوئی یا جانبی ۵۰ - ۲۳ عدد، تعداد صفحات استخوانی شکمی ۱۳ - ۷ عدد و تعداد خارهای کمان آبششی معمولا بین ۴۰ - ۳۰ عدد می باشد. حداکثر طول ۲۲۸ سانتیمتر و حداکثر وزن به ۷۰ کیلوگرم می رسد، وزن متوسط ماهیان نر بالغ ۳۰ - ۲۰ کیلوگرم و ماهیان ماده بالغ ۳۵ - ۳۰ کیلوگرم است (Putilina, 1983).

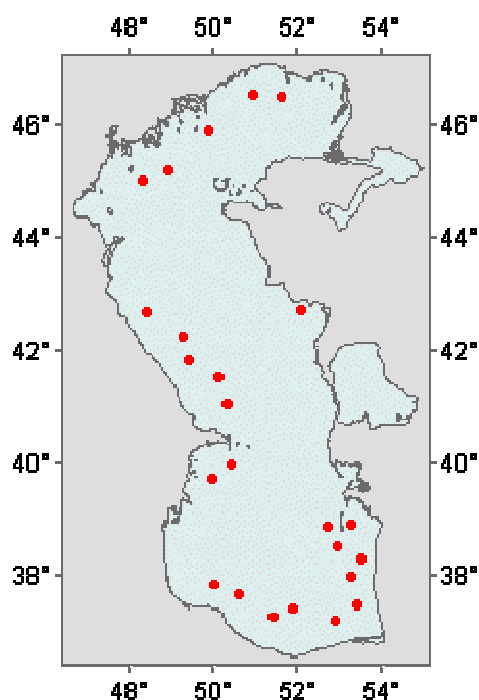
### ۱-۳-۲ - پراکنش

تاسماهی ایرانی در تمامی نقاط دریای خزر زیست می کند (تصویر ۱) ولی تغذیه و زمستان گذرانی عمدتا در بخش های جنوبی و مرکزی صورت می گیرد. بیشتر ذخایر تاسماهی ایرانی در نزدیکی آبهای سواحل جنوبی و

جنوب شرقی و رودخانه های منتهی به آنها باقی می ماند (Kazanchev, 1981). با توجه به دمای بالاتر آب در قسمت های جنوبی نسبت به قسمت های شمالی، این ماهی در قسمت های جنوبی دریای خزر از پراکنش بیشتری برخوردار است. تاسماهی ایرانی از لحاظ پراکنش دارای دو زیر گونه است (پور کاظمی و همکاران، ۱۳۸۳):

۱ - *A.persicus* Borodin, 1897 که محل پراکنش دریای خزر، رودخانه های سفیدرود، کوراو گرگانرود، تجن و ... می باشد.

۲ - *A.persicus colchicus* Marin, 1940 که محل پراکنش ناحیه شرقی دریای سیاه، قفقاز، رودخانه ریونی و سواحل آناتولی می باشد.



تصویر ۱- دریای خزر و پراکنش تاسماهی ایرانی

### ۳-۱- تغذیه

تاسماهی ایرانی همه چیزخوار و کفزی خوار بوده و در دریای خزر از نرم تنان کفزی، سخت پوستان و ماهیان کوچک تغذیه می نماید. رژیم غذایی تاسماهی ایرانی با سن ماهی متغیر بوده بطوریکه ماهیان جوان در اولین سال زندگی از گاماریده، لارو شیرونومیده، کرم های کم تار، کوروفیوم، مایسیس و کرم های حلقوی تغذیه می کنند. تاسماهی ایرانی برخلاف تاسماهی روسی معمولاً از کرم پرتار نرئیس و نرم تن آبراواتا تغذیه می نماید. ماهیان جوان تر بطور معمول از ماهیان ریز تغذیه بعمل می آورند درحالیکه ماهیان بالغ تر از نرم تنان، خرچنگ ها و ماهیان بزرگتر تغذیه می کنند. در فصل پاییز صدف ها و خرچنگ بعنوان غذای اصلی و سایر ماهیان نظیر ماهی کیلکا بعنوان غذای فرعی مورد تغذیه قرار می گیرند. در فصل زمستان غذای اصلی تاسماهی ایرانی شامل

گاوماهی و خرچنگ، در فصل بهار صدف، گاوماهی و تاحدودی ماهی کیلکا و سایر نرمتان می باشد (نصری چاری، ۱۳۷۲). در بررسی های دقیقتر مشخص گردید که تاسماهی ایرانی تا سن زیر دو سال از گاوماهیان، گل آذین ماهیان، شک ماهیان، کرم پرتا نرئیس و سخت پوستان تغذیه می نماید (حدادی مقدم، ۱۳۸۲).

#### ۴-۳-۱- مهاجرت و تخمیزی

تاسماهی ایرانی جزو ماهیان مهاجر بوده و در مرحله ای از زندگی خود قبل از ورود به رودخانه در آب شور باقی مانده و سپس بمنظور تخمیزی وارد رودخانه می شوند. اولین مرحله تولید مثلی در نرها در ۱۵-۸ سالگی و ماده ها ۱۸-۱۲ سالگی روی می دهد. سن رسیدگی جنسی در ماده ها ۴۰-۶ سالگی که ۸۵ درصد بین ۱۸-۱۴ سالگی و در نرها ۱۶-۱۲ سالگی (۸۰ درصد) اتفاق می افتد. میانگین سن تولید مثلی ۱۴ سال می باشد. تاسماهی ایرانی بطور سالیانه تخمیزی نمی کند و تخمیزی در ماههای اواخر اسفند تا اواخر اردیبهشت زمانیکه دمای آب به بالاتر از ۱۶ درجه می رسد، صورت می گیرد، مرحله انکوباسیون تخمها بسته به درجه حرارت آب ۸-۲ روز بطول کشیده و تخمها طی مدت ۴-۳ روز تبدیل به لارو می شوند. هم آوری مطلق تاسماهی ایرانی بستگی به رابطه طول و وزن داشته و از ۸۵/۰۰۰ الی ۸۴۰/۰۰۰ متغیر می باشد ولی میزان متوسط آن ۳۵۰/۰۰۰ عدد می باشد. قطر تخمهای رسیده بین ۳/۸-۳/۲ میلی متر و به رنگ خاکستری متمایل به قهوه ای می باشد همچنین طول اسپرم تاسماهی ایرانی حدود ۰/۵ میلیمتر بوده و می تواند تا چند ساعت در آب به تحرك خود ادامه دهد (Dettlaf et al., 1993). در سواحل جنوبی دریای خزر مولدین تاسماهی ایرانی بطور متناوب وارد رودخانه های محل تخمیزی می شوند بطوریکه این گونه بین ماههای فروردین الی تیر، مرداد الی شهریور و زمانیکه درجه حرارت آب بین ۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد است بمنظور تخمیزی وارد رودخانه می شوند. مدت تخمیزی در فصل بهار ۳۰-۱۵ روز بوده از ماههای اواخر فروردین الی خرداد و بیش از دو ماه طول می کشد (نصری چاری، ۱۳۷۲). نوزادان پس از گذشت تابستان به دریا مهاجرت کرده و تا رسیدن به بلوغ جنسی در آنجا زیست می کنند. تاسماهی ایرانی نسبت به تاسماهی روسی دارای نیازمندی های اکولوژیکی و بیولوژیکی متفاوت تری بوده بطوریکه دمای آب گرمتری را بمنظور تخمیزی ترجیح داده و زمان مهاجرت تخمیزی نیز کوتاه تر می باشد.

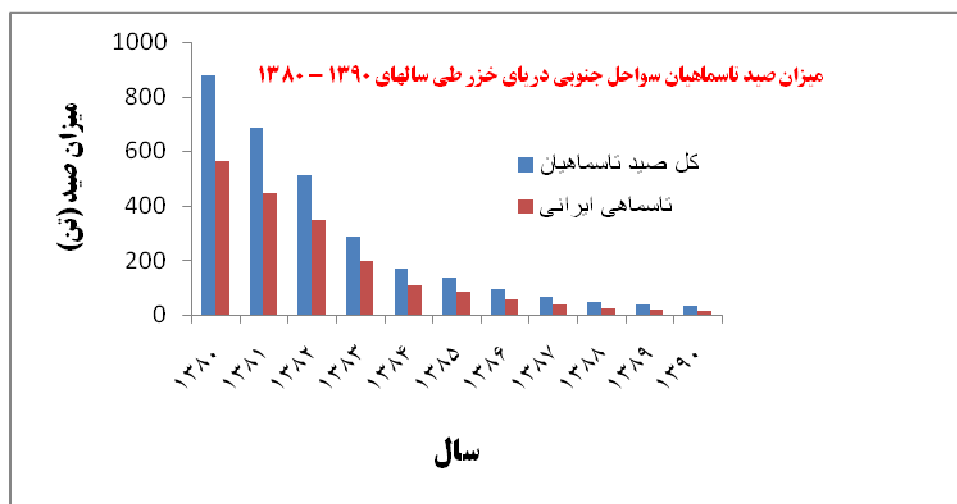
#### ۵-۳-۱- میزان صید و بهره برداری

ایران بدلیل تکثیر و رهاکرد سالیانه این گونه، تنها بهره بردار تجاری و قانونی تاسماهی ایرانی در دریای خزر می باشد. برنامه های بازسازی ذخایر از سال ۱۹۶۹ در ایران آغاز شده که ۸۰ درصد صید این گونه در دریای خزر در نتیجه این برنامه بوده است. متاسفانه آمار صید تاسماهیان از سال ۱۳۸۰ الی ۱۳۹۰ روند نزولی داشته است

(جدول ۱ و نمودار ۱). آمار صید ارائه شده تاسماهیان در دریای خزر نشان می دهد که بین این سال ها بیشترین صید تاسماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر متعلق به تاسماهی ایرانی بوده است (توکلی، ۱۳۸۹).

جدول ۱ - میزان صید ماهیان خاویاری سواحل جنوبی دریای خزر (تن) طی سالهای ۱۳۸۰ الی ۱۳۹۰ (توکلی، ۱۳۸۹)

سال	گونه	فیلماهی	تاسماهی روسی	تاسماهی ایرانی	شیپ	ازون برون
۱۳۸۰		۸۹/۱۱۵	۳۱/۴۰۷	۵۶۴/۶۵۱	۲۵/۳۸۲	۱۶۹/۱۵۸
۱۳۸۱		۷۱	۳۴/۲۳۰	۴۴۸/۱۶	۲۳/۰۹۰	۱۰۸
۱۳۸۲		۵۷/۲۱۷	۲۰/۷۳۱	۳۴۹/۱۰۴	۱۴/۶۴۷	۶۹/۰۷۵
۱۳۸۳		۴۱/۷۹۷	۹/۷۵۰	۱۹۷/۷۷	۶/۲۸۵	۲۹/۷۱۵
۱۳۸۴		۳۰/۶۱۵	۵/۸۹۹	۱۰۸/۴۴۶	۴/۸۳۶	۱۹/۳۰۸
۱۳۸۵		۳۱/۶۲۶	۴/۴۵۵	۸۳/۷۲۴	۴/۱۶۰	۱۳/۵۶۵
۱۳۸۶		۲۲/۸۴۲	۴/۴۳۷	۵۸/۴۹۰	۳/۸۴۶	۶/۵۴۶
۱۳۸۷		۲۰/۰۳۵	۱/۸۴۰	۳۶/۲۰۰	۳/۱۵۲	۵/۱۷۷
۱۳۸۸		۱۴/۷۱۱	۱/۳۲۳	۲۴/۴۹۳	۲/۱۵۷	۲/۰۷۵
۱۳۸۹		۱۵/۶۹۰	۰/۹۳۱	۱۷/۷۱۴	۱/۲۴۱	۱/۶۲۲
۱۳۹۰		۱۳/۹۱۵	۰/۸۱۶	۱۳/۹۲۴	۰/۹۹۶	۱/۵۸۳
جمع		۴۰۸/۵۶۳	۱۱۵/۸۱۹	۱۹۰۲/۶۷۶	۸۹/۷۹۲	۴۲۵/۸۲۴

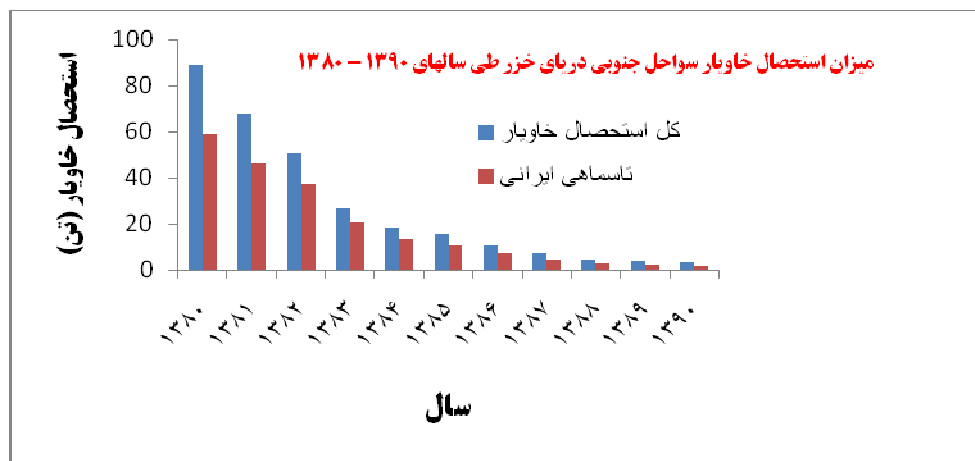


نمودار ۱ - صید ماهیان خاویاری سواحل جنوبی دریای خزر طی سالهای ۱۳۸۰ - ۱۳۹۰

متعاقب همین روند نزولی صید، میزان استحصال خویار نیز صید نزولی داشته است (جدول ۲ و نمودار ۲).

جدول ۲ - میزان استحصال خویار (تن) سواحل جنوبی دریای خزر طی سالهای ۱۳۸۰ الی ۱۳۹۰ (توکلی، ۱۳۸۹)

سال	گونه	فیلماهی	تاسماهی روسی	تاسماهی ایرانی	شیپ	ازون برون
۱۳۸۰		۳/۲۸۰	۳/۴۷۰	۵۸/۸۷۹	۲/۲۳۵	۲۱/۲۸۲
۱۳۸۱		۳/۵۱۰	۳/۴۴۰	۴۶/۲۷۰	۲/۰۴۰	۱۲/۴۱۰
۱۳۸۲		۲/۹۵۷	۱/۹۶۵	۳۷/۲۵۳	۱/۲۱۳	۷/۰۷۷
۱۳۸۳		۱/۷۹۲	۱/۰۱۶	۲۰/۳۲۵	۰/۵۵۴	۲/۹۳۸
۱۳۸۴		۱/۶۶۸	۰/۵۵۶	۱۳/۵۶۲	۰/۶۵۹	۱/۹۵۸
۱۳۸۵		۲/۵۴۱	۰/۴۷۵	۱۰/۷۶۲	۰/۵۷۳	۱/۱۱۹
۱۳۸۶		۱/۵۶۱	۰/۴۴۲	۷/۲۷۵	۰/۴۷۸	۰/۶۸۱
۱۳۸۷		۱/۶۰۰	۰/۲۰۳	۴/۳۵۷	۰/۴۳۰	۰/۴۹۵
۱۳۸۸		۱/۲۷۲	۰/۱۲۰	۲/۸۵۱	۰/۲۶۶	۰/۲۰۱
۱۳۸۹		۱/۴۷۱	۰/۱۵۱	۲/۱۲۱	۰/۱۳۷	۰/۱۵۳
۱۳۹۰		۱/۳۴۵	۰/۰۸۸	۱/۵۹۷	۰/۱۰۰	۰/۱۵۹
جمع		۲۲/۹۹۷	۱۱/۹۲۶	۲۰۵/۲۵۲	۸/۶۸۵	۴۸/۴۷۳



نمودار ۲ - میزان استحصال خویار سواحل جنوبی دریای خزر طی سالهای ۱۳۸۰ - ۱۳۹۰

### ۶-۳-۱ - تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر:

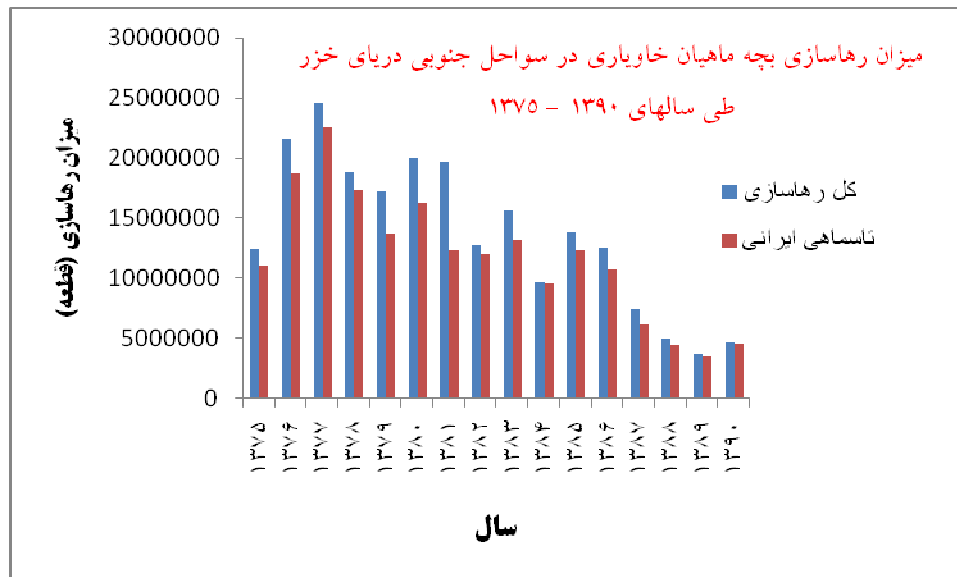
در دهه های اخیر سازمان شیلات ایران برای بازسازی ذخایر انواع ماهیان دریای خزر که دارای ارزش اقتصادی می باشند تلاشهای قابل توجهی را انجام داده است بطوریکه بسیاری از گونه ها نظیر ماهیان خویاری، ماهی سفید، سیم و ... از طریق کارگاههای بازسازی ذخایر تکثیر و بچه ماهیان حاصله جهت ازدیاد ذخایر به رودخانه

های محل مهاجرت رهاسازی می شوند (پرافکننده حقیقی و رضوانی، ۱۳۸۴). بمنظور بازسازی ذخایر تاسماهیان، در سال ۱۳۵۱ کارگاه بازسازی ذخایر شهید بهشتی و در سال ۱۳۶۸ کارگاه شادروان دکتر یوسف پور (سیاهکل) در استان گیلان، کارگاه بازسازی ذخایر ماهیان شهید رجایی در استان ساری و کارگاه بازسازی ذخایر تاسماهیان شهید مرجانی در استان گلستان احداث گردیدند. بر اساس آمارهای ارائه شده (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۰) روند بازسازی ذخایر و رهاکرد تاسماهیان بگونه ای بوده است که بیشترین روند رهاکرد بچه ماهیان خاویاری متعلق به تاسماهی ایرانی بوده است بطوریکه در سال ۱۳۷۵ از مجموع ۱۲/۴۵۵/۹۳۳ قطعه بچه ماهیان خاویاری رهاسازی شده به میزان ۱۱/۰۱۸/۹۳۸ قطعه متعلق به تاسماهی ایرانی و در سال ۱۳۹۰ از مجموع ۴/۷۰۰/۴۸۵ قطعه بچه ماهیان خاویاری رهاسازی شده به میزان ۴/۵۸۲/۱۳۵ قطعه متعلق به تاسماهی ایرانی بوده که به رودخانه های محل مهاجرت این ماهیان رهاسازی شده است و این روند کماکان ادامه دارد (جدول ۳ و نمودار ۳).

جدول ۳ - آمار رهاکرد بچه ماهیان خاویاری (قطعه) ایران از سال ۱۳۷۵ الی ۱۳۹۰

(سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۰)

سال	گونه	فیلماهی	تاسماهی روسی	تاسماهی ایرانی	شپ	ازون برون
۱۳۷۵		۳۴۴/۸۰۰	۶۷۳/۹۸۱	۱۱/۰۱۸/۹۳۸	۱۰۲/۰۰۰	۳۱۶/۲۱۴
۱۳۷۶		۱/۴۳۶/۹۸۱	۹۱۹/۵۰۰	۱۸/۷۵۱/۱۲۱	۲۳۰/۷۷۰	۲۸۸/۲۸۱
۱۳۷۷		۶۸۷/۴۰۰	۴۱۸/۱۷۰	۲۲/۵۸۶/۴۱۷	۶۷۸/۶۰۰	۱۸۱/۴۶۱
۱۳۷۸		۴۰۶/۱۰۰	۷۲۲/۳۰۰	۱۷/۲۹۹/۷۳۲	۳۰۳/۷۷۸	۱۳۱/۸۶۱
۱۳۷۹		۱/۹۰۰/۹۱۹	۱/۳۲۷/۴۸۰	۱۳/۷۱۱/۱۹۹	۱۱۳/۸۲۶	۲۲۶/۳۷۳
۱۳۸۰		۶۴۰/۹۶۳	۴/۴۷۸/۸۵۵	۱۶/۲۷۸/۵۹۵	۱/۷۸۲/۹۱۴	۸۲۰/۱۳۶
۱۳۸۱		۲/۴۰۳/۷۹۴	۱/۸۱۶/۵۸۵	۱۲/۳۰۱/۲۱۴	۱/۸۱۹/۶۸۴	۱/۳۰۰/۹۸۲
۱۳۸۲		۲۵/۵۰۰	۰	۱۲/۰۱۴/۴۳۳	۵۸۸/۵۳۷	۱۲۲/۳۷۰
۱۳۸۳		۱/۵۷۴/۷۰۰	۴/۰۵۱/۱۰۹	۱۳/۱۷۹/۷۶۸	۲۶۰/۷۷۰	۱۸۳/۱۹۵
۱۳۸۴		۴/۵۹۵	۹۲/۵۰۰	۹/۵۶۷/۶۶۳	۲۳۷/۲۳۵	۴۰/۸۸۰
۱۳۸۵		۴۶۴/۷۲۴	۹۰/۰۰۰	۱۲/۳۶۹/۸۲۱	۷۵۱/۲۰۰	۱۲۳/۰۵۰
۱۳۸۶		۱/۱۵۹/۰۵۱	۱۶۵/۸۰۰	۱۰/۷۹۴/۸۶۳	۳۸۸/۱۶۰	۱۱۶/۶۹۸
۱۳۸۷		۶۹۶/۵۰۰	۶۷/۹۹۵	۶/۱۴۰/۸۰۰	۲۸۰/۰۷۰	۲۲۱/۹۷۵
۱۳۸۸		۲۷۳/۸۵۰	۵۲/۱۰۰	۴/۵۰۲/۸۳۵	۱۳/۲۰۰	۱۷۱/۲۵۰
۱۳۸۹		۰	۰	۳/۵۴۲/۶۰۰	۱۸۱/۱۹۵	۱۷/۶۵۰
۱۳۹۰		۰	۰	۴/۵۸۲/۱۳۵	۸۶/۸۰۰	۳۱/۵۵۰
جمع		۱۲/۰۱۹/۸۷۷	۱۴/۸۷۶/۳۷۵	۱۸۸/۶۴۲/۱۳۴	۷/۸۱۸/۷۳۹	۴/۲۹۳/۹۲۶



نمودار ۳- میزان رهاسازی بچه تاسماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر طی سالهای ۱۳۷۵ - ۱۳۹۰

#### ۴-۱- مروری بر منابع

مطالعه بر روی mtDNA به عنوان یک ابزار در تعیین جمعیت ها از دهه ۱۹۸۰ تاکنون استفاده شده است. با استفاده از این روش محققین توانسته اند جمعیت های مختلفی را در ماهیان استخوانی و تاسماهیان شناسایی نمایند. روشهای متعددی بر پایه ژنوم هسته ای ارائه شده اما هنوز روش های مولکولی مبتنی بر DNA میتوکندریایی بهترین روش برای تعیین روابط فیلوژنتیکی می باشد و در مطالعات جمعیتی اگر چه نسبت به نشانگرهای Microsatellite و RAPD در برآورد جریان ژنی و تنوع ژنتیکی ضعیف است ولی در تعیین اختلاف بین جمعیت ها هنوز نقش مهمی را ایفاء می نماید. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدهای mtDNA در مهره داران عالی تقریباً ۱۰ - ۵ برابر سرعت تعویض در ژنوم هسته ای است که موجب افزایش قدرت تفکیک در سطح مطالعات جمعیتی می شود. حساسیت آن نسبت به کاهش تنوع ژنتیکی در تنگناهای ژنتیکی بیشتر است. سطوحی که در mtDNA بررسی می شوند عبارتند از توالی هایی با تکامل سریع مثل ژنهای ND1/2، ND3/4، ND5/6 و D-loop (که منطقه آغاز همانند سازی است). برای بررسی روابط درون گونه ای و روابط بین گونه هایی که دارای روابط خویشاوندی نزدیک هستند، توالی های با تکامل متوسط مانند Cytochrom *b* برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه هایی که از نظر مورفولوژی خیلی به یکدیگر نزدیک می باشند و سرعت تکاملی کند مانند ژن های RNA 16S، 12S ریوزومی و سیتوکروم اکسیداز I استفاده می شود (هالرمن، ۱۳۸۴).



## ۱-۴-۱- مطالعات جمعیتی با استفاده از روش های مولکولی در تاسماهیان

Smith و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از ۴ جایگاه مایکروساتلایتی و روش PCR-RFLP به مطالعه ساختار ژنتیکی تاس ماهی سفید در شاخه اصلی رودخانه Fraser و یکی از انشعابات فرعی آن و رودخانه Nechko، پرداختند. نتایج حاکی از وجود چهار منطقه جغرافیائی زیستی در رودخانه Fraser بود (ناحیه پایینی و پایین Hell's Gate، ناحیه میانی بین Hell's Gate و کیلومتر ۵۵۳ رودخانه Fraser، بالاتر از تلاقی Nechko و ناحیه رودخانه Nechko). مطالعه میتوکندری ۹ ترکیب هاپلو تپیی را نشان داد همچنین دو روش بکار رفته نتایج یکسانی را نشان دادند با این تفاوت که مارکر مایکروساتلایت تنوع بالاتری را در نمونه های مناطق مورد مطالعه نشان داد.

Wirgin و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی جمعیت های زیر گونه تاس ماهی اطلس با استفاده از روش های مایکروساتلایتی و تعیین توالی ژن های mtDNA پرداختند. هر دو روش بکار گرفته شده سطح بالائی از تنوع ژنتیکی را در ماهیان سواحل اطلس نشان دادند ولی در نمونه های کانادائی تنوع ژنتیکی بدست نیامد. آنها وجود موتاسیون و تغییرات تکاملی در جایگاه های Microsatellite را بیشتر از ژن های mtDNA دانستند و بیان داشتند که هر دو روش بطور واضح جمعیتها را تفکیک نمود اما آنالیز داده های حاصل از Microsatellite تفاوت جغرافیائی بین جمعیت های سواحل جنوبی آمریکا را بخوبی نشان داد.

Zhao و همکاران (۲۰۰۵) به مطالعه جمعیتی و ذخایر مولدین تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis* Gray) در رودخانه یانگ تسه و با استفاده از ۴ جایگاه مایکروساتلایتی پرداختند و تمایز ژنتیکی مشخصی را بدست نیاوردند و نتیجه گیری کردند که فقدان تنوع ژنتیکی بین گروه های سنی مختلف که در این رودخانه زیست می کنند میتواند حاکی از ثابت ماندن تنوع و پایداری ژنتیکی در موجوداتی که دارای طول عمر طولانی هستند، باشد.

Zhu و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه تنوع ژنتیکی تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) از ۲۵ آغازگر مایکروساتلایت تاس ماهی دریاچه ای را استفاده کردند که ده آغازگر به خوبی تنوع چندشکلی (پلی مورفیسم) را نشان داد که تنوع ژنتیکی بدست آمده در نمونه های بالغ و جوان زیاد بود. تنوع بالای بدست آمده در این بررسی نسبت به مطالعه از طریق آلوزایم ها و روش RAPD در جمعیت رودخانه یانگ تسه بیشتر و بهتر بود.

Brown و همکاران در سالهای ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ به بررسی هتروپلاسمی طولی در ناحیه D-loop میتوکندریایی و بررسی تنوع توالی DNA در جمعیت های تاسماهی سفید رودخانه کلمبیا و Fraser پرداختند و عنوان نمودند که فراوانی و درصد وقوع هتروپلاسمی بین جمعیت های گونه فوق در دو رودخانه مورد بررسی متفاوت می باشد. در بررسی های توالی یابی ۱۹ هاپلو تپ بدست آمد و مقایسه بین هاپلو تپ ها در ناحیه D-loop نشان داد که نمونه های رودخانه های کلمبیا و Fraser اخیرا از یکدیگر جدا شده و هریک جمعیت مستقلی می باشند. همچنین میانگین سرعت جایگزینی نوکلئوتیدی در منطقه D-loop را نسبت به mtDNA ۴/۳ بدست آوردند که خیلی شبیه

به منطقه D-loop انسان می باشد. آنها با توجه به سرعت بالای جایگزینی نوکلئوتیدی منطقه D-loop عنوان نمودند که این ناحیه قابلیت یک مارکر ژنتیکی برای مطالعات مولکولی جمعیت ها را دارد.

Miracle و همکاران در سال ۱۹۹۵ با تعیین توالی ناحیه D-loop میتوکندریایی در تاسماهی خلیج مکزیک (*A. oxyrinchus*) به این نتیجه رسیدند که در تمامی نمونه ها هتروپلاسمی برای توالی های تکراری ناحیه D-loop وجود داشته و فقدان تنوع در توالی های DNA و تکرار بازها در توالی ها ثابت کرد که زیرگونه ها، در منطقه مورد مطالعه یک جمعیت با تنگنای ژنتیکی را ایجاد کرده اند.

Ong-Tun-liang و همکاران در سال ۱۹۹۶ با استفاده از تعیین توالی mtDNA ناحیه D-loop توانستند دو زیرگونه از جمعیت گونه (*A. oxyrinchus*) در سواحل آتلانتیک و خلیج مکزیک را شناسایی نمایند.

Wirgin در سال ۲۰۰۲ ساختار جمعیتی تاسماهی اطلس را بر اساس توالی یابی ناحیه کنترلی mtDNA مورد بررسی قرار داده و توانست حداقل ۷ ذخیره ژنتیکی را در بین زیرگونه ها تشخیص دهد.

Ludwig و همکاران نمونه های *A. sturio* را در مناطق مختلف آلمان و نمونه های *A. oxyrinchus* اقیانوس اطلس در سواحل نیوجرسی را با استفاده از توالی یابی ناحیه D-loop مورد مقایسه قرار داده و طول واحدهای تکراری را برای *A. sturio* ۸۰ جفت باز و برای *A. oxyrinchus* ۷۹ جفت باز بدست آوردند و در سه هاپلوטיפ مختلف هتروپلاسمی را مشاهده نکردند. بر اساس نتیجه بدست آمده فاصله و شباهت ژنتیکی زیادی در بین جمعیت های *A. oxyrinchus* بدست آمد.

Wirgin و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از دو روش تعیین توالی mtDNA و مایکروستلایت به بررسی جمعیت های زیرگونه های تاسماهی اطلس پرداخته و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در ماهیان سواحل اطلس بدست آوردند ولی عنوان نمودند که نمونه های کانادایی فاقد تنوع ژنتیکی می باشند. آنها وجود موتاسیون و تغییرات تکاملی در جایگاههای مایکروستلایت را که بیشتر از mtDNA می باشد را دلیل این نتایج دانستند. هر دو روش بطور واضح جمعیت ها را جدا کرد اما آنالیز مایکروستلایت تفاوت جغرافیایی بین جمعیت های سواحل جنوبی آمریکا را بهتر نشان داد.

Stabile و همکاران با استفاده از روش RFLP و تعیین توالی mtDNA در ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های تاسماهی خلیج مکزیک (*A. o. desotoi*) پرداختند و بیان نمودند که ۴ یا ۵ جمعیت از این گونه در سواحل خلیج مکزیک وجود دارد که بعضی از این جمعیت ها فقط در یک رودخانه زیست می کنند.

Birstein و همکاران در سال ۱۹۹۹ روابط تکاملی ماهیان خاویاری را با سه ژن میتوکندریایی (Cyt b، ۱۲S، ۱۶S) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی حاکی از سه فرضیه بود: ۱ - گونه *Scaphirhynchus albus* با جنس های تاسماهی و فیلماهی قرابت خواهری دارد. ۲ - دو جنس فیلماهی در داخل جنس تاسماهی مخلوط شده و بعنوان یک واحد تاکسونومیک نمی باشد. ۳ - سه کلاستر اصلی در داخل جنس

تاسماهی وجود دارد شامل الف: *A. sturio-A. oxyrinchus* ب: *A. schrenckii-A. transmontanus* و ج: تمامی گونه های تاسماهیان دریای خزر شامل *A. dabryanus* و *A. brevirostrum*

Walsh و همکاران در سال ۲۰۰۱ در بررسی ساختار جمعیتی تاسماهی پوزه کوتاه (*A. brevirostrum*) از صفات مورفولوژیکی و تعیین توالی mtDNA استفاده نمودند. نتایج بین نمونه های سه رودخانه، وجود ۱۵ هاپلوتیپ را تأیید نمود.

Fain و همکاران در سال ۲۰۰۰ برای تشخیص خاویار گونه های مختلف تاسماهیان از روش تعیین توالی ناحیه *Cytochrom b* استفاده کردند و نتایج بدست آمده حاکی از وجود تنوع کم در بین گونه های مختلف تاسماهیان بود. آنها عنوان کردند که بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی بین تاسماهی روسی و ازون برون وجود دارد همچنین هیچ تنوع درون گونه ای در نمونه های توالی یابی شده از گونه های *A. mikadoi*، *A. fluvescens*، *A. brevirostrum*، *Huso huso*، *A. persicus* و *A. nudiventris* بدست نیاوردند.

Ludwig و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی وجود و یا عدم وجود هتروپلاسمی ناحیه کنترلی mtDNA تاسماهیان در سه جنس *Huso*، *Scaphirhynchus* و *Acipenser* با روش تعیین توالی پرداختند و عنوان نمودند که واحدهای تکراری ماهیان خاویاری بین ۸۳ - ۷۴ جفت باز طول داشته و در گونه *Polyodon spathula* واحدهای تکراری وجود ندارد.

Congiu و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش AFLP شناسایی انواع خاویار، گوشت و هیبریدهای درون گونه ای در ماهیان خاویاری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از باندهای پلی مورفیک پس از الکتروفورز توانست جنس ها و هیبریدهای مختلف را براحتی تفکیک نماید. ایشان عنوان نمودند که تکنیک AFLP یک روش فوق العاده قوی برای شناسایی جنس و محصولات آنها که به بازار عرضه می شود، می باشد.

Robles و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی جمعیتی و فایلوژنی خانواده تاسماهیان با استفاده از روش مایکروستلایت پرداخته و به این نتیجه رسیدند که ۱۳ گونه مورد مطالعه از جنس تاسماهی (*Acipenser*)، فیلماهی (*Huso*) و پاروپوزه (*Scaphirhynchus*) متعلق به خانواده تاسماهیان می باشند.

Krieger و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از ۵ ژن میتوکندریایی (*Cytochrom b*، *rRNA 12S*، *tRNAAsp*، *cytochrome c oxidase subunit II* و *tRNA<sup>Phe</sup>*) به بررسی روابط تکاملی در ۲۵ جنس تاسماهیان پرداختند و بر اساس ترسیم درخت فایلوژنی ماکزیمم پارسیمونی، ماکزیمم لایکلی هود و ... نتایج مختلفی کسب نمودند و عنوان نمودند که جهت تفکیک کامل آنها نیاز به بررسی های بیشتر با استفاده از ژنوم هسته ای می باشد.

Mugue و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده توالی ژن D-loop میتوکندریایی به بررسی روابط درون گونه ای و بین گونه ای ۹ جنس از تاسماهیان پرداختند. اگرچه نتایج حاصله تمایز ژنتیکی بین تاسماهی روسی و ایرانی را نشان داد ولی آنها بیان داشتند که مطالعات بیشتر با استفاده از ژنوم هسته ای بایستی انجام گیرد.

Pourkazemi در سال ۱۹۹۶ با استفاده از تعیین توالی ناحیه D-loop میتوکندریایی به بررسی و مطالعه روابط تکاملی بین پنج گونه از تاسماهیان سواحل جنوبی دریای خزر پرداخت و عنوان نمود که این ناحیه در نمونه های مورد بررسی دارای هتروپلاسمی می باشد بطوریکه در نمونه های پنج گونه فوق هتروپلاسمی مشاهده شده بوسیله یک توالی ۸۲ جفت بازی که در این ناحیه تکرار می گردد، ایجاد شده است. همچنین بیان نمود که وجود اختلاف کم در توالی ناحیه کنترلی شاید بدلیل حفاظت شدگی شدید مولکول mtDNA باشد و برای مطالعات فیلوژنی مناسب ندانست. وی میزان بالایی از تنوع توالی را پس از نتایج حاصل از تعیین توالی قسمتی از ژن ND5 میتوکندریایی در بین پنج گونه تاسماهی سواحل جنوبی دریای خزر محاسبه نمود و بیان کرد که این قسمت می تواند برای مطالعات جمعیتی و فیلوژنی بهتر باشد.

Rezvani Gilkolaiee (1997) با استفاده از روش RADP به مطالعه گونه های خاویاری دریای خزر پرداخت و توانست تفاوت معنی داری را در جایگاههای ژنی RADP گروههای فیل ماهی متعلق به مناطق غربی و شرقی جنوبی دریای خزر مشاهده نماید. پس از رسم درخت فیلوژنی تاس ماهی ایرانی و فیل ماهی دریکی کلاستر قرار گرفتند، ماهی شیپ و اوزون برون در کلاستر جداگانه دیگر قرار گرفتند و در بررسی فیلوژنی تاسماهی روسی خویشاوندی نزدیکی با فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی داشت.

Rezvani (2000) به مطالعه وجود جمعیت های تاسماهی روسی در سواحل جنوبی دریای خزر و با استفاده از روش RFLP و ژن ND5/6 پرداخت و توانست اختلاف معنی داری را در پراکنش هاپلوپیتها در قسمت های شرقی و غربی سواحل جنوبی دریای خزر بدست آورد و دلیل آن را پراکنش ژنتیکی عنوان کرد. کیوان شکوه (۱۳۸۱) به مطالعه امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی با استفاده از روش PCR-RAPD پرداخت و نتوانست با استفاده از این روش جنسیت را تشخیص دهد و عنوان نمود که احتمالاً کروموزوم های جنسی در فیل ماهی یا وجود نداشته و یا در صورت موجود بودن نقاط متمایز بسیار کمی بر روی کروموزوم های مذکور وجود دارد.

قاسمی (۱۳۸۲) به بررسی مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش RFLP پرداخت. نتایج بررسی وی نشان داد که جمعیت ماهی شیپ رودخانه اورال از جمعیت سواحل جنوبی دریای خزر جدا بوده و آنزیم Cfr13I را به عنوان یک مارکر مولکولی جهت تمایز این دو جمعیت معرفی کرد.

شعبانی (۱۳۸۴) با بررسی دو ناحیه D-Loop و ND5/6 میتوکندریایی توانست ازون برون رودخانه ولگا و حوزه جنوبی دریای خزر را از هم تفکیک نموده و آنزیم برشی HinfI با ژنوتیپ C را به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی ازون برون رودخانه سفیدرود و آنزیم برشی MboI با ژنوتیپ B یا C و آنزیم HaeIII با ژنوتیپ B را بعنوان مارکر مولکولی ازون برون رودخانه ولگا معرفی نمود.

صفری در سال ۱۳۸۵ با استفاده از چهار جایگاه مایکروستلایتی به بررسی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی شیب دریای خزر پرداخت و تنوع بالایی را در این گونه گزارش نمود. همچنین بیان نمود که اختلاف معنی داری بین نمونه های رودخانه اورال و سواحل جنوبی دریای خزر ( $P \leq 0.01$ ) وجود دارد.

خوش خلق در سال ۱۳۸۵ با استفاده از پنج جفت آغازگر مایکروستلایتی به بررسی ساختار ژنتیکی تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) و تاسماهی روسی (*A. guldenstaedtii*) پرداخت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تاسماهی ایرانی دارای سه جمعیت رودخانه سفیدرود، ناحیه سه شیلاتی و ترکمنستان و تاسماهی روسی دارای سه جمعیت مستقل رودخانه ولگا، رودخانه اورال و سواحل جنوبی دریای خزر می باشد. همچنین جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود را به عنوان یک جمعیت مستقل اعلام نمود.

پورکاظمی در سال ۱۳۸۵ با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر مایکروستلایتی به بررسی جمعیت های فیلماهی دریای خزر پرداخت. نتایج حاصله وجود جمعیت های متفاوتی از این گونه را در رودخانه های اورال، ولگا و سواحل جنوبی دریای خزر نشان داد.

پورکاظمی و همکاران در سال ۱۳۸۷ ساختار ژنتیکی ۵ گونه از تاسماهیان دریای خزر را با استفاده از روش های مایکروستلایت برای گونه های فیلماهی، ازون برون و تاسماهی ایرانی و PCR-RFLP (ژن های D-Loop و ND5/6) برای گونه های شیب و تاسماهی روسی مورد ارزیابی قرار داد. ایشان با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد داد تا فعالیت های بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری بایستی بر مبنای اصول ژنتیکی صورت پذیرد و گونه های بومی بویژه رودخانه سفیدرود با استفاده از مارکرهای ژنتیکی شناسایی و از انقراض نسل آنها جلوگیری شود.

Norouzi و همکاران در سال ۲۰۰۸ ساختار ژنتیکی ماهی ازون برون سواحل جنوبی دریای خزر را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشاندهنده وجود سه جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر بود و جمعیت ناحیه دو شیلاتی (حوالی رودخانه سفیدرود) را یک جمعیت مستقل اعلام نمود. وی عنوان نمود که بایستی توجه مدیریتی ویژه ای به بازسازی ذخایر ژنی این جمعیت مستقل از طریق مراکز بازسازی ذخایر تاسماهیان بایستی اعمال گردد.

## ۲-۴-۱- مطالعات جمعیتی با استفاده از روش های مولکولی در تاسماهی ایرانی

با توجه به اهمیت تاسماهی ایرانی در اقتصاد سازمان شیلات ایران و نیز میزان ذخایر آن در دریای خزر نسبت به سایر گونه ها، مطالعات اندکی در زمینه ژنتیک مولکولی و تعیین ساختار ژنتیک آن در سواحل جنوبی دریای خزر انجام شده است.

Rostami در سال ۱۹۶۱ توانست نژادهای مختلفی از تاسماهی ایرانی را در رودخانه سفیدرود شناسایی نماید ولی نتوانست جمعیت ها را در سواحل جنوبی مشخص نماید.

Rezvani Gilkolaei در سال ۱۹۹۷ با استفاده از روش توالی یابی DNA ساختار ژنتیکی تاسماهی ایرانی را در مناطق غربی و شرقی سواحل جنوبی دریای خزر مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصله حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در فراوانی الل ها بود.

پورکاظمی در سال ۱۳۸۵ ساختار ژنتیکی جمعیت تاسماهی ایرانی در نوار ساحلی جنوب دریای خزر را با استفاده از ۳ جفت آغازگر مایکروستلایت مورد بررسی قرار داد. وی توانست جمعیت تاسماهی رودخانه سفیدرود را تفکیک نموده و نیز اختلاف معنی داری را بین نمونه های غرب و شرق دریای خزر بدست آورد. پورکاظمی و همکاران در سال ۱۳۸۷ به مطالعه ساختار ژنتیکی تاسماهی ایرانی دریای خزر با استفاده از ۹ جفت آغازگر مایکروستلایت پرداخت. نتایج بدست آمده حاکی از وجود سه جمعیت مستقل در دریای خزر شامل دو جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر و یک جمعیت در ناحیه خزر شمالی بود. وی با توجه به اینکه تاسماهی ایرانی گونه غالب و اصلی را در صید تاسماهیان نوار ساحلی ایران دارد، پیشنهاد نمود که سایر جمعیت های این گونه با استفاده از سایر روش های مولکولی مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

قرائی (۱۳۸۰) با استفاده از روش RADP به تشخیص مولکولی دو گونه تاسماهی ایرانی (*A.persicus*) و تاس ماهی روسی (*A.guldenstaedtii*) پرداخت و توانست با استفاده از این روش تاسماهی ایرانی را بعنوان یک گونه مستقل از تاس ماهیان روسی تفکیک نماید.

عطائی (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی در رودخانه سفید رود، جنوب شرقی و غربی دریای خزر را با استفاده از PCR-RFLP مورد بررسی قرار داد. نتایج مطالعات فوق مشخص کرد که جمعیت های مورد مطالعه همگن می باشند.

Yarmohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مطالعه بررسی تعیین جنسیت تاسماهی ایرانی با روش AFLP پرداختند. در این بررسی در حدود ۳۷۷۱ باند قابل شمارش بدست آمد ولی هیچکدام معرف مارکر جنسیتی نبود و اعلام نمود که جهت تشخیص جنسیت در تاسماهیان این روش کافی نبوده و نیاز به بررسی های بیشتر و با سایر روش های مولکولی مورد نیاز می باشد.

Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی تنوع ژنی جمعیت تاسماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر (آستارا، نوشهر، بندر ترکمن و رودخانه سفیدرود) با استفاده از توالی یابی DNA و ژن D-Loop میتوکندریایی پرداختند. بر اساس نتایج بدست آمده ۶ هاپلوتیپ و ۴۴ جایگاه متغییر بدست آمد، تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به ترتیب  $0.028 \pm 0.0640$  و  $0.011 \pm 0.0442$  بود. بر اساس فاکتور *Fst* بیشترین تنوع در درون نمونه ها بدست آمد و اختلاف معنی داری بین مناطق نوشهر، آستارا و بندر ترکمن بدست نیامد. بر اساس جریان ژنی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و سایر مناطق جدایی تولید مثلی وجود داشته که می تواند بدلیل جدایی جغرافیایی باشد. ایشان پیشنهاد دادند تا جمعیت رودخانه سفیدرود مورد توجه ویژه مدیریتی قرار گیرد.

Chakmehdouz و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از ۴ جفت آغازگر مایکروستلایتی به بررسی ساختار جمعیتی تاسماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر طی گشت های ارزیابی ذخایر تاسماهیان پرداختند. در این بررسی تمامی آغازگرها تولید باندهای پلی مورف (چند شکلی) نمودند. ۱۰۹ الل مشاهده شد که بیشترین الل مشاهده شده (۱۷) متعلق به جایگاه ژنی *Spl168* حوضه آبریز رودخانه سفیدرود بود. بر اساس میانگین الل های مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین دو منطقه مورد مطالعه (حوضه آبریز رودخانه سفیدرود و گرگانرود) اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد ولی بر اساس فاکتورهای *Fst* و *Rst* (۰/۰۷ و ۰/۱۷) که نشانه جدایی جمعیت ها است، اختلاف آماری معنی دار بود. همچنین تفاوت ژنتیکی قابل توجه و معنی داری (۰/۴) بر اساس فاکتور فاصله ژنتیکی بین دو منطقه مورد مطالعه بدست آمد. بر اساس نتایج داده های بدست آمده جمعیت تاسماهی ایرانی در دو منطقه فوق هر یک جمعیت مستقلی را نشان دادند و ایشان پیشنهاد دادند تا بمنظور حفظ خزانه ژنی و ازدیاد ذخایر هر یک از این جمعیت ها بایستی مدیریت شیلاتی اعمال گردد.

Moghim و همکاران در سال ۲۰۱۲ شناسایی و جداسازی جایگاه های مایکروستلایتی در تاسماهی ایرانی و امکان تکثیر آنها در ژنوم ۴ گونه دیگر از ماهیان خاویاری را مورد بررسی قرار دادند. در بررسی فوق ۱۸۰۰ کلونی سفید از کتابخانه ژنومی تاسماهی ایرانی جداسازی شد و برای کنترل تکرار متوالی نوکلئوتیدها با استفاده از این روش غربال سازی شدند و سپس ۳۵۰ کلونی شناسایی و توالی یابی گردیدند. نتایج حاصل از توالی یابی نشان داد که تعدادی از این آغازگرهای شناسایی شده برای شناسایی جمعیت های شیپ، ازون برون و فیلماهی مناسب می باشند.

## ۲- روش کار

### ۱- ۲- نمونه برداری

عملیات نمونه برداری در زمان گشت های ارزیابی ذخایر و طی سال های پاییز ۱۳۸۸ لغایت زمستان ۱۳۹۰ در اعماق بالای ۱۰ متر توسط کشتی تحقیقاتی گیلان و اعماق کمتر از ۱۰ متر توسط لنج سی سرای ۲ (تصویر ۲) و با استفاده از تور ترال کفی انجام گردید (تصویر ۳). در طی این مدت تعداد ۱۲۳ نمونه باله دمی جمع آوری گردید که ۹۴ نمونه متعلق به تاسماهی ایرانی، ۲۰ نمونه متعلق به ماهی ازون برون، ۷ نمونه متعلق به تاسماهی روسی، ۲ نمونه متعلق به ماهی شیب بود (جدول ۴). قسمت نرم باله دمی با قیچی بریده شده و داخل تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری حاوی الکل خالص قرار داده شد.



تصویر ۲ - کشتی تحقیقاتی گیلان و لنج سی سرای ۲

جدول ۴ - تعداد نمونه های جمع آوری شده طی گشت ارزیابی ذخایر سالهای ۱۳۸۸ و ۱۳۹۰

جمع	ناحیه ۵	ناحیه ۴	ناحیه ۳	ناحیه ۲	ناحیه ۱	ناحیه / گونه
۹۴	۲۳	۲۲	۲۴	۱۲	۱۳	تاسماهی ایرانی
۲۰	۶	۲	۶	۴	۲	ازون برون
۷	۱	۳	۱	-	۲	تاسماهی روسی
۲	-	-	-	-	۲	شیب
-	-	-	-	-	-	فیلماهی
۱۲۳						جمع کل





تصویر ۳ - تور ترال کفی و نمونه های صید شده

## ۲-۲-۲ - استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش استات آمونیوم (چکمه دوز، ۱۳۸۴) استفاده شد. مراحل کار به شرح ذیل انجام گردید:

مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافر STE به همراه ۱۰۰ - ۵۰ میلی گرم از بافت نرم باله دمی داخل ویال های استریل ۱/۵ میلی لیتری ریخته و پس از خرد کردن با قیچی، ۵۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ و مقدار ۵ میکرولیتر از پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) جهت هضم پروتئین ها اضافه شد. ویال ها داخل دستگاه ترمومیکسر و در حرارت ۵۵ درجه سانتیگراد بمدت یک شبانه روز قرار داده شد تا محلول بصورت امولسیون غلیظ درآید. سپس مقدار ۶۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۷/۵ مولار اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول رویی جدا و داخل ویال ۱/۵ میلی لیتری استریل جدید ریخته شد و جهت رسوب DNA مقدار ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه شد. ویال ها به آرامی چندین بار سر و ته شده و مدت ۷ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و بمنظور خارج کردن نمک های اضافی مقدار ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه گردید. مدت ۳ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا شده و پس از خشک شدن الکل های اضافی داخل ویال مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل جهت حل شدن پلت DNA اضافه گردید.

### ۱-۲-۲-۲ - مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA، نحوه تهیه بافرها

مواد مورد نیاز عبارتند از: بافر STE، استات آمونیوم ۷/۵ مولار، پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) ساخت شرکت Fermentas انگلستان، محلول SDS ۲۰ درصد (سدیم دود سیل سولفات)، اتانول مطلق و ۷۰ درصد، آب مقطر تزریقی و میکروسپلرها.

طرز تهیه بافر STE:

۰/۱ مولار	NaCl
۰/۰۵ مولار	Tris-HCl
۰/۰۱ مولار	EDTA

پس از حل نمودن مواد در آب مقطر دو بار تقطیر pH را به ۸ رسانده و حجم نهایی به یک لیتر افزایش داده شد.

طرز تهیه محلول SDS ۲۰٪:

مقدار ۲۰ گرم از پودر SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) را وزن کرده و سپس مقدار ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه میکنیم. این ماده برای حل شدن به دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتیگراد نیاز دارد.

### ۳-۲- ارزیابی کمی و کیفی DNA های استخراج شده

دانستن کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده جهت انجام PCR بسیار مهم می باشد زیرا عدم استفاده از غلظت و خلوص مناسب می تواند تولید باندهای غیراختصاصی نموده، زمان انجام آزمایش افزایش یافته و هزینه مواد و آنزیم ها بیشتر گردد. در این بررسی جهت شناخت غلظت از تکنیک اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و جهت شناخت کیفیت از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

#### ۱-۳-۲- ارزیابی کمی (تعیین غلظت DNA)

غلظت و خلوص DNA های استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND1000 که خاصیت جذب نوری DNA را دارد، تعیین شد. برای انجام این کار، ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر را با آب مقطر کالیبره کرده و سپس مقدار ۱-۲ میکرولیتر از DNA خالص استخراج شده به داخل محفظه مخصوص دستگاه منتقل شد، میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (غلظت DNA) و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر (خلوص DNA) بصورت اتوماتیک توسط دستگاه محاسبه گردید.

#### ۲-۳-۲- ارزیابی کیفی

کیفیت ظاهری DNA های استخراج شده بر اساس روش الکتروفورزی (Sambrook et al., 1989) بر روی ژل آگارز ۱٪ و میزان فلورسانس ترکیب اتیدیوم برومید (Ethidium bromide) جذب شده بوسیله DNA توسط دستگاه ژل داکيومنت (Gel document) مشخص گردید. اتیدیوم برومید با بازهای DNA پیوند ایجاد کرده (Intercalate) و فلورسانس نارنجی رنگی پس از تابش نور فرابنفش (UV) از خود منتشر می کند. با استفاده از این روش شکل

ظاهری، شدت وضوح، داشتن یا نداشتن زمینه، کیفیت DNA و میزان تقریبی کمیت آنها مشخص می گردد. مواد مورد استفاده عبارتند از: بافر TAE با غلظت 10X (تریس ۲۴/۴ گرم، اسید استیک گلاسیال ۵/۷۱ میلی لیتر، EDTA ۰/۵ مولار ۸ pH = ۱۰ میلی لیتر)، پودر آگارز، بافر سنگین کننده (Loading buffer) اتیدیوم بروماید ۰/۱٪، آب مقطر تزریقی

مراحل کار بشرح ذیل انجام گرفت:

- ۱ - سینی ژل را پس از تمیز و خشک کردن داخل قاب مخصوص قرار داده (جهت عدم نشستن ژل) و سپس در داخل تانک الکتروفورز و زیر هود آزمایشگاهی قرار گرفت.
- ۲ - مقدار ۰/۴ گرم از پودر آگارز (Merck) به داخل شیشه ارلن خلاء کوچک (۱۰۰ ml) ریخته شد. (این مقدار بر اساس اندازه سینی ژل قابل تغییر می باشد).
- ۳ - مقدار ۴ میلی لیتر از بافر TAE  $10 \times$  را با آب مقطر به حجم ۴۰ میلی لیتر رسانده و داخل ارلن خلاء حاوی پودر آگارز اضافه شد.
- ۴ - ارلن خلاء روی هات پلت با دمای ۳۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا پودر آگارز حل و به صورت سوسپانسیون شفاف درآید.
- ۵ - پس از خنک شدن سوسپانسیون ژل در زیر هود (رسیدن به دمای ۴۵ - ۳۵ درجه سانتیگراد) مقدار ۳ میکرولیتر اتیدیوم برمید ۱ درصد به آن اضافه و پس از همزدن روی سینی ژل ریخته شد.
- ۶ - پس از انعقاد، شانه از ژل خارج گردید و سپس سینی به همراه ژل داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE  $1 \times$  قرار گرفت.
- ۷ - مقدار ۵ میکرولیتر از DNA خالص به همراه ۵ میکرولیتر آب مقطر و ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده (Loading buffer) داخل تیوپ ۰/۵ میلی لیتری مخلوط و به داخل چاهک های ژل ریخته شد.
- ۸ - تانک الکتروفورز به مولد ایجاد برق با جریان ۱۰۰ ولت متصل شد.
- ۹ - پس از رسیدن بافر سنگین کننده به نصف یا کمی مانده به انتهای ژل، دستگاه مولد برق خاموش و برای بررسی کیفیت، وجود و یا عدم وجود DNA های استخراجی، ژل آگارز به داخل دستگاه ثبت تصاویر انتقال یافت.

#### ۴ - ۲ - آغازگر (Primer) ژن D-loop میتوکندریایی

در این بررسی بمنظور انجام آزمایشات مولکولی و PCR، از ژن D-loop میتوکندریایی تاسماهی دریاچه ای استفاده و با استفاده از نرم افزار GENERUNR توالی زیر طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد:

Forward 5/ TGG CAT CTG GTT CCT ATT TC 3/  
Reverse 5/ GCA TGT GGG GGT AAT TGG AG 3/

## ۵ - ۲ - آغازگر (Primer) ژن *Cytochrom b* میتوکندریایی

از توالی ژن *Cytochrom b* میتوکندریایی تاسماهی روسی (*Acipenser guldenstaedtii*) ثبت شده به شماره AF238704 در بانک ژن NCBI بمنظور انجام آزمایشات تکمیلی مولکولی و PCR، با استفاده از نرم افزار GENERUNR توالی زیر طراحی و توسط شرکت ژن فن آوران سنتز شد:

F 5' GTT GCC CAC ATC TGC CGA G 3'

R 5' GAG AAT GGC GTA GGC GAA GA 3'

نکته: جهت ساخت رشته Reverse، مکمل بازها ساخته می شود.

## ۶ - ۲ - واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR)

برای تکثیر توالی های ژن D-loop و ژن *Cytochrom b* از دستگاه ترمال سایکل مدل XP cycler ساخت شرکت BIOER چین استفاده و مواد ذیل بکار گرفته شد:

آنزیم Taq DNA پلیمرز (شرکت سیناژن)،  $50\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  (شرکت سیناژن)، PCR Buffer در غلظت  $10\times$  (شرکت سیناژن)،  $10\text{dNTP Mix}$  میلی مولار (شرکت سیناژن)، آب مقطر تزریقی، DNA استخراج شده با غلظت  $100$  نانوگرم، آغازگرهای ژن D-loop و ژن *Cytochrom b* با غلظت  $30$  پیکومول

### ۱ - ۶ - ۲ - غلظت مواد و چرخه های حرارتی ژن های *Cytochrom b* و D-loop

بمنظور انجام PCR و تکثیر توالی ژن های مورد نظر، ۱۸ نمونه DNA تاسماهی ایرانی (نمونه هایی که دارای بیشترین طول و وزن بودند بمنظور نتایج آنالیز جمعیتی بهتر) مناسب تشخیص داده شدند (نواحی ۲، ۳ و ۴ هر یک ۵ نمونه و رودخانه سفیدرود ۳ نمونه). برای هر نمونه یک ویال  $0.2$  میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت شد. سپس روی یخ داخل هر یک از ویالها مقدار  $1$  میکرولیتر DNA  $100$  نانوگرم اضافه شد و پس از آن داخل تیوپ  $1/5$  میلی لیتری استریل مخلوط زیر جهت انجام PCR تهیه شد (جدول ۵).

جدول ۵ - نوع و مقدار مواد استفاده شده در PCR ژن های *Cytochrom b* و *D-loop*

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۵۰ میکرولیتری
آنزیم <i>Taq DNA</i> پلیمراز	۵u/μl	۰/۴ میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۱ میکرولیتر
MgCl <sub>2</sub>	۵۰ میلی مولار	۱/۵ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۵ میکرولیتر
آغازگر ۱	۳۰ پیکومول	۱ میکرولیتر
آغازگر ۲	۳۰ پیکومول	۱ میکرولیتر
DNA	۱۰۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر
آب مقطر	-	تا ۵۰ میکرولیتر

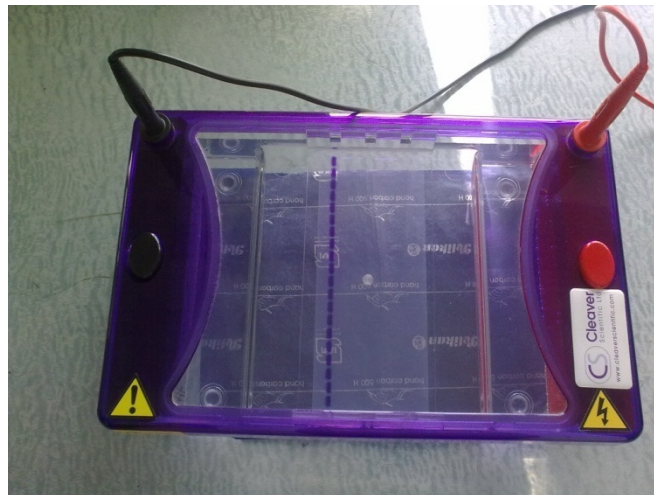
محتویات ویال ۱/۵ میلی لیتری را با دستگاه Vortex مخلوط کرده و سپس مقدار ۴۹ میکرولیتر داخل هر یک از ویالهای ۰/۲ میلی لیتری حاوی DNA اضافه شد. ویالها به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید تا مواد داخل آن بصورت یکنواخت و بدون حباب در ته ویال جای گیرند و پس از آن ویال ها داخل دستگاه ترمال سایکلر و چرخه های حرارتی مورد نیاز (جدول ۶) قرار گرفت.

جدول ۶ - چرخه های حرارتی PCR جهت تکثیر توالی ژن های *Cytochrom b* و *D-loop*

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳۰۰ (۵ دقیقه)	۱
واسرشته سازی الحاق	۹۴	۳۰	۳۵
بسط	۵۱	۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۴۵	۱
بسط نهایی	۷۲	۶۰۰ (۱۰ دقیقه)	
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۲۴۰ (۴ دقیقه)	۱
واسرشته سازی الحاق	۹۴	۶۰	۳۰
بسط	۵۱	۶۰	
بسط نهایی	۷۲	۶۰	۱
بسط نهایی	۷۲	۶۰۰ (۱۰ دقیقه)	

## ۷-۲- الکتروفورز ژل آگارز

برای مشاهده تک باند حاصل از محصول PCR ژن های D-loop و Cytochrom *b* از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (تصویر ۴). برای اینکار پس از آماده کردن ژل و قرار دادن آن داخل تانک الکتروفورز، برای هر یک نمونه محصول PCR مقدار ۵ میکرولیتر به همراه ۳ میکرولیتر بافر لودینگ داخل هر یک از چاهک های ژل ریخته شد و در یکی از چاهک های دیگر جهت تعیین اندازه باندهای بدست آمده از مارکر مولکولی ۱۰۰ bp استفاده گردید.



تصویر ۴- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد

## ۸-۲- توالی یابی

تعداد ۱۸ نمونه از محصول PCR هر ژن (مناطق ۲، ۳ و ۴ شیلاتی ۵ نمونه و رودخانه سفیدرود ۳ نمونه) به همراه رشته های آغازگر ۱ (Forward) جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید.

### ۱- ۸-۲- تجزیه و تحلیل آماری داده ها

بمنظور شناسایی اختلاف میان توالی ها، نمونه های توالی یابی شده با نرم افزار Clustal W بر اساس (Thompson *et al.*, 1997) و بازنگری توالی های مشابه با نرم افزار Chromas 2.23 (Technelysium, Tewantin, Australia) ردیف (Align) شد. بررسی روابط ژنتیکی و ترسیم درخت هاپلوتایپی Neighbor-Joining بر اساس مدل Kimura 2-parameter (Kimura, 1980)، ترسیم درخت ماکزیمم پارسیمونی با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم افزار Mega 4، شاخص های تنوع مولکولی نظیر تعداد هاپلوتایپ ها، مکان های چندشکلی، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei, 1987، شاخص توزیع شکل گاما (gamma distribution shapeparameter) بمنظور

برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان های مورد بررسی، واگرایی ژنتیکی بصورت جفتی داخل و بین مناطق نمونه برداری (فاکتور  $F_{st}$ , Slatkin, 1991) که نشانه جدایی جمعیت ها می باشد با ۱۰۰۰۰ تکرار، فراوانی هاپلوتایپی بمنظور معنی دار یا عدم معنی دار بودن با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 1992) و نرم افزار Dna SP (Rozas *et al.*, 2003) محاسبه گردید. فرضیه صفر مبنی بر مستقل بودن جمعیت ها با استفاده از آزمون دقیق (exact test) بر اساس اختلاف هاپلوتایپی بین جمعیت ها محاسبه شد. گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی (*Historical demographic and spatial expansions*) با دو روش ۱- تست تاجیما (*D-test of Tajima*) (Tajima, 1989a) ۲- تست  $F_u$  ( $F_u$ , Fu, 1997) بررسی شد.

## ۳- نتایج

## ۱-۳- نتایج حاصل از استخراج DNA

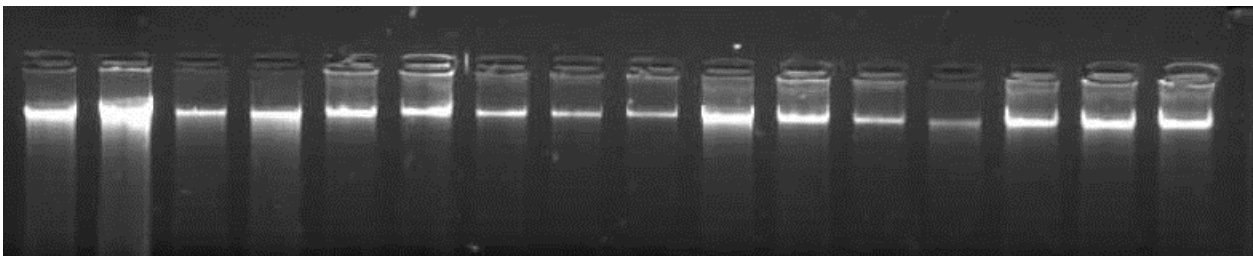
کمیت DNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ مدل (ND1000) در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و کیفیت آنها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بشرح ذیل می باشد:

## ۱-۱-۳- کمیت DNA های استخراج شده

نسبت جذب A260/A280 نشاندهنده خلوص DNA می باشد و بهترین حالت برای این نسبت بین ۱/۸-۲ می باشد. در این بررسی خلوص DNA های استخراجی در این میانه (۲-۱/۸) قرار داشت. غلظت DNA های استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید که بالاتر از ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود که برای واکنش PCR با آب مقطر تا رسیدن به غلظت ۱۰۰ نانوگرم رقیق گردید.

## ۲-۱-۳- کیفیت DNA های استخراج شده

وضوح باندهای DNA های استخراج شده (به غیر از نمونه های سفیدرود که به دلیل نگهداری طولانی مدت از کیفیت کمتری برخوردار بودند) بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان از کیفیت قابل قبول آنها برای واکنش PCR بود (تصویر ۵).

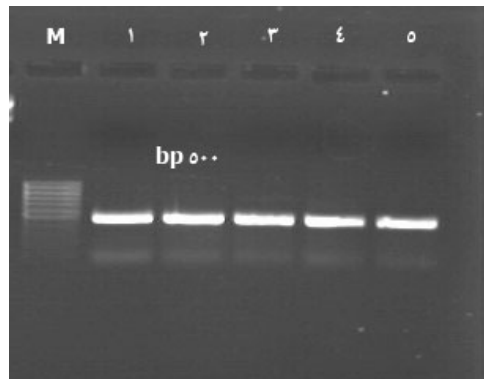


تصویر ۵- DNA های استخراج شده از باله دم تاسماهی ایرانی بر روی ژل آگارز ۱ درصد

## ۲-۳- نتیجه حاصل از PCR ژن D-loop تاسماهی ایرانی

نمونه های DNA ناحیه ۲ شیلاتی (۵ نمونه)، ناحیه ۳ شیلاتی (۵ نمونه)، ناحیه ۴ شیلاتی (۵ نمونه) و رودخانه سفیدرود (۳ نمونه) با آغازگر ژن D-loop میتوکندریایی PCR شد. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد به همراه مارکر ۱۰۰ bp در زیر اشعه UV، تولید باندهایی در محدوده ۵۰۰ جفت باز نمودند (تصویر ۶). مقدار ۴۵ میکرولیتر از محصول PCR هر یک از نمونه ها با آغازگر Forward ژن مورد استفاده جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید.





تصویر ۶ - الکتروفور محصول PCR ژن D-loop تاسماهی ایرانی

پس از دریافت اطلاعات بصورت فایل کروماس، توالی های فوق با استفاده از نرم افزار Clustal W ردیف (Align) شد و تمامی نمونه ها در بانک ژن NCBI به شماره JN646019 الی JN646030 ثبت گردید.

### ۱- ۲- ۳- هاپلوتایپ و ترسیم درخت هاپلوتایپی

تعداد ۱۳ هاپلوتایپ پس از آنالیز توالی های بدست آمده در نرم افزار Dna SP بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده هاپلوتایپ ۲ بین سفیدرود و ناحیه ۲ شیلاتی، هاپلوتایپ ۶ بین نواحی ۲ و ۴ شیلاتی، هاپلوتایپ های ۸ و ۱۰ بین نواحی ۳ و ۴ شیلاتی و هاپلوتایپ های ۸ و ۱۰ بین نواحی ۳ و ۴ شیلاتی مشترک می باشند. (جدول ۷).

جدول ۷ - پراکنش هاپلوتایپی ژن D-loop تاسماهی ایرانی

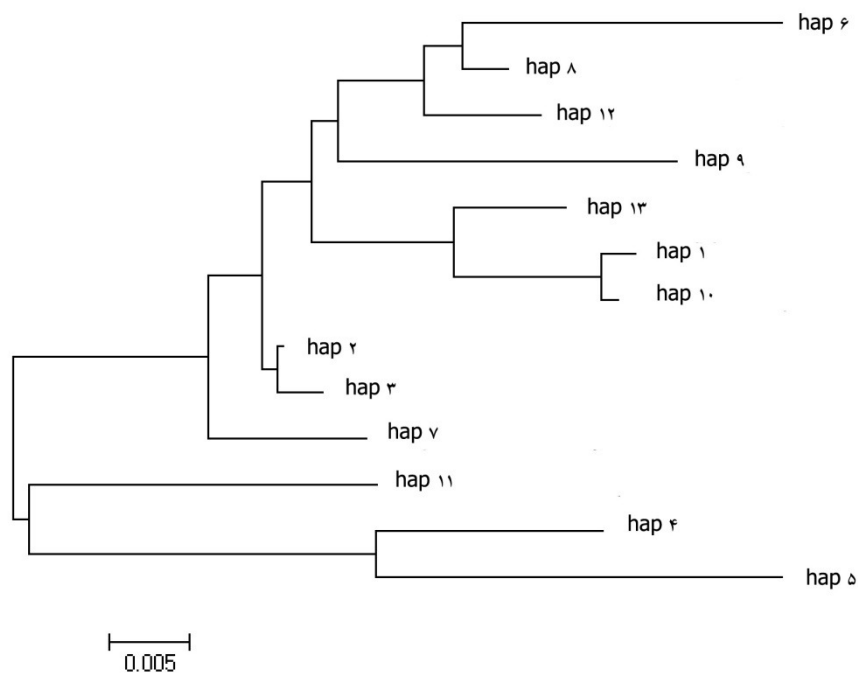
ناحیه	هاپلوتایپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	جمع
۲		۱			۱	۱	۱								۵
۳								۱	۱	۱	۲	۱			۵
۴							۱		۱		۱		۱	۱	۵
سفیدرود			۱	۱											۳
جمع		۱	۲	۱	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۳	۱	۱	۱	۱۸

فاصله ژنتیکی بین هاپلوتایپ ها بین ۰/۰۰۳ الی ۰/۰۹۶ توسط نرم افزار Mega4 محاسبه گردید (جدول ۸). کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۰۳) بین هاپلوتایپ های ۱ (رودخانه سفیدرود) و ۱۰ (ناحیه ۳) و هاپلوتایپ های ۲ و ۳ (رودخانه سفیدرود) و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۹۶) بین هاپلوتایپ های ۵ و ۶ (ناحیه ۲) بدست آمد.

جدول ۸ - فاصله ژنتیکی بین هاپلوتایپ های ژن D-loop تاسماهی ایرانی

هاپلوتایپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	*												
۲	۰/۰۲۶	*											
۳	۰/۰۲۹	۰/۰۰۳	*										
۴	۰/۰۷۵	۰/۰۵۳	۰/۰۵۷	*									
۵	۰/۰۸۵	۰/۰۶۳	۰/۰۶۷	۰/۰۴۰	*								
۶	۰/۰۴۴	۰/۰۳۶	۰/۰۴۰	۰/۰۸۵	۰/۰۹۶	*							
۷	۰/۰۳۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۹	۰/۰۵۷	۰/۰۷۰	۰/۰۴۶	*						
۸	۰/۰۲۷	۰/۰۲۰	۰/۰۲۳	۰/۰۶۷	۰/۰۷۷	۰/۰۲۳	۰/۰۲۹	*					
۹	۰/۰۴۸	۰/۰۲۶	۰/۰۳۰	۰/۰۸۱	۰/۰۹۲	۰/۰۵۱	۰/۰۳۶	۰/۰۲۶	*				
۱۰	۰/۰۰۳	۰/۰۲۳	۰/۰۲۶	۰/۰۷۸	۰/۰۸۸	۰/۰۴۷	۰/۰۳۳	۰/۰۳۰	۰/۰۴۴	*			
۱۱	۰/۰۶۰	۰/۰۴۰	۰/۰۳۶	۰/۰۵۷	۰/۰۷۰	۰/۰۷۱	۰/۰۴۶	۰/۰۵۳	۰/۰۶۷	۰/۰۶۳	*		
۱۲	۰/۰۳۶	۰/۰۱۶	۰/۰۲۰	۰/۰۷۰	۰/۰۸۱	۰/۰۲۶	۰/۰۳۳	۰/۰۱۶	۰/۰۳۷	۰/۰۳۳	۰/۰۵۶	*	
۱۳	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۲۳	۰/۰۷۴	۰/۰۸۴	۰/۰۴۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶	۰/۰۴۰	۰/۰۱۶	۰/۰۶۰	۰/۰۲۹	*

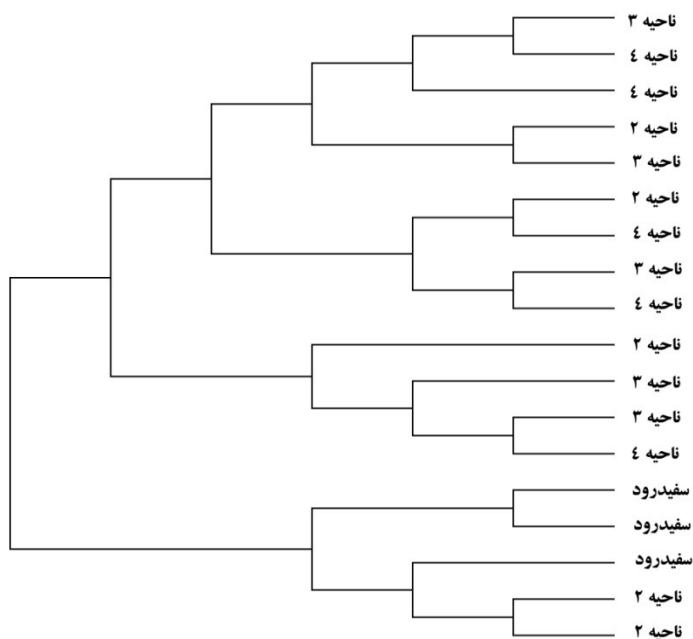
ترسیم درخت هاپلوتایپی Neighbor-Joining به روش فاصله Kimura 2-parameter وجود دو کلاستر مشخص را نشان داد که کلاستر اولی دارای بیشترین تنوع هاپلوتایپی بوده که حتی نمونه های رودخانه سفیدرود نیز در این کلاستر قرار دارند و کلاستر دومی شامل هاپلوتایپ نمونه های ناحیه ۲ و ۳ شیلائی می باشد (تصویر ۷).



تصویر ۷- درخت فیلوژنی ۱۳ هاپلوتایپ ژن D-loop تاسماهی ایرانی به روش Neighbor-Joining

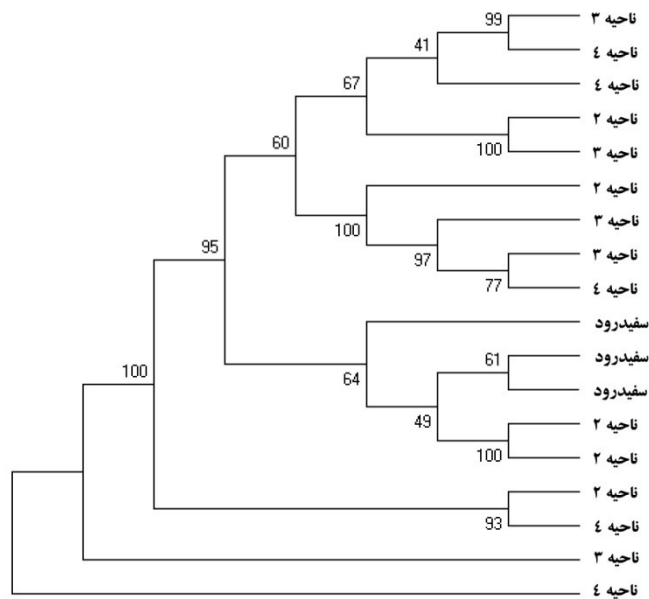
### ۲-۲-۳- ترسیم درخت تکاملی

بطور کلی ترسیم دندروگراف یا رسم درخت تکاملی برای تفسیر نتایج حاصل از داده های ژنتیکی شاخص مناسبی نبوده ولی می تواند تصویر مناسبی از نتایج حاصله را نشان دهد. در این بررسی درخت تکاملی توالی های بدست آمده به روش های Neighbor-joining و ماکزیمم پارسیمونی و ۱۰۰۰ بار تکرار رسم گردید که در روش Neighbor-joining به دو کلاستر اصلی تقسیم شده است بطوریکه در کلاستر اول نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۲ شیلاتی قرار داشته و در کلاستر دوم نمونه های نواحی ۳، ۴ به همراه نمونه های ناحیه ۲ قرار دارند. هریک از این دو کلاستر به شاخه های فرعی تقسیم شده اند و همانطور که در کلاستر اول نمونه های ناحیه ۲ با نمونه های سفیدرود قرابت ژنتیکی داشته و سایر نواحی نیز بدلیل نزدیکی فواصل با یکدیگر ادغام شده اند. بنابراین نتایج حاصل از ترسیم این درخت تکاملی بیانگر تمایز نمونه های رودخانه سفیدرود و تا حدودی نمونه های ناحیه ۲ شیلاتی با سایر نواحی شیلاتی می باشد (تصویر ۸).



تصویر ۸ - رسم درخت فیلوژنی Neighbor-joining ژن D-loop تاسماهی ایرانی

در روش ماکزیمم پارسیمونی و ۱۰۰۰ بار تکرار نمونه های ناحیه ۲ شیلاتی و سفیدرود با ۶۴ درصد تایید از رودخانه سفیدرود مشتق شده اند هر چند که ناحیه ۴ شیلاتی بعنوان گروه اصلی دیده می شود که تمامی نمونه های از آن جدا شده اند ولی هنوز هم نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۲ شیلاتی بعنوان جمعیت های مستقل از سایر نواحی شیلاتی مورد مطالعه دیده می شوند (تصویر ۹).



تصویر ۹ - رسم درخت فیلوژنی ماکزیمم پارسیمونی ژن D-loop تاسماهی ایرانی با ۱۰۰۰ تکرار

### ۳-۲-۳ - تنوع ژنتیکی و تفاوت جمعیتی

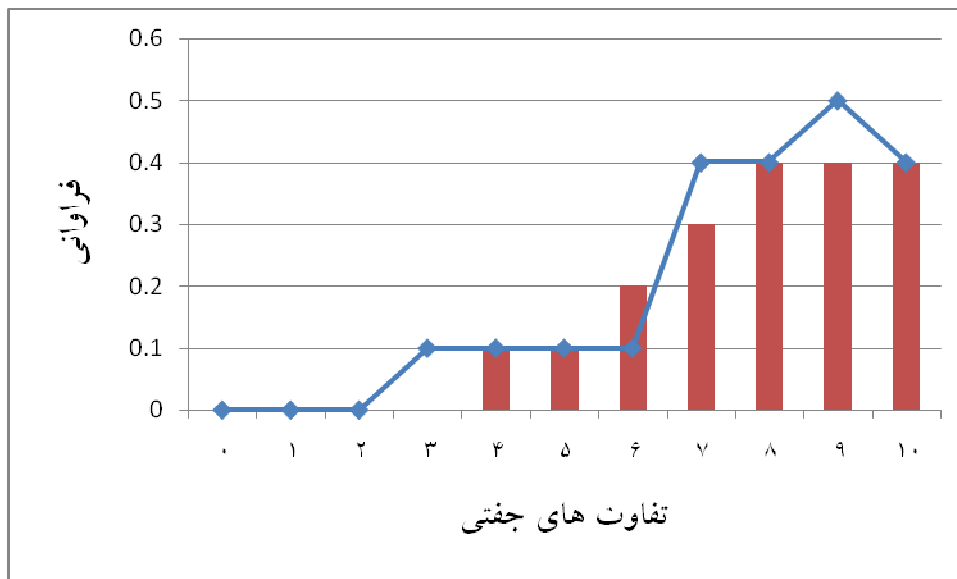
تجزیه و آنالیز نتایج ۳۱۵ توالی از ۱۸ نمونه ژن D-loop تاسماهی ایرانی با استفاده از نرم افزار Dna SP نشان داد که ۲۶۳ جایگاه مونومورف، ۵۲ جایگاه ژنی پلی مورف (Segregating sites)، ۶۹ جایگاه انتقالی (transitions)، ۲۱ جایگاه متقاطع (tranvertions)، عدم مشاهده چند شکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism) ۵۵ موتاسیون وجود دارد. شاخص توزیع شکل گاما بین مکان های مورد بررسی ۰/۱۹ محاسبه شد که نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه می باشد. تنوع هاپلوتایپی یا ژنی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) توسط نرم افزار DnaSP محاسبه شد (جدول ۹). بر اساس نتایج کمترین و بیشترین جایگاه پلی مورف یا چند شکلی در داخل هر منطقه متعلق به رودخانه سفیدرود (۹) و ناحیه ۲ شیلاتی (۳۴) می باشد. از بین ۱۳ هاپلوتایپ بدست آمده تنوع هاپلوتایپی (تنوع ژنی) ۰/۹۶۱ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۸ بدست آمد. همچنین تنوع ژنی بین نواحی مورد مطالعه در دامنه ۰/۱۰۱ ± ۰/۹ ± ۰/۰۷۴ الی ۱ ± ۰/۰۷۴ و تنوع نوکلئوتیدی در دامنه ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۱۹ الی ۰/۰۳۳ ± ۰/۰۵۳ قرار داشته و هر دو بسیار بالا بودند که نشاندهنده وجود تنوع در این گونه باشد.

جدول ۹ - اطلاعات تنوع ژنتیکی ژن D-loop تاسماهی ایرانی

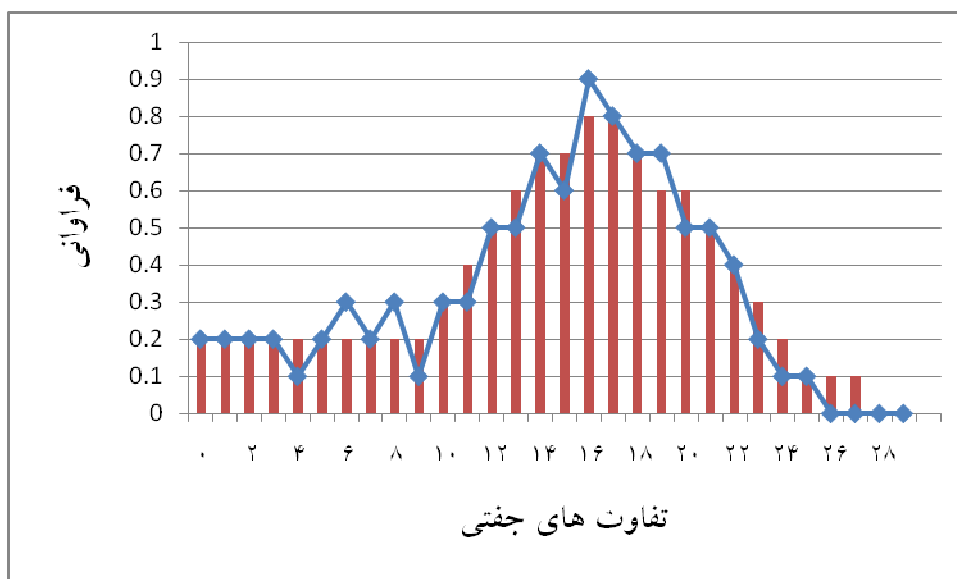
پارامتر	ناحیه	۲	۳	۴	سفیدرود
تعداد نمونه های مورد بررسی		۵	۵	۵	۳
جایگاه های مورد بررسی		۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵
تعداد جایگاه های چند شکلی		۳۴	۲۷	۱۸	۹
چند شکلی اضافه و حذف (InDels)		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتایپ		۵	۴	۵	۳
تنوع نوکلئوتیدی (Pi)		۰/۰۵۳ ± ۰/۰۳۳	۰/۰۴۰ ± ۰/۰۲۵	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۱۸	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۱۵
تنوع هاپلوتایپی (Hd)		۱ ± ۰/۰۳۶	۰/۹ ± ۰/۱۰۱	۱ ± ۰/۰۲۵	۱ ± ۰/۰۷۴
میانگین تفاوت جفتی		۱۶/۸۰۰ ± ۹/۰۴۸	۱۲/۶۰۰ ± ۶/۸۷۰	۸/۸۰۰ ± ۴/۸۹۸	۶/۰۰۰ ± ۳/۹۲۸

تست تاجیما دو پارامتر برآورد گر ( $\theta$ ) را که سبب ایجاد جهش در آنها می شود را مورد مقایسه قرار می دهد: برآوردگر واترسون ( $\theta_s$  Watterson's estimator) و برآوردگر تاجیما ( $\theta_{\Pi}$ ) و حد معنی دار بودن (Significant) می تواند در نتیجه عواملی مانند گستردگی جمعیت ها، تنگناهای ژنتیکی (bottlenecks) و یکسری دستکاری ها باشد. تست  $F_s$  و  $F_u$  تعداد هاپلوتایپ های مشاهده شده را با تعداد هاپلوتایپ های مورد انتظار در یک نمونه تصادفی و فرض بر این که مکان های نامحدود بدون هیچگونه نوترکیبی را مورد مقایسه قرار می دهد.  $F_u$  در نظر می گیرد که نسبت به بسط و گستره جمعیتی حساس بوده و منجر به ایجاد یک عدد منفی بسیار بزرگ در مقدار  $F_s$  می گردد. اعداد  $D$  و  $F_s$  در صورت منفی و معنی دار بودن نشاندهنده بسط و گسترش جمعیت های است (این دو آزمون فرض را بر این می گذارد که جمعیت ها در تعادل می باشند). همچنین گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی توزیع تفاوت جفتی بین توالی ها را (mismatch distribution) بر اساس سه فاکتور مورد بررسی و مقایسه قرار می دهد:  $\theta_1, \theta_0$  ( $\theta$  قبل و بعد از رشد جمعیتی) و  $t$  (زمان واحد نرخ جهش). تطابق نتایج مشاهده شده با توزیع مورد انتظار تحت بسط ناگهانی مدل راجرز و هارپندینگ (Rogers and Harpending, 1992) مورد آزمون قرار گرفت. مقادیر  $t$  بر اساس فرمول  $t=2 \times ut$  و زمان واقعی مشاهدات محاسبه می شود بطوریکه  $u$  نرخ یا میزان موتاسیون برای تمامی توالی ها مورد مطالعه و  $t$  از زمان توسعه و گسترش جمعیت ها می باشد.

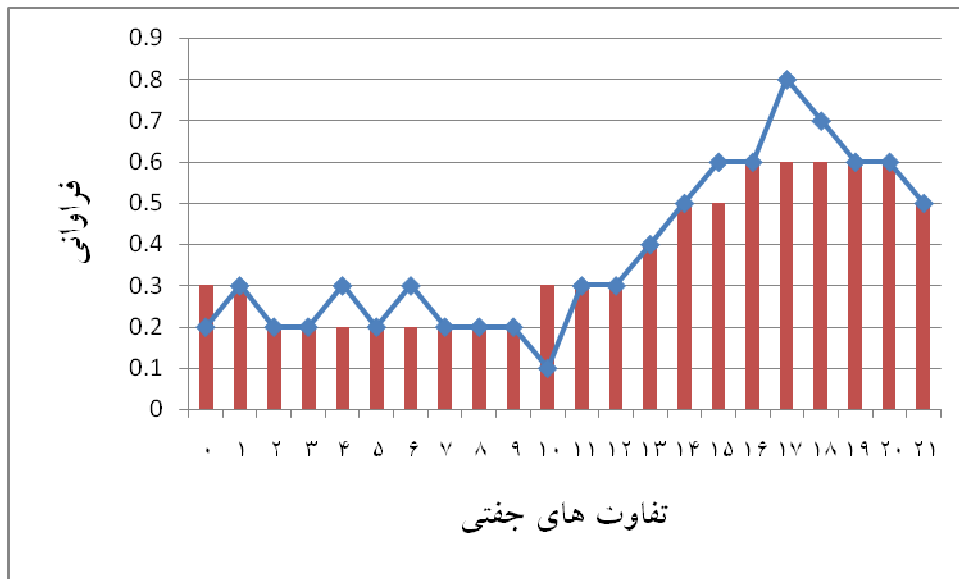
در این بررسی تاریخچه جمعیتی (demographic history) ژن D-loop تاسماهی ایرانی مناطق مورد بررسی با استفاده از آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی (mismatch distribution) که تفاوت ژنتیکی جفتی بین هاپلوتایپ ها می باشند و بر اساس بسط و گسترش ناگهانی (sudden expansion) مورد بررسی قرار گرفت که به نظر می رسد غیر معین (unimodal) بوده و تا حدودی شبیه مدل بسط ناگهانی می باشند (تصاویر ۱۳ - ۱۰).



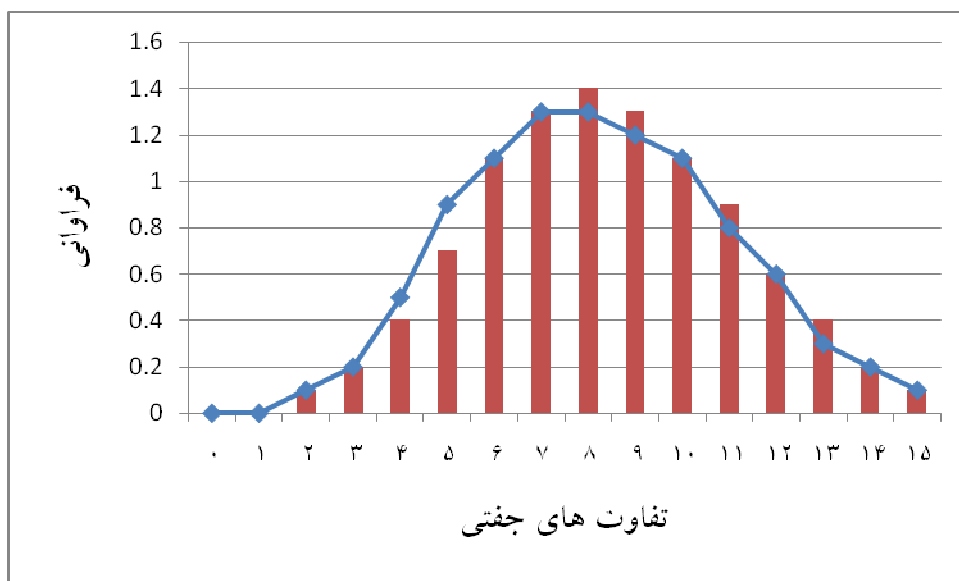
تصویر ۱۰- تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن D-loop تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود



تصویر ۱۱- تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن D-loop تاسماهی ایرانی ناحیه ۲ شیلاتی



تصویر ۱۲- تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن D-loop تاسماهی ایرانی ناحیه ۳ شیلاتی



تصویر ۱۳- تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن D-loop تاسماهی ایرانی ناحیه ۴ شیلاتی

مقدار کم محاسبه شده شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱)، غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را مورد تایید قرار داد (جدول ۱۰).



آزمون های بی طرفی (neutrality tests) تاجیما همانند شاخص  $F_S$  Fu با استفاده از نرم افزار Dna SP برای ۱۸ توالی بین مناطق به ترتیب ۰/۸۴- و ۰/۹۹- محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی دار نبودند ( $p \geq 0.01$ ).

میانگین مقدار زمان بسط و گسترش جمعیتی محاسبه شده توسط نرم افزار Arlequin  $t = 13/65$  بود بنابراین زمان بسط و گسترش جمعیت ها از قبل از زمان حاضر حدود ۱۵۰۱ سال و بر اساس نرخ جهش یا موتاسیون محاسبه شده ژن D-loop این بررسی می باشد.

جدول ۱۰ - تست توزیع و پراکندگی عدم تطابق ژن D-loop تاسماهی ایرانی

Goodness-of-fit tests			Mismatch distribution			Fu's $F_S$		Tajima's $D$		منطقه	
SSD	P	Ragg *	P	$\theta_0$	$\theta_1$	t	$F_S$	P	D		P
۰/۲۱۵	۰/۱۸	۰/۴۴۴	۰/۸۷	۰/۰۰۲	۱۷۵/۳۱	۹/۶۱	۰/۵۸۷	۰/۴۲	۰/۰۰۰	۰/۷۳۰	سفیدرود
۰/۰۶۰	۰/۸۱	۰/۱۶۰	۰/۶۲	۰/۰۰۰	۵۳/۳۰	۱۷/۳۰	۰/۳۱۴	۰/۳۵	۰/۲۲۰	۰/۶۰۳	ناحیه ۲
۰/۱۱۰	۰/۱۷	۰/۲۳۰	۰/۵۲	۰/۰۰۳	۳۷/۳۵	۱۹/۱۶	۱/۹۸۵	۰/۷۴	-۰/۲۰۷	۰/۴۹۴	ناحیه ۳
۰/۰۵۹	۰/۵۶	۰/۱۴۰	۰/۵۶	۰/۰۰۰	/۰ ۹۹۹۹۹	۸/۵۱	-۰/۵۱۰	۰/۲۲	۰/۱۳۶	۰/۵۶۱	ناحیه ۴
۰/۱۱۱	۰/۴۳	۰/۰۶۱	۰/۸۰	۰/۰۰۱	/۲ ۲۵۰۶۶	۱۳/۶۵	۰/۵۹۴	۰/۴۲	۰/۰۳۷	۰/۵۹۷	بین مناطق

\* شاخص راجرز هارپندینگ، مجموع مربع انحرافات SSD=

امروزه استفاده از مارکرهای مولکولی جهت دستیابی به ساختار ژنتیکی جمعیت ها و شناسایی آنها متداول شده است و یکی از این شاخص ها فاکتور  $F_{st}$  می باشد. در این بررسی میزان  $F_{st}$  بصورت جفتی بین مناطق توسط نرم افزار Arlequin ورژن ۳/۱ (Excoffier et al., 2005) در سطح احتمال ۰/۰۵ محاسبه شد (جدوال ۱۲ - ۱۱) که کمترین فاصله جمعیتی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۴ شیلاتی (۰/۰۰۲-) و بیشترین فاصله جمعیتی بین ناحیه ۲ و ناحیه ۴ شیلاتی دیده شد (۰/۱۲۶). بر این اساس هرچند که میزان  $F_{st}$  بسیار اندک محاسبه گردید ولی در سطح احتمال ۰/۰۵ پس از ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلو تایپی فقط نمونه های سفیدرود با سایر نواحی شیلاتی اختلاف معنی دار داشت ( $p \leq 0.05$ ) و سایر نواحی بصورت مقایسه جفتی اختلاف معنی دار نبود و این

می تواند بدلیل جریان ژنی ماهیان بین این مناطق و یا احتمال تبادل مولدین در فصول تکثیر یا بچه ماهیان تاسماهی ایرانی بمنظور رهاسازی بین کارگاههای بازسازی ذخایر تاسماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر باشد.

جدول ۱۱ - میزان  $F_{st}$  بر اساس فراوانی هاپلوتایپی (مثلث پایین) و میزان  $p$ -value (مثلث بالا) ژن D-loop تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	*	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۳
۲	۰/۰۱۲	*	۰/۲۵۳	۰/۱۲۳
۳	-۰/۱۶۶	۰/۰۷۰	*	۰/۶۹۲
۴	-۰/۰۰۲	۰/۱۲۶	-۰/۰۴۹	*

جدول ۱۲ - ماتریکس معنی دار بودن میزان  $F_{st}$  و میزان  $p$ -value ژن D-loop تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود		+	+	+
۲	+		-	-
۳	+	-		-
۴	+	-	-	

آزمون تفاوت جمعیت ها (non-differentiation exact  $p$  values) بین مناطق نمونه برداری در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد محاسبه شد که این مقدار بین رودخانه سفیدرود و سایر نواحی شیلاتی معنی دار بود ( $p \leq ۰/۰۵$ ) و در بین سایر نواحی شیلاتی معنی دار نبود ( $p \geq ۰/۰۵$ ) (جداول ۱۳ و ۱۴). همچنین این آزمون برای تمامی نمونه ها  $p = ۰/۷۷۰$  محاسبه شد که معنی دار نبود. بر اساس فاکتور  $F_{st}$  و آزمون تفاوت محاسبه شده ژن D-loop بین جمعیت های تاسماهی ایرانی مناطق مورد مطالعه می توان بیان نمود که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود هنوز بعنوان یک جمعیت مستقل مطرح بوده که بایستی مدیریت شیلاتی مبنی بر بازسازی ذخایر آن بطور جدی اعمال گردد.

جدول ۱۳ - میزان  $p$ -value آزمون تفاوت ژن D-loop جمعیت های تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

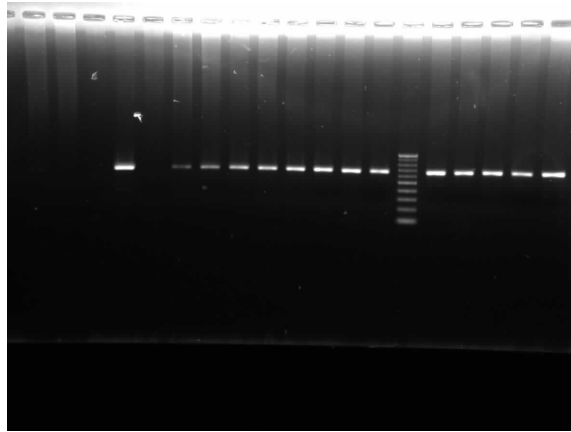
نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	*			
۲	۰/۰۱۴	*		
۳	۰/۰۲۰	۰/۴۴۱	*	
۴	۰/۰۳۳	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	*

جدول ۱۴ - ماتریکس معنی دار بودن میزان  $p$ -value آزمون تفاوت ژن D-loop جمعیت های تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی (سطح احتمال ۰/۰۵ درصد)

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود		+	+	+
۲	+		-	-
۳	+	-		-
۴	+	-	-	

### ۳-۳ - نتیجه حاصل از PCR ژن Cytochrom *b* تاسماهی ایرانی

نمونه های DNA ناحیه ۲ شیلاتی (۵ نمونه)، ناحیه ۳ شیلاتی (۵ نمونه)، ناحیه ۴ شیلاتی (۵ نمونه) و رودخانه سفیدرود (۵ نمونه) با آغازگر ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی PCR شد. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد به همراه مارکر ۱۰۰ bp در زیر اشعه UV، تولید باندهایی در محدوده ۷۰۰ جفت باز نمودند (تصویر ۱۴). مقدار ۴۵ ماکرولیتر از محصول PCR هر یک از نمونه ها با آغازگر Forward ژن مورد استفاده جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید که پس از دریافت جواب بصورت فایل کروماتس تعداد ۱۷ نمونه برای تجزیه و تحلیل با نرم افزارهای فوق مناسب و با استفاده از نرم افزار Clustal W ردیف (Align) شد.



تصویر ۱۴ - الکتروفور محصول PCR ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی

### ۱ - ۳ - ۳ - هاپلوتایپ و ترسیم درخت هاپلوتایپی

تعداد ۴ هاپلوتایپ پس از آنالیز توالی های بدست آمده در نرم افزار Dna SP بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده هاپلوتایپ ۱ بین تمامی نواحی شیلاتی و سفیدرود مشترک (جدول ۱۵).

جدول ۱۵ - پراکنش هاپلوتایپی ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی

جمع	۴	۳	۲	۱	هاپلوتایپ ناحیه
۵				۵	۲
۵		۱	۱	۳	۳
۴	۱	۱		۲	۴
۳				۳	سفیدرود
۱۷	۱	۲	۱	۱۳	جمع

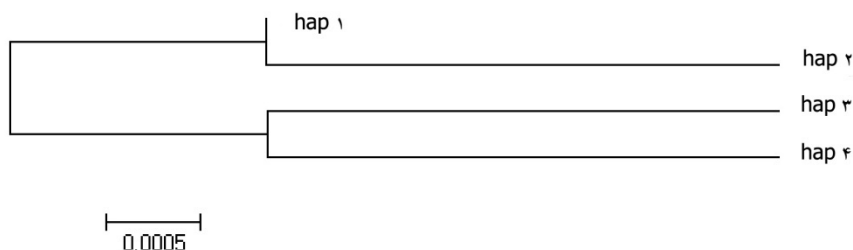
فاصله ژنتیکی بین هاپلوتایپ ها بین ۰/۰۰۰ الی ۰/۰۰۸ توسط نرم افزار Mega4 محاسبه گردید (جدول ۱۶). کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۰۰) بین هاپلوتایپ های ۱ (ناحیه ۲) و ۴ (ناحیه ۴) و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۰۸) بین هاپلوتایپ های ۲ (ناحیه ۳) و ۳ (نواحی ۳ و ۴) بدست آمد.

جدول ۱۶ - فاصله ژنتیکی بین هاپلوتایپ های ژن سیتوکروم *b*

تاسماهی ایرانی

هاپلوتایپ	۱	۲	۳	۴
۱	*			
۲	۰/۰۰۳	*		
۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۸	*	
۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	*

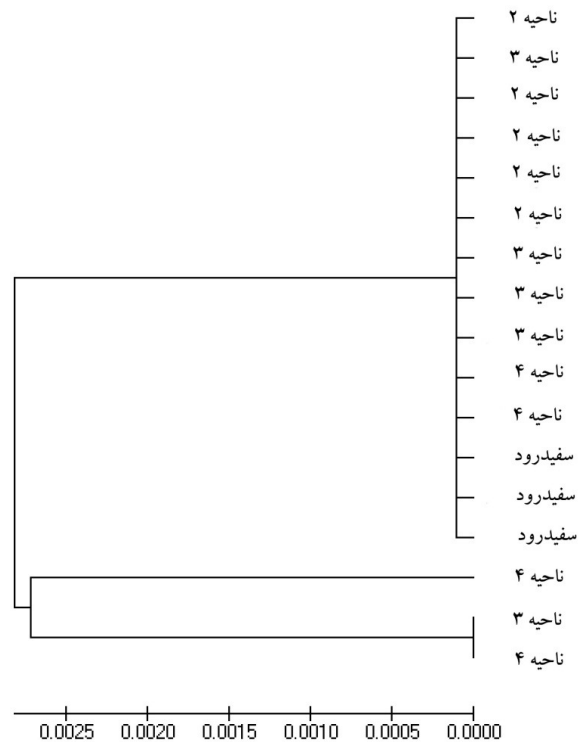
ترسیم درخت هاپلوتایپی به روش Neighbor-Joining به روش فاصله Kimura 2-parameter وجود دو کلاستر را نشان داد که کلاستر اولی دارای بیشترین تنوع هاپلوتایپی بوده شامل نواحی شیلاتی و نمونه های رودخانه سفیدرود بود و کلاستر دومی (hap ۳ و hap ۴) شامل هاپلوتایپ نمونه های ناحیه ۳ و ۴ شیلاتی بود (تصویر ۱۵).



تصویر ۱۵ - درخت فایلوژنی ۴ هاپلوتایپ ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی به روش Neighbor-Joining

### ۲-۳-۳- ترسیم درخت تکاملی

درخت تکاملی توالی های بدست آمده به روش های Neighbor-joining رسم گردید که دو کلاستر اصلی مشاهده شد بطوریکه کلاستر اول دارای بیشترین نمونه از نواحی شیلاتی بخصوص تمامی نمونه های ناحیه ۲ شیلاتی و نمونه های رودخانه سفیدرود و تعدادی از نمونه های ناحیه ۳ و ۴ شیلاتی قرار داشته و در کلاستر دوم تنها نمونه های نواحی ۳، ۴ قرار دارند. همانگونه که در ترسیم درخت تکاملی دیده می شود نمونه های ناحیه ۲ و رودخانه سفیدرود در یک کلاستر مجزا قرار داشته که تا حدودی بیانگر جدا بودن هر منطقه می تواند باشد (تصویر ۱۶).



تصویر ۱۶ - رسم درخت فیلوژنی Neighbor-joining ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی

### ۳-۳-۳ - تنوع ژنتیکی و تفاوت جمعیتی

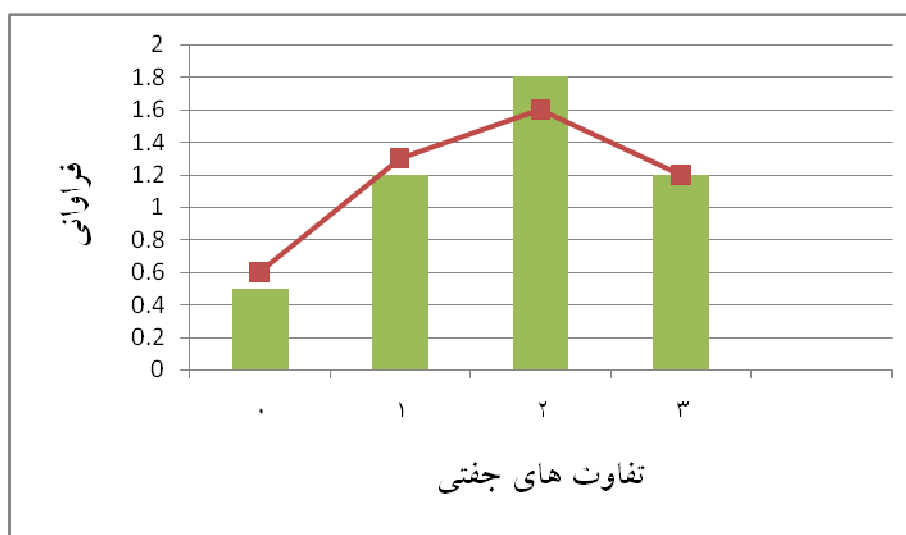
تجزیه و آنالیز نتایج ۳۷۰ توالی از ۱۷ نمونه ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی با استفاده از نرم افزار Dna SP نشان داد که ۴ جایگاه ژنی پلی مورف (Segregating sites)، ۶ جایگاه انتقالی (transitions)، بدون جایگاه متقاطع (tranvertions)، عدم مشاهده چند شکلی اضافه و حذف (Insertion-Deletion polymorphism) ۴ موتاسیون وجود دارد. شاخص توزیع شکل گاما بین مکان های مورد بررسی ۰/۲۰ محاسبه شد که همانند ژن D-loop نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون در این گونه می باشد.

تنوع هاپلوتایپی یا ژنی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی (Pi) توسط نرم افزار DnaSP محاسبه شد (جدول ۱۷). بر اساس نتایج کمترین و بیشترین جایگاه پلی مورف یا چند شکلی در داخل هر منطقه متعلق به رودخانه سفیدرود (۹) و ناحیه ۲ شیلاتی (۳۴) می باشد. تنوع ژنی بین نواحی مورد مطالعه در دامنه ۰/۱۰۱ ± ۰/۹ الی ۰/۰۷۴ ± ۱ و تنوع نوکلئوتیدی در دامنه ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۱۹ الی ۰/۰۳۳ ± ۰/۰۵۳ قرار داشته و هر دو بسیار بالا بودند که نشاندهنده وجود تنوع در این گونه باشد.

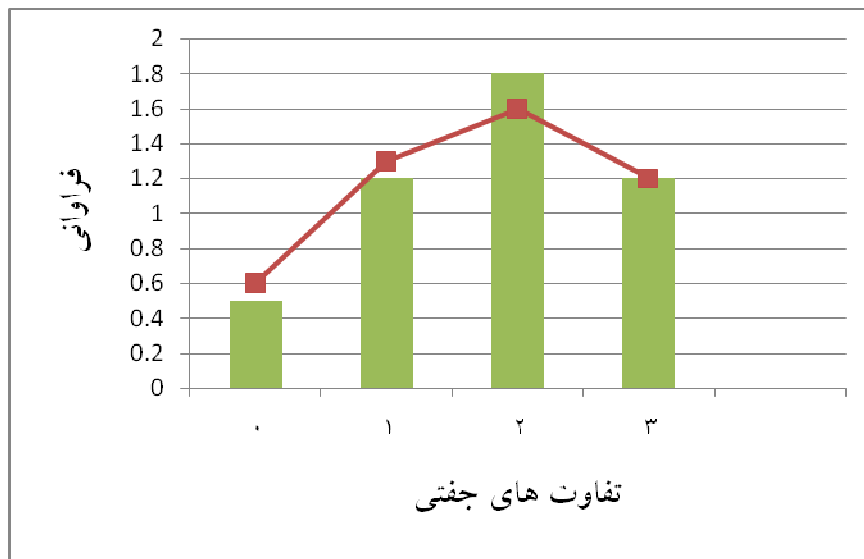
جدول ۱۷ - اطلاعات تنوع ژنتیکی ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی

پارامتر	ناحیه	۲	۳	۴	سفیدرود
تعداد نمونه های مورد بررسی		۵	۵	۵	۳
جایگاه های مورد بررسی		۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵	۳۱۵
تعداد جایگاه های چند شکلی		۳۴	۲۷	۱۸	۹
چند شکلی اضافه و حذف (InDels)		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
تعداد هاپلوتاایپ		۵	۴	۵	۳
تنوع نوکلئوتیدی (Pi)		۰/۰۵۳ ± ۰/۰۳۳	۰/۰۴۰ ± ۰/۰۲۵	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۱۸	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۱۵
تنوع هاپلوتاایپی (Hd)		۱ ± ۰/۰۳۶	۰/۹ ± ۰/۱۰۱	۱ ± ۰/۰۲۵	۱ ± ۰/۰۷۴
میانگین تفاوت جفتی		۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰	۱/۲۰۰ ± ۰/۹۰۸	۱/۶۶۶ ± ۱/۲۱۶	۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰

در این بررسی تاریخچه جمعیتی (demographic history) ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی مناطق مورد بررسی با استفاده از آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی (mismatch distribution) که تفاوت ژنتیکی جفتی بین هاپلوتاایپ ها می باشند و بر اساس بسط و گسترش ناگهانی (sudden expansion) مورد بررسی قرار گرفت که هیستوگرام نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۲ شیلاتی بدلیل کوچک بودن اندازه آنها رسم نشد ولی برای نمونه های نواحی ۳ و ۴ شیلاتی همانند ژن D-loop بنظر می رسد که غیر معین (unimodal) بوده و شبیه مدل بسط ناگهانی می باشند (تصاویر ۱۸ - ۱۷).



تصویر ۱۷ - تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی ناحیه ۳ شیلاتی



تصویر ۱۸- تفاوت های جفتی مشاهده شده (ستون) و توزیع عدم تطابق (خطی) بر اساس مدل بسط ناگهانی ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی ناحیه ۴ شیلاتی

مقدار متوسط شاخص محاسبه شده راجرز و هارپندینگ (۰/۳۶۶) و عدم ترسیم هیستوگرام غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را نتوانست مورد تایید قرار دهد (جدول ۱۸).  
 آزمون های بی طرفی (neutrality tests) تاجیما همانند شاخص  $F_s$  با استفاده از نرم افزار Dna SP برای ۱۷ توالی بین مناطق به ترتیب  $-۰/۲۲۰$  و  $-۰/۰۷۹$  محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی دار نبودند ( $p \geq ۰/۰۱$ ).

میانگین مقدار زمان بسط و گسترش جمعیتی محاسبه شده بین مناطق توسط نرم افزار Arlequin  $t = ۰/۹۸$  بود بنابراین زمان بسط و گسترش جمعیت ها از قبل از زمان حاضر حدود ۷/۸۴ سال و بر اساس نرخ جهش یا موتاسیون محاسبه شده ژن سیتوکروم *b* این بررسی می باشد.



جدول ۱۸ - تست توزیع و پراکندگی عدم تطابق ژن سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی

Goodness-of-fit tests			Mismatch distribution				Fu's $F_S$		Tajima's $D$		منطقه
SSD	$P$	Ragg *	$P$	$\theta_0$	$\theta_1$	$t$	$F_S$	$P$	$D$	$P$	
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	N.A.	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	سفیدرود
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	N.A.	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	ناحیه ۲
۰/۰۰۶	۰/۹۰	۰/۰۵۰	۱/۰۰	۰/۰۱۷	۵/۹۶	۱/۵۸	-۰/۱۸۵	۰/۲۸	-۱/۰۴۸	۰/۱۵۲	ناحیه ۳
۰/۳۸۰	۰/۰۳	۱/۴۲۰	۰/۱۴	۰/۰۰۰	۹۹۹۹۹/۰	۲/۳۴	-۰/۱۳۳	۰/۲۹	۰/۱۶۷	۰/۷۵۱	ناحیه ۴
۰/۰۹۶	۰/۲۳	۰/۳۶۶	۰/۲۸	۰/۰۰۴	۲۵۰۰۱/۲	۰/۹۸	-۰/۰۷۹	N.A.	-۰/۲۲۰	۰/۷۲۶	بین مناطق

\* شاخص راجرز هارپندینگ، مجموع مربع انحرافات = SSD

میزان  $F_{st}$  بصورت جفتی بین مناطق که نشانه تمایز و جدایی جمعیت ها می باشد توسط نرم افزار Arlequin ورژن ۳/۱ (Excoffier et al., 2005) در سطح احتمال ۰/۰۵ محاسبه شد (جدوال ۲۰ - ۱۹) که کمترین فاصله جمعیتی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۳ شیلاتی (۰/۱۳۲-) و بیشترین فاصله جمعیتی بین ناحیه ۲ و ناحیه ۴ شیلاتی دیده شد (۰/۲۳۱). بر این اساس میزان  $F_{st}$  برای تمامی مناطق اندک محاسبه گردید و در سطح احتمال ۰/۰۵ پس از ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی تمامی مناطق با یکدیگر دارای اختلاف معنی دار نبودند (۰/۰۵). ( $p \geq$ )

جدول ۱۹ - میزان  $F_{st}$  بر اساس فراوانی هاپلوتایپی (مثلث پایین) و میزان  $p$ -value (مثلث بالا) ژن

سیتوکروم *b* تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	*	۰/۹۹۱	۰/۹۹۱	۰/۴۵۰
۲	۰/۰۰۰	*	۰/۹۹۱	۰/۱۸۰
۳	-۰/۱۳۲	۰/۰۰۰	*	۰/۷۹۳
۴	۰/۰۷۶	۰/۲۳۱	-۰/۰۹۴	*

جدول ۲۰ - ماتریکس معنی دار بودن میزان  $F_{st}$  و میزان  $p$ -value ژن سیتوکروم  $b$  تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود		-	-	-
۲	-		-	-
۳	-	-		-
۴	-	-	-	

همچنین آزمون تفاوت جمعیت ها (non-differentiation exact  $p$  values) بین مناطق نمونه برداری در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای ژن سیتوکروم  $b$  محاسبه شد که این مقدار بین تمامی مناطق معنی دار نبود ( $p \geq 0.05$ ) (جداول ۲۱ و ۲۲). بر اساس فاکتور  $F_{st}$  و آزمون تفاوت محاسبه شده ژن سیتوکروم  $b$  بین جمعیت های تاسماهی ایرانی مناطق مورد مطالعه هیچگونه اختلاف جمعیتی مشاهده نشد که می تواند بدلیل نامناسب بودن و عدم دقیق بودن ناحیه مورد بررسی این ژن بوده باشد.

جدول ۲۱ - میزان  $p$ -value آزمون تفاوت ژن سیتوکروم  $b$  جمعیت های تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود	*			
۲	-۱/۰۰۰	*		
۳	۱/۰۰۰	۰/۴۴۳	*	
۴	۱/۰۰۰	۰/۱۶۴	۱/۰۰۰	*

جدول ۲۲ - ماتریکس معنی دار بودن میزان  $p$ -value آزمون تفاوت ژن سیتوکروم  $b$  جمعیت های تاسماهی ایرانی بین مناطق مورد بررسی (سطح احتمال ۰/۰۵ درصد)

نواحی نمونه برداری	سفیدرود	۲	۳	۴
سفیدرود		-	-	-
۲	-		-	-
۳	-	-		-
۴	-	-	-	

### ۴ - ۳ - نتیجه گیری نهایی

ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود در گشت ارزیابی ذخایر سال های ۱۳۹۱ - ۱۳۸۸ با دو ژن D-loop و سیتوکروم *b* میتوکندریایی مطالعه و نتایج زیر بدست آمد:

برای ژن های D-loop و سیتوکروم *b* بین مناطق مورد مطالعه به ترتیب ۱۳ و ۴ هاپلو تایپ، میانگین تنوع هاپلو تایپی ۰/۹۶۱ و ۰/۴۱۹، تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۸ و ۰/۰۰۲، شاخص توزیع شکل گاما بین مکانهای مورد بررسی ۰/۱۹ و ۰/۲۰ و میزان موتاسیون برای هر دو ژن در اینگونه در اندازه متوسط بود. کمترین مقدار  $F_{st}$  محاسبه شده برای ژن D-loop بین جمعیت های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۴ شیلاتی (۰/۰۰۲-) و برای ژن سیتوکروم *b* بین تمامی جمعیت ها ۰/۰۴ با جریان ژنی ۵/۳۷ محاسبه شد. آزمون تفاوت جمعیت ها (non-differentiation exact *p* values) در داخل جمعیت ها در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای ژن D-loop بین رودخانه سفیدرود و سایر مناطق معنی دار و برای ژن سیتوکروم *b* اختلاف معنی داری بین مناطق مورد بررسی بدست نیامد. تاریخچه جمعیتی (demographic history) تاسماهی ایرانی برای هر دو ژن مورد از نوع غیر معین (unimodal) بوده و شبیه مدل بسط ناگهانی بود و مقدار کم محاسبه شده شاخص راجرز و هارپندینگ (۰/۰۶۱) برای ژن D-loop غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را مورد تأیید قرار داد ولی مقدار متوسط این شاخص برای ژن سیتوکروم *b* (۰/۳۶۶) نتوانست غیر معین بودن تاریخچه جمعیتی و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی را مورد تأیید قرار دهد. آزمون های بی طرفی (neutrality tests) تاجیما و شاخص  $F_u F_s$  بین مناطق و برای هر دو ژن به ترتیب ۰/۸۴- و ۰/۹۹- و ۰/۲۲۰- و ۰/۰۷۹- محاسبه شد که هر دو شاخص منفی و از لحاظ آماری معنی دار نبودند ( $p \geq 0.01$ ). نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد هنوز تاسماهی ایرانی در مناطق مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی هر چند کم برخوردار می باشد و ژن D-loop در مقایسه با ژن سیتوکروم *b* برای شناسایی و تفکیک جمعیتی و ساختار ژنتیکی این گونه با استفاده از روش توالی یابی DNA مناسب تر است همچنین جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود یک خزانه ژنی مستقل و جداگانه از سایر مناطق دیگر می باشد.

#### ۴ - بحث و نتیجه گیری

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط جهان باعث شده تا محققین علوم شیلاتی جهت مدیریت ذخایر آبزیان قبل از هر اقدام عملی به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه های با ارزش آن منطقه از طریق روشهای مولکولی روی آورند که در برنامه های بهره برداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبی پروری و برنامه های اصلاح نژادی دارای اهمیت زیادی می باشد (Lin et al, 2002). در اکثر موجودات برای تعیین روابط تکاملی از داده های مربوط به توالی DNA استفاده می شود و از آنجاییکه چنین داده هایی کمتر تحت تاثیر شاخص انتخاب (Selection) قرار می گیرند، بهتر می توانند روابط فیلوژنی و ساختار ژنتیکی واقعی را نمایان سازند.

در گونه های جانوری برای دستیابی به نشانگرهای ژنتیکی از ژنوم میتوکندریایی استفاده می گردد (Ovenden & Wite, 1990) که از ویژگیهای آن می توان به کوچک بودن آن ( $16500 \pm 500$  جفت باز)، توارث از طریق مادری، سرعت موتاسیون که پنج الی ده برابر ژنوم هسته ای است بطوریکه که در هر میلیون سال ۲٪ تغییرات را متحمل می شود اشاره نمود (Berrebi, 1996). همچنین برخی از سایر ژن های موجود در مولکول میتوکندری نظیر سیتوکروم *b* و *c*، سیتوکروم اکسیداز، نواحی ND5/6، D-loop و ... به منظور بررسیهای درون گونه ای و ساختار جمعیتی آبزیان مورد استفاده قرار می گیرند (Beckenbach, 1991). بیشترین پراکنش تاسماهی ایرانی در قسمت خزر جنوبی است بطوریکه گونه غالب را در بین سایر تاسماهیان در این نواحی دارا بوده و در سال های اخیر بیشترین میزان صید و استحصال خاویار از دریا و نیز مدیریت شیلاتی مراکز بازسازی ذخایر مبنی بر تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان خاویاری مختص تاسماهی ایرانی بوده است (Pourkazemi, 2006). با توجه به تخریب رودخانه های محل مهاجرت و تخمیزی، عدم تکثیر طبیعی در رودخانه ها، آلودگی های نفتی، روند افزایشی صید بی رویه و قاچاق در سواحل جنوبی دریای خزر احتمال تکثیر مولدین بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی و جمعیتی آنها وجود همواره وجود دارد که می تواند سبب افزایش ضریب همخونی در جمعیت های آن گردد. این روند در دراز مدت تأثیرات سوئی به دنبال داشته و به صورت تدریجی می تواند سبب تخریب ذخایر ژنتیکی و نابودی تدریجی خزانه ژنی گونه ها و جمعیت ها گردد که در نتیجه این عمل در دراز مدت احتمال کاهش سرعت رشد، کاهش میانگین طول، کاهش درصد هم آوری و افزایش لاروهای ناقص الخلقه در یک دوره ۲۵ الی ۴۰ ساله وجود دارد (پورکاظمی، ۱۳۷۹). زمانیکه یک گونه خاص از ماهیان قرار است به عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود توانایی ارزیابی ژنتیکی و دسترسی به ساختار ژنتیکی جمعیت آنها می تواند بعنوان یک ابزار قدرتمند در حفظ تولیدات شیلاتی آنها بکار گرفته شود (Seeb et al., 1990). بنابراین اطلاع و آگاهی از ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی در سواحل جنوبی دریای خزر قبل از هر گونه اقدام عملی در راستای ازدیاد ذخایر آن ضروری به نظر می رسد. بر اساس مصوبات کمیسیون منابع زنده دریای خزر مقرر گردید تا تمامی کشورهای حاشیه دریای خزر بمنظور ارزیابی و برآورد فراوانی و وزن توده زنده ماهیان خاویاری، گشت های ارزیابی ذخایر را در سواحل خود انجام دهند و همراه آن نیز تعیین ساختار ژنتیکی و

جمعیتی تاسماهیان صید شده و مقایسه آنها با ماهیان مهاجر به رودخانه نیز انجام گیرد که در پروژه بررسی ارزیابی ذخایر سالهای ۸۳ الی ۸۵ که توسط توکلی و همکاران انجام شد، ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی با استفاده از روش مایکروستلایت بررسی و گزارش آن ارائه شد و هدف از مطالعه حاضر بررسی های بیشتر، جامع تر و تکمیل کننده تر ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی طی گشت های ارزیابی ذخایر سال های ۱۳۹۱ - ۱۳۸۸ با استفاده از روش توالی یابی DNA و دو ژن D-loop که دارای بیشترین منطقه متغیر در ژنوم میتوکندری ماهیان است (Meyer, 1993) و سیتوکروم *b* میتوکندریایی بود.

در بررسی و مطالعات ژنتیکی نیاز به یک منبع اولیه از DNA می باشد. جهت استخراج DNA از بافت های ماهیان روشهای مختلفی وجود دارد مثل روش فنل کلروفرم (Hillis & Moritz, 1990)، روش اتانول (Shaw et al., 1999)، کیت (McQuown et al., 2000)، CTAB (May et al., 1997) و سایر روشهای دیگر. هر یک از روشهای عنوان شده مزایا و معایب مخصوص بخود را دارند (چکمه دوز، ۱۳۸۴). Shaw و همکاران در سال ۱۹۹۹ جهت استخراج DNA از روش اتانول و بافت ماهیچه برای بررسی جمعیت های گونه *Clupea harengus*، McQuown و همکاران در سال ۲۰۰۰ جهت بررسی ساختار ژنتیکی *Acipenser scaphirhynchus* از کیت و بافت آبشش، Ludwig و همکاران در سال ۲۰۰۰ به منظور بررسی هتروپلاسمی در نواحی کنترل mtDNA تاسماهیان و همچنین در سال ۲۰۰۱ جهت بررسی مضاعف شدن ژنوم و کاهش عملکرد سطوح پلوئیدی در تاسماهیان از کیت شرکت QIAGEN، Kotlik و همکاران در سال ۲۰۰۸ به منظور بررسی ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی سفید در مناطق مختلف دریای سیاه و دریای خزر از کیت QIAGEN، Salgueiro و همکاران در سال ۲۰۰۲ جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گونه *Anaocypris hispanica* و روش مایکروستلایت از روش فنل کلروفرم، Alam و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای بررسی جمعیت های مختلف گونه *Catla catla* از روش فنل کلروفرم، چکمه دوز در سال ۱۳۸۷ به منظور بررسی های جمعیتی و ساختار ژنتیکی ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه در سواحل جنوبی دریای خزر از روش استات آمونیوم استفاده نمود. در بررسی حاضر نیز از روش استات آمونیوم (چکمه دوز، ۱۳۸۴) استفاده گردید و نتایج DNA های استخراج شده از کمیت و کیفیت قابل قبولی جهت PCR برخوردار بودند.

در دهه های اخیر روش های مولکولی متنوعی جهت شناسایی گونه ها و جمعیت هایی از ماهیان که دارای ارزش اقتصادی فراوانی می باشند مثل تاسماهیان از سوی محققین علوم شیلاتی بکار گرفته شده است. در حال حاضر شناسایی جمعیت های تاسماهیان و محصول تولیدی آنها نظیر خاویار بمنظور واردات و صادرات و ارائه مدارک قابل قبول از طریق اعمال روشهای ژنتیک مولکولی از اهداف مهم CITESS می باشد (Bartlett et al., 1992). شناسایی مولکولی در سطح DNA بطور معمول به دو بخش هسته ای و میتوکندریایی تقسیم می شود. هر یک از این دو روش دارای کمی و کاستی هایی می باشند بطور مثال در روش مولکولی DNA هسته ای شناسایی گونه های خالص و هیبریدهای آنها براحتی صورت می گیرد ولی برای شناسایی و

تفکیک خاویار گونه های مختلف تاسماهیان مناسب نمی باشد ولی DNA میتوکندریایی به دلیل داشتن تعداد کپی های بزرگتر و بیشتر مخصوصا در تخمک ها، ساختار گرد، مقاومت نسبت به تخریب و حفاظت شدگی بهتر دارای مزایای بهتری در مقایسه با DNA هسته ای در شناسایی گونه ها و ساختار ژنتیکی جمعیت ها دارد (Mugue *et al.*, 2008; Brown, 2008). ناحیه کنترلی D-loop با بیشترین منطقه متغیر در ژنوم میتوکندری ماهیان که اکثر محققین جهت بررسی روند تکاملی و ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهیان استفاده از آنها را پیشنهاد کرده اند (Onge *et al.*, 1996; Wirgin *et al.*, 2000) و توسط بسیاری از محققین بکار گرفته شده است (Pourkazemi *et al.*, 1999; Pourkazemi *et al.*, 2000; Waldman *et al.*, 2002). همچنین از توالی ژن سیتوکروم *b* در شناسایی گونه های نزدیک به یکدیگر تاسماهیان و نیز خاویار آنها با استفاده از روش PCR استفاده شده است (DeSalle and Birstein., 1996; Birstein *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2002a) میتوکندریایی D-loop و سیتوکروم *b* استفاده و ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاسماهی ایرانی نواحی مختلف شیلاتی صید شده در گشت های ارزیابی ذخایر و مقایسه آنها با رودخانه سفیدرود مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

زمانیکه از دو نمونه توالی نوکلئوتیدی مشابه (homologouse) جهت مقایسه (aligne) با یکدیگر استفاده می شود، اگر حذف شدن (Deletion) یا اضافه شدن (Insertion) در توالی ها دیده نشود بدین معنی است که مقایسه دو توالی نوکلئوتیدی به درستی انجام شده است ولی در واقع دو توالی مشابه که با یکدیگر مقایسه یا ردیف می شوند در تعداد نوکلئوتیدها با یکدیگر اختلاف دارند و بایستی به مکانهایی از توالی ها که حذف شدگی یا اضافه شدن (gaps) در آن ناحیه اتفاق می افتد اشاره نمود و سپس دو توالی نوکلئوتیدی با یکدیگر ردیف (Aligne) گردد. روشهای متفاوتی جهت ردیف کردن توالی ها (Aligne) وجود دارد که بسیاری از آنها بر مبنای ردیف کردن توالی های نوکلئوتیدی یا اسیدهای آمینه می باشد ولی یکی از مرسوم ترین روشهای ردیف کردن توالی ها، اندازه گیری شباهت بین دو توالی نوکلئوتیدی (Needleman & Wunsch, 1970) و نشانه گذاری آنها می باشد. راه دیگر ردیف کردن دو توالی نوکلئوتیدی، اندازه گیری فاصله نوکلئوتیدی بین دو توالی ها و نشانه گذاری آنها است. Thai و همکاران در سال ۲۰۰۶ جهت مقایسه و بررسی روابط تکاملی کپور معمولی در ناحیه کنترلی میتوکندریایی و ژن ATPase6/8 به ترتیب ۷۴۵ جفت باز و ۸۲۰ جفت باز را توسط برنامه نرم افزاری Clustal X ردیف نمودند. Durand و همکاران در سال ۲۰۰۲ به منظور بررسی روابط تکاملی کپورماهیان آسیای شرقی با استفاده از ژن سیتوکروم *b* توالی های بدست آمده از ۳۹ نمونه را به اندازه ۱۱۴۰ جفت باز با استفاده از برنامه SEAVIEW ردیف نمودند و عنوان نمودند که نتایج بدست آمده با نتایج (Johns & Avise, 1998) مطابقت دارد. Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۱ جهت بررسی ساختار جمعیتی و ژنتیکی تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود و سواحل جنوبی دریای خزر، توالی های ۴۶ نمونه از ماهیان فوق را با برنامه Clustal X و به اندازه ۳۹۰

باز ردیف کردند و پس از تجزیه و تحلیل توالی های فوق با بسته های نرم افزاری آماری عنوان نمودند که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود جمعیت مستقلی می باشد. در این بررسی نیز همانند مطالعات سایر محققین جهت ردیف کردن توالی ها از منوی Clastal W موجود در برنامه Mega4 و تحت شبکه بانک ژن NCBI استفاده شد که نمونه های فوق فاقد هیچگونه موارد حذف یا اضافه (InDels) بوده و پس از ردیف شدن ۳۱۵ باز برای ژن D-loop و ۳۷۰ باز برای ژن سیتوکروم *b* ردیف شدند.

در بررسی های تکاملی با استفاده از روش های نوین مولکولی، شناسایی میزان جابجایی و جانشینی توالی های نوکلئوتیدی حائز اهمیت می باشد. در مطالعات مربوط به تنوع، روابط فیلوژنی و اختلافات مولکولی پرسش های مربوط به روابط خویشاوندی در گونه های مختلف و تغییرات ناشی از عوامل طبیعی را پاسخ می دهد بطوریکه با افزایش شباهت بین توالی های DNA موجودات، رابطه خویشاوندی بین آنها افزایش یافته و کاهش شدید جمعیت ها می تواند در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی در آنها باشد (Glenn *et al.*, 1999). متداول ترین روش بررسی روابط تکاملی بر اساس هاپلوتایپ های بدست آمده بین توالی نمونه ها، روش Neighbour-joining مدل (Kimura, 1980) Kimura 2-parameter می باشد.

Freyhof و همکاران در سال ۲۰۰۶ از روش Neighbour-joining بمنظور بررسی روابط تکاملی ماهیان جنس Phoxinellus از خانواده کپورماهیان استفاده نمودند و نتیجه گرفت که جنس های این خانواده از لحاظ شباهت موقعیت مکانی به یکدیگر نزدیک می باشند. در درخت فیلوژنی رسم شده ۶ گروه یا کلاستر بزرگ و ۷ گروه مونومورفیک به دست آمد. Durand و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از ژن سیتوکروم *b* روابط فیلوژنی و بیوژئوگرافی خانواده کپورماهیان در آسیای شرقی را مورد بررسی قرار دادند. در ترسیم درخت تکاملی از روش NJ (Saitou and Nei, 1987) و ۵۰۰ بار تکرار استفاده نمود و نتایج آنها وجود ۵ کلاستر بزرگ را نشان داد که با در نظر نگرفتن ماهی کپور معمولی، سه دسته در آسیای میانه قرار داشتند.

Orrell & Carpenter در سال ۲۰۰۴ روابط فیلوژنی خانواده Sparidae را با استفاده از ژن سیتوکروم *b* و ژن 16s ریوزومی و ترسیم درخت تکاملی MP و ML استفاده نمودند. نتایج هر دو دندروگرام رسم شده با در نظر گرفتن ماهی کپور معمولی بعنوان Outgroup مشابه یکدیگر بود. Near & Hardman در سال ۲۰۰۶ روابط فیلوژنی دو گونه *N. stanauli* و *N. crypticus* از خانواده گربه ماهیان جنوب شرقی آمریکا با استفاده از ژن سیتوکروم *b* مورد بررسی قرار داده و درخت فیلوژنی را با روش MP رسم کردند و عنوان نمودند که این دو گونه با یکدیگر از لحاظ ژنتیکی قرابت نزدیکی دارند ولی از لحاظ تکرار (Bootstrap) در درخت فیلوژنی مورد تایید قرار نگرفت. Ketmaier و همکاران در سال ۲۰۰۴ رابطه فیلوژنی دو شجره جداگانه (Scardinius & Telestes) را با استفاده از ژن سیتوکروم *b* در نرم افزار PAUP4 بررسی نمودند. توالی های ردیف شده (Aligne) با روش MP، ML و NJ آنالیز گردید و نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، فرضیات قبلی تاکسونومیک بر اساس مورفولوژی را تایید نداد

و جمعیت های گونه *S. erythe* در یک کلاستر و جمعیت های گونه *S. scardafa* در کلاستر دیگری قرار گرفتند. Near و همکاران در سال ۲۰۰۰ تکامل تدریجی ژن سیتوکروم *b* و سیستماتیک مولکولی در جنس *Ammocrypta* از خانواده سوف ماهیان را انجام دادند و جهت ترسیم درخت فیلوژنی از روش MP و ML استفاده نمودند. بر اساس نتایج و مقایسه آنها با خصوصیات مورفولوژیکی مشخص شد که بین گونه های *A. bifascia* و *A. beani* رابطه خواهری وجود دارد. Zhi و همکاران در سال ۲۰۰۸ ساختار ژنتیکی سه جمعیت گونه *Nibeaalbiflora* در دریای زرد و شرق چین را با ۴۷۹ توالی ردیف شده حاصل از ۶۴ نمونه و ژن D-loop مطالعه نمودند. در مجموع ۳۷ هاپلوتایپ شامل ۲۵ هاپلوتایپ منحصر به فرد به دست آمد و تنوع هاپلوتایپی بین سه جمعیت بالا بود (۰/۰۱۰ ± ۰/۹۶۸) ولی تنوع نوکلئوتیدی کمی را (۰/۰۰۵ ± ۰/۰۰۸) به دست آوردند. ترسیم درخت هاپلوتایپی به روش NJ تفاوت معنی داری را بین کلاسترها نشان نداد و دلیل آن را بسط و گسترش جمعیت ها بین نواحی مورد مطالعه بعد از یک تنگنای ژنتیکی (bottlenecks) عنوان نمودند. Yongshuang و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه *Larimichthys polyactis* را در ۸ منطقه از دریای زرد و شمال شرقی دریای چین را با

D-loop میتوکندریایی مورد بررسی بررسی قرار دادند. نتایج آنها تنوع هاپلوتایپی بالایی را بین مناطق مورد مطالعه نشان داد (۰/۸۷ ± ۰/۹۸ درصد) و تنوع نوکلئوتیدی (۰/۷۹ ± ۰/۱۵ درصد) بود. در ترسیم درخت فیلوژنی به روش NJ بر اساس مدل Tamura-Nei هیچ شاخه بلندی وجود نداشت و ارتباطی بین مناطق نمونه برداری مشاهده نشد و بطور معمول تمامی هاپلوتایپ ها در درخت ترسیم شده پراکنده بودند و بر اساس آن اعلام نمودند که هیچگونه ساختار شجره نامه ای معنی داری در گونه فوق و در مناطق نمونه برداری شده وجود ندارد. Bo-Nian و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنوع میتوکندریایی ژن D-loop تن ماهیان گونه *niphoniusScomberomorus* در شرق دریای چین و دریای زرد را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها شامل ۱۱۲ هاپلوتایپ از ۱۳۴ نمونه، ۱۱۹ مکان چند شکلی، تنوع هاپلوتایپی (۰/۰۰۲ ± ۰/۹۹۶) و هاپلوتایپی (۰/۰۱۲ ± ۰/۰۲۴) بین هشت جمعیت بود. ترسیم درخت هاپلوتایپی به روش NJ وجود دو کلاستر عمیق و نزدیک به هم بدون هیچگونه ساختار جغرافیایی بود و بر اساس آن شاخه های شجره ای معنی داری در بین مناطق نمونه برداری شده بدست نیامد.

در بررسی حاضر از ۳۱۵ باز ردیف شده برای ژن D-loop و ۳۷۰ باز ردیف شده برای ژن سیتوکروم *b* در بین جمعیت های مناطق مورد مطالعه به ترتیب ۵۵ و ۴ موتاسیون محاسبه و شاخص توزیع شکل گاما بین مکان های مورد بررسی به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۲۰ محاسبه شد که نشاندهنده نرخ متوسط موتاسیون این دو ژن در این گونه می باشد. بر اساس اختلاف نوکلئوتیدی ۱۳ و ۴ هاپلوتایپ، تنوع ژنتیکی بر اساس میزان تنوع هاپلوتایپی (Hd) به ترتیب ۰/۹۶۱ و ۰/۴۱۹، تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۳۸ و ۰/۰۰۲ بدست آمد. Grunwald و همکاران (۲۰۰۲) معتقدند که تنوع هاپلوتایپی ژن D-loop در ماهیان دریایی مخصوصا تاسماهیان را از مقدار متوسط تا بالا و این مقدار برای تنوع نوکلئوتیدی از کم تا متوسط می باشد. ایشان میزان تنوع هاپلوتایپی ژن D-loop را برای تاسماهی پوزه کوتاه



*Acipenser brevirostrum* ۰/۶۴۱ الی ۰/۸۱۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۲۲ الی ۰/۰۰۵۷ را بدست آوردند هر چند که این مقدار برای تاسماهی آتلانتیک *A. oxyrinchus oxyrinchus* بسیار کمتر محاسبه شده بود (Wirgin et al., 2000). Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بررسی ساختار جمعیتی و ژنتیکی تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود و سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از ژن D-loop تعداد ۶ هاپلوتایپ، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بین مناطق را به ترتیب (۰/۰۲۸ ± ۰/۰۶۴۰) و (۰/۰۱۱ ± ۰/۰۴۴) محاسبه نمودند و در درخت هاپلوتایپی به روش NJ دو کلاستر مشخص ترسیم شد به طوریکه نمونه های رودخانه سفیدرود در یک شاخه مجزا قرار داشتند. بر اساس نتایج بدست آمده از این بررسی میزان تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی ژن D-loop برای تاسماهی ایرانی کمی بیشتر از نتایج سایر محققین عنوان شده می باشد ولی این میزان برای ژن سیتوکروم *b* تا حدودی با نتایج دیگران منطبق می باشد بالا بودن میزان تنوع هاپلوتایپی ژن D-loop و متوسط بودن آن برای ژن سیتوکروم *b* بین نمونه های مناطق مورد مطالعه و حد متوسط بودن نرخ موتاسیون می تواند به دلیل اندازه توالی مختلف مورد بررسی باشد همچنین نتایج تنوع ژنتیکی بدست آمده از ژن D-loop تاسماهی ایرانی این بررسی مشابه سایر گونه های تاسماهیان می باشد (Zhang et al., 2003; Wirgin et al., 2000; Quattro et al., 2002). بیشترین تنوع نوکلئوتیدی، بیشترین نرخ جهش و تفاوت جفتی ژن D-loop در بین مناطق مورد بررسی متعلق به ناحیه ۲ شیلاتی بود که به همراه نمونه های رودخانه سفیدرود در درخت تکاملی رسم شده به روش NJ و ماکزیمم پارسیمونی با درصد بالا (۶۴ درصد) در یک شاخه مجزا قرار داشتند. برای ژن سیتوکروم *b* همانند ژن D-loop بیشترین تنوع نوکلئوتیدی، بیشترین نرخ جهش و تفاوت جفتی در بین مناطق مورد بررسی متعلق به ناحیه ۲ شیلاتی بود که در درخت تکاملی رسم شده به روش NJ به همراه نمونه های رودخانه سفیدرود و تعدادی از نمونه های سایر نواحی در یک کلاستر مجزا قرار گرفت. هر چند ترسیم نمودار فیلوژنی شاخص مناسبی برای تمایز جمعیت ها نیست ولی دندوگرام های فوق نشان داد که نمونه های ناحیه ۲ شیلاتی و رودخانه سفیدرود در یک شاخه قرار گرفته اند بنابراین پیشنهاد می شود که برنامه های بازسازی ذخایر تاسماهی ایرانی این دو منطقه جدا از سایر مناطق در نظر گرفته شود.

یک جمعیت، دسته ای از افراد می باشند که در درون خود آمیزش یا تلاقی داشته و از نظر تولید مثلی از گروه های دیگر همان گونه جدا می باشند اما به علت فقدان جدایی کامل بین جمعیتها به دلیل وجود تبادل ژنی بین آنها بعنوان گونه محسوب نمیگردند (صفری، ۱۳۸۵). ساختار ژنتیکی جمعیت ها مداوما در حال تغییر و تحول می باشد که این تغییر بستگی به میزان تولید مثل بین جمعیت ها دارد. جمعیت کارگاههای تکثیر بزرگترین عامل تغییر ساختار ژنتیکی نسبت به جمعیت رودخانه ها بوده و معمولا از لحاظ اندازه کوچکتر از جمعیت رودخانه می باشند. کاهش اختلاف ژنتیکی از طریق آمیزش خویشاوندی و رانش ژنتیکی در بین جمعیت های کارگاه های بازسازی ذخایر امری متداول می باشد. به نظر می رسد فقدان تنوع ژنتیکی عامل کاهش پتانسیل ژنتیکی در اصلاح ذخایر و سازگاری جمعیت ها به تغییرات محیطی باشد. بنابراین پایش (Monitoring) و مطالعه هرگونه

تغییر در ساختار ژنتیکی جمعیت کارگاه های تکثیر و بازسازی ذخایر و نیز جمعیت رودخانه های محل مهاجرت و تخمیزی ضروری به نظر می رسد (Alam & Islam, 2005).

در بررسی حاضر بر اساس آزمون AMOVA میزان Fst که برای تمایز جمعیت ها بکار برده می شود با احتمال ۹۵٪ بین نمونه های مناطق مورد مطالعه و برای دو ژن D-loop و سیتوکروم b به ترتیب ۰/۰۰۲- و ۰/۰۴ محاسبه شد. بر پایه این شاخص برای ژن D-loop بیشترین فاصله جمعیتی بین ناحیه ۲ و ناحیه ۴ شیلاتی و کمترین فاصله جمعیتی بین رودخانه سفیدرود و ناحیه ۴ شیلاتی دیده شد که در سطح احتمال ۰/۰۵ جمعیت رودخانه سفیدرود با سایر مناطق شیلاتی دارای اختلاف معنی دار ( $p \leq 0/05$ ) بود و تفاوت جمعیتی سه منطقه دیگر با یکدیگر معنی دار نبود ( $p \geq 0/05$ ). Zhi و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان Fst در بین سه جمعیت گونه Nibeia albiflora در دریای زرد و شرق چین را اندک و عدم معنی دار محاسبه نمودند ولی بر اساس آزمون دقیق بین جمعیت ها (exact test) تفاوت معنی داری را بین نمونه های مناطق زوشان و کینداهو و نیز بین هر سه جمعیت بدست آوردند و بر همین اساس فرضیه صفر را مبنی بر یکسان بودن جمعیت ها رد کردند. در بررسی جمعیتی تاسماهی ایرانی بر اساس ژن D-loop که توسط Khoshkholgh و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد عنوان شد که تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود با سه ناحیه آستارا، نوشهر و بندر ترکمن دارای اختلاف معنی دار بوده و یک جمعیت مجزا می باشد و سه ناحیه دیگر با یکدیگر دارای اختلاف جمعیتی نمی باشند که نتایج حاضر با نتایج ایشان منطبق بود. همچنین برای ژن سیتوکروم b کمترین فاصله جمعیتی بین نمونه های رودخانه سفیدرود و ناحیه ۳ شیلاتی (۰/۱۳۲-) و بیشترین فاصله جمعیتی بین ناحیه ۲ و ناحیه ۴ شیلاتی دیده شد (۰/۲۳۱) که با توجه به اندک بودن آن در سطح احتمال ۰/۰۵ پس از ۱۰۰۰۰ تکرار فراوانی هاپلوتایپی بین مناطق اختلاف معنی دار نبود ( $p \geq 0/05$ ) و این می تواند بدلیل عدم دقت این ژن در بررسی های جمعیتی باشد و این مسئله که بعضی از ژن های میتوکندریایی برای بررسی های جمعیتی تاسماهیان مفید نیست عنوان شده است (Rezvani Gilkolaei, 1997).

آزمون تفاوت جمعیتها (non-differentiation exact  $p$  values) در بین و داخل هر جمعیت و در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای هر دو ژن محاسبه شد که برای ژن D-loop بین تمامی نمونه ها  $p = 0/770$  و معنی دار نبود ولی در تایید فاکتور Fst این آزمون بین رودخانه سفیدرود و سه منطقه دیگر دارای اختلاف معنی دار بود و این دو آزمون نشان دادند که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود هنوز به عنوان یک جمعیت مستقل و بومی سواحل جنوبی دریای خزر بوده و بایستی مدیریت شیلاتی مبنی بر بازسازی ذخایر این جمعیت با ارزش اعمال و در برنامه های تاسماهی پروری در اولویت قرار گیرد.

Zhi و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی بین سه جمعیت گونه *Nibeia albiflora* در دریای زرد و شرق چین آزمون گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی توزیع تفاوت جفتی بین توالی ها را (mismatch distribution) غیرمعین (unimodal) بدست آورده و عنوان نمودند که شبیه مدل بسط ناگهانی راجرز هارپندینگ بوده و زمان این گسترش را ۱۷۰۰۰۰ - ۸۵۰۰۰۰ سال پیش تخمین زدند. همچنین هر دو آزمون تاجیما و  $F_u F_s$  منفی و معنی دار بودند، بنابر این ایشان عدم وجود مانع یا سد بین دو منطقه، رانش ژنتیکی بین مولدین را دلیل کاهش تنوع ژنتیکی و بسط جمعیت ها دانستند. در بررسی دیگر Yongshuang و همکاران در سال ۲۰۰۹ جمعیت *Larimichthys polyactis* را بین سه منطقه شمال و جنوب دریای زرد و شمال مطالعه و در بررسی آزمون تعادل بین جمعیت ها هر دو آزمون تاجیما و  $F_u F_s$  منفی و معنی دار محاسبه و فرضیه واحد بودن جمعیت ها رد نمودند. همچنین آزمون گسترش و پراکنش تاریخ جمعیتی توزیع تفاوت جفتی بین توالی ها را (mismatch distribution) غیرمعین (unimodal) و مقدار شاخص راجرز هارپندینگ را کم ( $H_{ri} 0/005 \pm 0/066$ ) همانند مدل بسط ناگهانی راجرز هارپندینگ بدست آوردند و زمان این گسترش را ۱۹۷۰۰۰ - ۴۹۳۰۰ سال پیش تخمین زدند.

آزمون های بی طرفی تاجیما و  $F_u F_s$  برای هر دو ژن منفی و عدم معنی دار بدست آمد و به غیر از ژن سیتوکروم *b* که نتوانست غیر معین بودن و شبیه بودن به مدل بسط ناگهانی راجرز هارپندینگ را تایید نماید، نتایج آزمون گسترش و توزیع تاریخ جمعیتی (mismatch distribution) ژن D-loop نشان داد که یک بسط و گسترشی در تاسماهی ایرانی و در مناطق مورد مطالعه رخ داده است. در مجموع می توان اذعان داشت که کم بودن ساختار ژنتیکی بین این گونه در مناطق مورد مطالعه می تواند به سبب بسط جمعیت ها در اثر فعالیت های انسانی در یک دوره زمانی کوتاه مدت و درسال های گذشته اتفاق افتاده و زمان برای رسیدن جمعیت ها به تعادل ژنتیکی کافی نبوده است.

در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که جمعیت تاسماهی ایرانی رودخانه سفیدرود هنوز یک جمعیت مستقل می باشد و علیرغم عدم وجود شواهد مبنی بر جدا و مستقل بودن جمعیت های سه منطقه دیگر بر اساس روش توالی یابی دو ژن D-loop و سیتوکروم *b*، هنوز بر اساس داده های آماری آزمون های مختلف بین تاسماهی ایرانی نواحی مختلف تفاوت ژنتیکی هرچند اندک وجود دارد و نتیجه گیری نهایی با بکارگیری سایر ژن های میتوکندریایی در کنار روش های دیگر مولکولی ضروری بنظر می رسد. از آنجاییکه کاهش شدید جمعیت ها در نتیجه فقدان تنوع ژنتیکی میباشد، ارزیابی نتایج این بررسی و بکارگیری نتایج آن در آینده می تواند راهگشای مدیریت شیلاتی در بازسازی صحیح جمعیت های تاسماهی ایرانی که گونه غالب صید تاسماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر می باشد بخصوص جمعیت رودخانه سفیدرود و ذخایر این گونه با ارزش گردد.

## منابع

۱. اسوبودوا، زد، بی. ویکوسوا. (۱۳۷۴). تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیت های ماهی. ترجمه شریف روحانی، م. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج تهران.
۲. پرافکنده حقیقی، ف.، رضوانی، س. (۱۳۸۹). استفاده از تراکم عناصر کمیاب در اتولیت جهت مطالعه جمعیتی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*). مجله علمی شیلات ایران، ج ۱۴، ش ۳-۳۶-۱۹.
۳. پرواریوخوا، یو. ن. (۱۳۷۴). مطالعه ژنتیکی جمعیتی در استفاده صنعتی از تاسماهیان. مجموعه سخنرانی ها. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. رشت.
۴. پور کاظمی، م. (۱۳۷۹). مدیریت و بازسازی ذخایر پایدار. مجموعه مقالات بازسازی ذخایر. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، اداره کل آموزش و ترویج. تهران. ص ۳۰-۱۷.
۵. پور کاظمی، م.، برادران نویری، ش.، نوروزفشخامی، م. ر. (۱۳۸۳). مروری بر شناسایی جمعیت و نژادهای تاسماهیان دریای خزر. موج سبز. بهار ۱۳۸۳. ص ۲۵-۲۱.
۶. پور کاظمی، م. (۱۳۸۵). بررسی ساختار جمعیتی فیل ماهی در دریای خزر با استفاده از میکروستلایت. در حال انتشار.
۷. پور کاظمی، م. (۱۳۸۷). طرح جامع ارزیابی ساختار ژنتیکی تاسماهیان دریای خزر. گزارش پایانی پروژه. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۱۶ ص.
۸. توکلی، م. (۱۳۸۹). پروژه بررسی ذخایر ماهیان خاویاری دریای خزر سالهای ۱۳۸۸ - ۱۳۸۵ (آبهای ایران). ۱۴۷ ص.
۹. چکمه دوز قاسمی، ف. (۱۳۸۴). مقایسه روشهای استخراج DNA در آبزیان و دستورالعمل کاربردی آن. پایان نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان (رشت). ۵۳ صفحه.
۱۰. چکمه دوز قاسمی، ف. (۱۳۸۷). بررسی امکان تمایز ژنتیکی و مقایسه ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از روش تعیین توالی DNA (DNA sequencing) و Microsatellite. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان. ۱۲۸ ص.
۱۱. حدادی مقدم، ک. (۱۳۸۲). بررسی تغذیه ماهیان خاویاری در سنین مختلف حیات آنها و تا عمق ۱۰ متری دریای خزر (استان گیلان). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. ۶۹ ص.

۱۲. خوش خلق، م. (۱۳۸۵). بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی و روسی (*A.guldenstaedti* و *A.persicus*) دریای خزر با استفاده از روش مایکروستلایت. پایان نامه دکترای تخصصی شیلات. دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۱۵۰ص.
۱۳. رضوانی گیل کلایی، س.، بابایی، س.ع.، پورکاظمی، م. (۱۳۸۰). بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲: ۳۰-۱۵.
۱۴. زهزاده، ب.، حسینی، ن. (۱۳۶۹). شناسایی مقدماتی خلیج گرگان و ذخایر شیلاتی آن. کنفرانس ملی بهره برداری مناسب از ذخایر آبزیان دریای مازندران.
۱۵. سالنامه آماری شیلات ایران. (۱۳۷۹). چاپ ۱۳۹۰. انتشارات سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه. ۶۰ص.
۱۶. شعبانی، ع. (۱۳۸۴). مقایسه جمعیت های مولدین ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) در بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی دریای خزر با روشهای مولکولی (PCR-RFLP) مورفولوژیکی و برخی از نرماتوهای تکثیر آن. پایان نامه دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۲۰ص.
۱۷. صفری، ر. (۱۳۸۵). بررسی ساختار ژنتیکی ماهی شیپ (*A.nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش Microsatellite، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ص.
۱۸. عطایی، ف. (۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۵۷ص.
۱۹. عقیلی نژاد، سید مصطفی. (۱۳۷۱). قره برون یا تاسماهی ایرانی (ترجمه). ژورنال هولچیک ۱۹۸۹ (تالیف).
۲۰. قاسمی، ا. (۱۳۸۲). مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۴ص.
۲۱. قرایی، ا. (۱۳۸۰). تشخیص مولکولی گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی با استفاده از روش RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۸۱ص.

۲۲. کردوانی، پ. (۱۳۷۴). اکوسیستم های آبی (دریای مازندران). نشر قوس، تهران.
۲۳. کیوانشکوه، س. (۱۳۸۱). بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی (*Huso huso*) با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشکده منابع طبیعی نور. دانشگاه تربیت مدرس. ۷۸ ص.
۲۴. نصری چاری، ع. (۱۳۷۲). بررسی مقایسه ای پارامترهای مرفوبیولوژیک چالباش و قره برون سواحل جنوب دریای خزر در جهت نظریه استقلال قره برون با عنوان گونه تاسماهی ایرانی *A. persicus*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گرگان. ۱۳۱ ص.
۲۵. هالرمز، الف. (۱۳۸۴). اصول و روشهای مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول و دوم)، ترجمه ایرج هاشم زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر، تهران.

26. Alam, S., Islam, S.H. 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*. 230, 65-80.
27. Artyukin, E. N. 1983. Differentiation of Persian sturgeon populations and possibilities of its breeding on Volga. In *Biological basis of sturgeon culture*. Ed. Nauka, M., ; 54-61. (in Russian).
28. Bartlett, S.E. and Davidson, W.S., FINS 1992. (Forensically Informative Nucleotide Sequences): A Procedure for Identifying the Animal Origin of Biological Specimens, *BioTechniques*, vol. 12, pp. 408–411.
29. Beckenbach, A.T. 1991. Rapid mtDNA sequence analysis of populations using the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 48, (suppl. 1), pp.45-81.
30. Bemis, W.E., Findeis, E.K., Grande, L. 1997. An overview of Acipenseriformes. *Env. Biol. Fish.* 48, 25-71.
31. Berg, L.S. 1948. The freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, Vol. 1.
32. Berrebi, P. 1996. Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin recent advances from biochemical genetics. *Biological Conservation*. Vol. 72, pp. 237-249.
33. Birstein, V. J., Doukakis, P, and DeSalle, R. 1999. Molecular phylogeny of Acipenserinae and black caviar species identification. *J. Appl. Ichthyol.* 15 (1999), 12-16.
34. Birstein, V. J.; Doukakis, P.; DeSalle, R., 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic; evolutionary implications. *Conserv. Genet.* 1, 81–88.
35. Bo-Nian, S., Zhi-Qiang, H., Tian-Xiang, G., Zhen-Qing, M and Yanagimoto, T. 2009. Mitochondrial DNA variation in the East China Sea and Yellow Sea populations of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *Fish Sci.* 75:593–600.
36. Borodin, N.A. 1898. Experiments on artificial insemination of sturgeon eggs and other biological observations conducted on the Ural River in spring 1987. *vestnik Rybopromyschlennost. St. Petersburg*. Vol. 16-7.
37. Brown, J.R., Bechenback, A.T., Smith, M.J. 1992. Mitochondrial Length variation and heteroplasmy in population of white sturgeon (*A.transmontanus*). *Genetic*. 132:221-228.
38. Brown, J.R., Bechenback, A.T., Smith, M.J. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control Region of white sturgeon (*A.transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 326-341.
39. Brown K.H. 2008 Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *J. Fish Biol.* 72, 355–374.
40. Chakmehdouz Ghasemi, F., Pourkazemi, F., Tavakolli, M., Yarmohammadi, M., Hassanzadeh Saber, M, and Baradaran Noveiri, S. 2011. Application of microsatellite markers to determine populations of the

- Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the South of Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 10(4) 596-606.
41. Congiu, L., Fontana, F., Patarnello, T., Rossi, R., and Zane, L. 2002. The use of AFLP in sturgeon identification. *J. Appl. Ichthyol.* 18 (2002), 286–289.
  42. DeSalle, R.; Birstein, V. J., 1996. PCR identification of black caviar. *Nature* 381, 197-198.
  43. Dettlaff, T. A.; Ginsburg, A. S.; Schmalhausen, O. I. 1993. Sturgeon Fishes, Development biology and aquaculture Translate from Russian by Gause and Vessetzky. *Springer-Velag*. 300 pp.
  44. Dugo, M.A., Kreiser, B.R., Ross, S.T., Slack, W.T., Heise, R.J., Bowen, B.R. 2004. Conservation and management implications of fine-scale genetic structure of Gulf sturgeon in the Pascagoula river, Mississippi. *Appl. Ichthyol.* 20, 243-251.
  45. Durand, J.D., Tsigenopoulos, C.S., Unlu, E. and Berrebi, P. 2002. Phylogeny and Biogeography of the Family Cyprinidae in the Middle East inferred from Cytochrom *b* DNA Evolutionary Significance of this Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 22, No. 1, *January*, pp. 91-100.
  46. Excoffier L., Smouse P.E., and Quattro J.M. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
  47. Fain, S.R., Lemy, P.J., Shafer, J., Hoesch, R.M., Hamlin, B.H. 2000. The development of a DNA procedure for the identification of caviar. *Aquaculture*. 104: 507-516.
  48. Fu YX . 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
  49. Grunwald C., Stabile, J., Waldman, J.R., Gross, R., Wirgin, I. 2002. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Mol. Ecol.*, 11, 1885-1898.
  50. Hillis, D. M., Moritz, C. 1990. *Molecular taxonomy*. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
  51. Kazanchev, E. N. 1981. Ryby kaspiiskogo moray, In Holcik, J., ed., the freshwater fishes of Europe Vol. 1 part.2, AULT-Verlag Wiesbaden Publication.
  52. Ketmaier, V., Bianco, P.G., Cobolli, M., Krivokapic, M., Caniglia, R., De Matthaëis, E. 2004. Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrom *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32: 1061-1071.
  53. Khoshkholgh, M., Pourkazemi, M., Nazari, S, and Azizzadeh Pormehr, L. 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. *Caspian J. Env. Sci.* 2011, Vol. 9 No.1 pp. 17~25.
  54. Kimura M. 1980 A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
  55. Kotlik, P., Markova, S., Choleva, L., Bogutskaya, Nina.G., Guler Ekmekcis, F., Ivanova, Petya.P. 2008. Divergence with gene flow between Ponto-Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular Ecology* (2008) 17, 1076-1088.
  56. Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst. P. A., Artyukhin, E, and Ludwig, A. 2008. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Suppl. 1) (2008), 36–45.
  57. Lin, Y. S., Y.P. Poh, S.M. Lin, and C.S. Tzeng. 2002. Molecular techniques to identify freshwater Eels. *Zoological studies* 41(4):421-430.
  58. Ludwig, A.N, Jenneckens, I., Debus, L., Ludwig, A., Beeker, J., Kirschbaum, F. 2000. Genetic analysis archival specimens of the atlantic sturgeon (*A.sturio*). *Bio. Lnst. Esp. Oceanogra.* 16(44): 181-190.
  59. Ludwig, A., Belfiore, M., Christian, P., Svirsky, V., Jenneckenes, I. 2001. Genomduplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhinchus*). *Genetics* 158:1203-1215.
  60. Ludwig, A.; Debus, L.; Lieckfeldt, D.; Wirgin, I.; Benecke, N.; Jenneckens, I.; Williot, P.; Waldman, J. R.; Pitra, C., 2002a. When the American sea sturgeon swam east. *Nature* 419, 447– 448.
  61. 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.

62. May, B., Krueger, C.C., Kincaid, H.L. 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54, 1542-1547.
63. McQuown, E.C., Sloss, B.L., Sheehan, R.J., Rodzen, J., Tranah, G., May, B. 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new sturgeon primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society*. 139, 1380-1388.
64. Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA of fishes. In: *The Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. P. W. Hochachka and P. Mommsen (eds.) 2: 1-38. *Elsevier Press*. Amsterdam, Netherlands.
65. Miracle, A.L., Campton, D.E. 1995. Tandem repeat sequences variation and length polymorphism in the mitochondrial DNA D-loop the threatened Gulf of Mexico sturgeon (*A.oxirhynchus desotoi*). *J. Hered.* 86: 22-27.
66. Moghim, M., Heist, E. J., Tan, S. G., Pourkazemi, M., Siraj, S. S., Panandam, J. M., Pourgholam, R., Kor, D., Laloei, F, and Taghavi, M. J. 2012. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodine, 1897) and cross-species amplification in four commercial sturgeons from the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 11(3) 548-558.
67. Mogue, N. S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S. M., Mogue, V. N, and Barmintsev, V. A. 2008. Polymorphism of the Mitochondrial DNA Control Region in Eight Sturgeon Species and Development of a System for DNA-Based Species Identification. ISSN 1022-7954, *Russian Journal of Genetics*, 2008, Vol. 44, No. 7, pp. 793–798.
68. Near, Thomas J., Poterfield, Jean C and Page, Lawrence M. 2000. Evolution of Cytochrom b and the Molecular Systematics of Ammocrypta (Percidae: Etheostomatinae). *Copeia*, 2000(3), pp. 701-711.
69. Near, Thomas J. and Hardman, M. 2006. Phylogenetic Relationships of *Noturus stanauli* and *N. crypticus* (*Siluriformes: Ictaluridae*), Two Imperiled Freshwater Fish Species fro the Southeastern United States. *Copeia*, 2006(3), pp. 378-383.
70. Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amini acid sequence of two proteins.*J. Mol. Biol.* 48: 443-53.
71. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. *Columbia University Press*, New York. 1987.
72. Norouzi, M., Pourkazemi, M., Keyvan, A., Fatemi, S.M.R., Kazemi, B. 2008. Population Genetic Structure of Stellate Sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in the South Caspian Sea Using Microsatellite Markers. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 3(3): 158-166.
73. Ong, Tun-Liang., Stabile, J., Wirgin, I., Waldman, J.R. 1996. Genetic Divergence between *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as Assessed by Mitochondrial DNA Sequencing Analysis. *Copeia* 1996 (2): 464–469.
74. Orrell, Thomas.M., Carpenter, Kenet.E. 2004. A phylogeny of the fish family Sparidae (porgies) inferred from mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32 (2004). 425-434.
75. Ovenden, J.R and White, RWG. 1990. Mitochondrial and Allozyme Genetics of Incipient Speciation in a Landlocked Population of *Galaxias truttaceus* (Pisces: Galaxiidae). *Genetics*, Vol 124, 701-716.
76. Pourkazemi, M.1996. Molcular and Biochemical Genetc Analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea .Ph.D Thesis.260 pp. School of Biological sciences,university of Wales,SwanSea.
77. Pourkazemi M., Skibinski, D.O.F. & Beardmore J.A. 1999. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *J. Appl. Ichthyol.*15, 23–28.
78. Pourkazemi M., Skibinski D.O.F. & Beardmore A. 2000 A Preliminary study on phylogenetic relationships between five sturgeon species in the Iranian coastline of the Caspian Sea. *Iran. J. Fish. Sci.* 2, 98-109.
79. Pourkazemi, M. 2006. Caspian Sea sturgeon Conservation and Fisheries: Past present and Future. *Applied Ichthyology*. 22 (Suppl. 1), 12-16.



80. Putilina, L. A. 1983. Morfologicheskaya kharakteristika persidskogo osetra v r. volge in Holcik, J. ed., the Freshwater fishes of Europe Vol. 1. Part. 2, AULA. Verlag Wiesbaden Publication.
81. Quattro JM, Greig TW, Coykendall DK, Bowen BW, Baldwin J. D. 2002 Genetic issues in aquatic species management: the shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) in the southerneastern United states. *Cons. Genet.*, 3, 155–166.
82. Raymarkers, C. 2002. Conservation and broodstock management. International trade in sturgeon and paddlefish species, The effect of CITES listing. *Intern. Rev. Hydrobiol.*, 87(5-6): 525-537.
83. Rezvani Gilkolaei, S. 1997. Molcular population genetic studies of sturgeon species in the SOUTH Caspian Sea. School of biological sciences, university of Wales, SwanSea.
84. Rezvani Gilkolaei, S. 2000. Study of mtDNA Variation of Russian sturgeon population from south Caspian Sea using RFLP the analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions *Iranian Journal of Fisheries sciences*. Vol. 2, No. 1, pp. 13-36.
85. Robles, F., Herran, R., Ludwig, A., Rejon, C.R., Rejon, M.R., Garrido-Ramos, M.A. 2004. Evolution of ancient satellite DNA<sub>s</sub> in sturgeon genomes. *Elsevier. Gene*. Vol 338, pp. 133-142.
86. Rosenthal, H., Pourkazemi, M., Bruch, R. 2006. The 5<sup>th</sup> International Symposium on Sturgeons: a conference with major emphasis on conservation, environmental mitigation and sustainable use of the sturgeon resources. *Applied Ichthyology*. 22 (Suppl. 1), 1-4.
87. Rostami, I. 1961. Biologie et exploitation des esturgeones (Acipenserides) Caspians Narle-Duc (Meuse).
88. Rozas J, Sa´nchez-DelBarrio J.C, Messeguer X.& Rozas R. 2003 DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
89. Salgueiro, P., Carvalho, G., Collares-Pereira, M.J. 2003. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris hispanica* in Portugal: implications for conservation, *Biological Conservation*. 109, 47-56.
90. Sambrook, J., Maniatis, E. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition cols Habor lavratory press.
91. Seeb LW, Seeb JE, Polovina J. J. 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirus marginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. *Fish Bull* 88:713–718.
92. Shaw, P.W., Turan, C., Wright, J. M., O’connell, M., Carvalho, G. R. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparsion to allozyme and mtDNA RFLP analysis. *Heredity* 83.490-499.
93. Slatkin, M. and R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555-562.
94. Smith, T., Nelson, J., Polard, S., Rubidge, E., Mckay, S. J., Rodzen, J., May, B., Koop. B. 2002. Population genetic analysis of sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser river. *J. Appl. Ichthyo*. 18.307-312.
95. Stabile, J., Waldman, J. R., Parauka, F., Wirgin, J. 1996. Stock structure and homing fidelity in gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on RFLP and sequence analyses of mitochondrial DNA. *Genetics*. 144:467-475.
96. Tajima, F. 1989a. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
97. Thai, B.T., Pham, T.A., Thai, U.D., Austin, C.M. 2006. Progress Toward a Global Genealogy of Common Carp (*C. carpio* L.) Strain Using Mitochondrial Nucleotide Sequences Deta. *NAGA, WorldFish Center Quarterly* Vol. 29 No. 3&4 Jul-Dec 2006.
98. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid. Res.* 24, 4876–4882.
99. Waldman J.R., Grunwald C., Stabile J. & Wirgin I. 2002. Impacts of life history and biogeography on genetic stock structure in Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, Gulf sturgeon *A. oxyrinchus desotoi*, and shortnose sturgeon, *A. brevirostrum*. *J. Appl. Ichthyol*. 18, 509–518.

100. Walsh, M.G., Bain, M.B., Squires, T.J., Waldman, R. 2001. Morphological and genetic variation among short nose sturgeon (*A.brevirostrum*) from adjacent and distant river. *Estuaries* Vol. 24. No2: 41-48.
101. Wirgin I., Waldman J.R., Rosko L., Gross R., Collins M.R., Rogers S.G. & Stabile J. 2000. Genetic structure of Atlantic sturgeon populations based on mitochondrial DNA control region sequences. *Trans. American Fish. Soc.*129, 476-486.
102. Wirgin, I.,Waldman, J.,Stabile, J.,Lubinski, B., King, T. 2002. Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analysis in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus*. *J.Appl.Ichthyol.*18:313-319.
103. Zhang, S. M.; Wang, D. Q.; Zhang, Y. P. 2003. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Conserv. Genet.* 4, 673-683.
104. Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhu, B., Brosse, S., Chang, J. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon(*Acipenser sinensis* Gray)genetic variability. *J.Appl.Ichthyol.*21.7-13.
105. Zhi Qiang. H., Tian Xiang, G., Yanagimoto, T and Sakurai, Y. 2008. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea. *FISHERIES SCIENCE* 2008; 74: 544-552.
106. Zhu ,F., Shao, Z., Zhao , N., May, B., Chang, J. 2002. analysis of genetic variation in the Chines sturgeon *Acipenser sinensis*:estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *J.Appl.Ichthyol.*18.301-306.
107. Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Chakmehdouz, F, and Kazemi, R. 2011. Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 27 (2011), 510-513.
108. Yongshuang, X., Zhang, Y., Gao, T., Yanagimoto, T., Yabe, M and Sakurai, Y. 2009. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the small yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Environ Biol Fish.* 85:303-314.

**Abstract**

The population genetic structure of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the 2, 3, 4 fisheries regions and Sefidrud River was investigated based on the DNA sequencing method during 2010 – 2013 sturgeon stock assessment in the south Caspian Sea. DNA samples were extracted using ammonium acetate, the quantity of DNA was measured at 260 and 280 nm using spectrophotometry by Nanodrop (ND 1000 model), and the quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis. Two sets of mitochondrial gene (D-loop and cytochrom *b*) after synthesis were used for polymerase chain reaction (PCR). A Neighbor-Joining (NJ) tree was constructed for all haplotypes according to Kimura 2-parameter model using Mega Version 4.0.1, number of haplotypes, haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity and their corresponding variances, genetic divergence overall and between paired populations ( $F_{st}$ ) by 10,000 permutations and exact test, the gamma distribution shape parameter for the rate heterogeneity among sites and nucleotide sequence, the historical demographic pattern of *A. persicus* using neutrality tests and mismatch distribution analysis (D test of Tajima and  $F_s$  test of Fu), also the concordance of the observed with the expected distribution under the sudden population model using the Harpending's raggedness index (Hri) were analysed. All calculations were conducted using ARLEQUIN version 3.11 and DnaSP 4.0.

The aligned mtDNA sequences of D-loop and cytochrom *b* genes were consisted of 500 and 700 base pairs (bp) respectively. 13 and 4 haplotypes were defined, the average haplotype diversity were 0.961 and 0.419, average nucleotide diversity were 0.038 and 0.002, The gamma distribution shape parameter were 0.19 and 0.20 indicating moderate mutation rate heterogeneity among sites in *A. persicus*. The lowest value of  $F_{st}$  for D-loop gene was calculated between Sefidrud and four fisheries region (-0.002) and the  $F_{st}$  values observed for cytochrom *b* gene was 0.04 with  $N_m=5.37$  and not statistically significant. The exact test of population differentiation (non-differentiation exact  $P$  values) showed significant differences between Sefidrud and other areas ( $P \leq 0.05$ ) for D-loop gene and for cytochrom *b* gene was nonsignificant ( $P \geq 0.05$ ). The mismatch analysis produced a unimodal distribution of pairwise differences for both genes which was consistent with the sudden population expansion model. Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$  statistics were significantly negative ( $D= -0.84$  and  $-0.99$ ,  $P > 0.01$ ;  $F_s= -0.220$  and  $-0.079$ ,  $> 0.01$ ). ARLEQUIN calculated the value of  $t$  as 13.65 and the time since population expansion was estimated to be approximately 1501 years before present based on the mutation rates for the control region and this value for cytochrom *b* gene  $t= 0.98$  which population expansion time was 7.84 years before present.

The results of this study based on D-loop gene showed that population of *A. persicus* in the Sefidrud River is differ from other studied areas. Therefore fisheries managements of this unique and valuable stock for restocking and conservation of gene pools is strongly recommended.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon**  
**Research Institute**

---

**Project Title :** Study on genetic structure of Caspian Sea Sturgeons in the Stock assessment of Sturgeon in Iranian coastline of the south Caspian Sea

**Approved Number:** 12-86-12-8802-88046

**Author:** Fereidoon Chakmehdouz Ghasemi

**Project Researcher :** Fereidoon Chakmehdouz Ghasemi

**Collaborator(s) :** M, Hasanzadeh Saber; M, Tavakkoli; M. R, Behrouz Khoshghalb; A, Ghoroghi; M, Pourkazemi; Sh, Baradaran Noveiri; M. R, Nowrouz Fashkhami; M, Yarmohammadi; L, Azizzadeh Pormehr

**Advisor(s):** –

**Supervisor:** –

**Location of execution :** Gilan province

**Date of Beginning :** 2010

**Period of execution :** 3 Years & 5 Months

**Publisher :** *Iranian Fisheries Research Organization*

**Date of publishing :** 2014

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

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE  
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION  
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Inland Waters Aquaculture  
Research Center**

**Project Title :**

**Study on genetic structure of Caspian Sea Sturgeons in the  
Stock assessment of Sturgeon in Iranian coastline  
of the south Caspian Sea**

**Project Researcher :**

***Fereidoon Chakmehdouz Ghasemi***

**Register NO.**

***43809***