

بررسی ملکولی جمعیت ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* Pallas, 1771 بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی (رودخانه تجن) دریای خزر به روش ملکولی PCR-RFLP

علی شعبانی^{۱*}، محمد پور کاظمی^۲ و سهراب رضوانی^۳

^۱ عضو هیات علمی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت،

^۲ مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران

تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:

چکیده

تنوع ژنتیکی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) دریای خزر با استفاده از ژن ND 5/6 میتوکندریایی و روش مولکولی PCR-RFLP بررسی شد. تعداد ۶۰ نمونه از رودخانه ولگا و ۱۳ نمونه از محدوده رودخانه تجن نمونه برداری به عمل آمد. ژن ND 5/6 با استفاده از ۳۱ آنزیم برشگر اندونوکلاز هضم گردید. دوازده آنزیم هیچ منطقه برشی نداشتند، چهارده آنزیم به روش های همسان را نشان دادند و پنج آنزیم *MboI* (*Sau3AI*)، *HpaII*، *HaeIII*، *RsaI*، *HinfI* تنوع چند شکلی از خود نشان دادند. از ۷۳ نمونه مورد مطالعه ۲۲ ترکیب هاپلوتیپی به دست آمد. در رودخانه ولگا هاپلوتیپ های ABABA، BAAAA، AAAAA و در محدوده رودخانه تجن هاپلوتیپ های AAAAA و ABBAA بیشترین فراوانی را دارا بودند. چهارده هاپلوتیپ مختص رودخانه ولگا و چهار هاپلوتیپ نیز مختص ناحیه رودخانه تجن بوده است. میزان تنوع نوکلئیدی و هاپلوتیپی در درون جمعیت نمونه های ولگا به ترتیب ۰/۰۱۲۲ و ۰/۸۸±۰/۰۲۷ و در رودخانه تجن ۰/۰۰۹۳ و ۰/۸۶±۰/۰۸۹ محاسبه گردید و میزان تنوع نوکلئیدی بین دو جمعیت فوق ۱/۱۲۶ درصد و اختلاف نوکلئوتیدی ۰/۰۴۷ درصد محاسبه شد. میزان X^2 فراوانی هاپلوتیپ ها برابر با ۲۶/۸۶ و شبیه سازی Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار برابر با $X^2 = ۰/۱۷۷ \pm ۰/۰۱۲$ به دست آمد که اختلاف معنی داری را در فراوانی پلوتیپ های دو منطقه مورد بررسی نشان نمی دهد.

واژه های کلیدی: ماهی ازون برون، دریای خزر، *Acipenser stellatus*.mtDNA ND5/6.PCR-RFLP ایران

* قسمتی از پایان نامه دکترای نویسنده اول مقاله

مقدمه

دریای خزر از مهمترین حوضه‌های آبی است که ۹۰ درصد تولید ماهیان خاویاری جهان را به خود اختصاص داده است (پورکاظمی، ۱۳۷۶) و به همراه رودخانه‌های منتهی به آن محل زیست شش‌گونه از ماهیان خاویاری است که یکی از گونه‌های با ارزش آن ماهی ازون‌برون می‌باشد (بهمنی، ۱۳۷۷؛ پورکاظمی، ۱۹۹۹).

حفظ تنوع ژنتیکی در بازسازی ذخائر تاسماهیان به‌صورت قانون پذیرفته شده و در برنامه‌ریزی و مدیریت بازسازی ذخائر باید تنوع ژنتیکی و حفظ فراوانی جمعیت‌های مختلف تاسماهیان (*Acipenseridae*) را مدنظر قرار داد. بنابراین اولین گام در این زمینه تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه‌ها حائز اهمیت است. (پور کاظمی، ۱۳۷۶؛ لالوئی، ۱۳۸۲).

در دهه‌های گذشته در مقایسه با سایر مهره‌داران، مطالعات ملکولی و ژنتیکی روی گونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان محدوده بوده است (می‌یر، ۱۹۹۳)، اما در سال‌های اخیر بکارگیری روش‌های ملکولی در بررسی‌های فیلوژنیک و جمعیتی آبزیان به‌عنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است. برای مثال، اویس و همکاران (۱۹۸۴)، با استفاده از DNA میتوکندری و با روش RFLP به بررسی اختلافات ژنتیکی در هیبریدها و زیرگونه‌های ماهی (*Lepomis machruchirus*) Bluegill پرداختند. تعیین توالی نوکلئوتیدهای mtDNA در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط چانگ و همکاران (۱۹۹۴) و در ارتباط با همین ماهی بررسی ژن‌های ND 3/4 و ND 5/6 با روش PCR-RFLP در دو منطقه اروپا و شرق آسیا توسط گراس و همکاران (۲۰۰۲) بررسی شد. در مورد کاد اقیانوس اطلس نیز توالی نوکلئوتیدهای mtDNA توسط جوهانسن و همکاران (۱۹۹۴) و نیز روش‌های ملکولی در بررسی جمعیت گونه‌هایی از آزادماهیان (برمینگهام و همکاران، ۱۹۹۱؛ پارک و همکاران، ۱۹۹۳) منتشر شد. از

اسکالوپ (ویلدینگ و همکاران، ۱۹۹۷)، ماهیان خاویاری (رضوانی گیلکلابی، ۱۹۹۷، ۱۹۹۹، ۲۰۰۰؛ پورکاظمی، ۱۹۹۶، ۱۹۹۹؛ دونالدچامپتن و همکاران، ۲۰۰۰؛ والدمن و همکاران، ۱۹۹۷؛ بیرستین و همکاران، ۱۹۹۹؛ ولف و همکاران، ۱۹۹۹؛ استابیل و همکاران، ۱۹۹۶ و لودویگ و همکاران، ۲۰۰۱، ۲۰۰۰) صورت پذیرفته که به بررسی اختلاف ژنتیکی در بین گونه‌ها و یا جمعیت‌های مختلف یک گونه پرداخته‌اند.

ماهی ازون‌برون دارای دو فرم می‌باشد. یکی ازون‌برون خزر شمالی و دیگری خزر جنوبی که به علت عدم اختلافات مرفولوژیک، تفکیک این دو فرم از نظر ظاهری امکان‌پذیر نمی‌باشد (هولچیک، ۱۹۸۹).

از آنجایی که مولدین کارگاه‌های تکثیر مصنوعی این ماهی در ایران از دریا تأمین می‌گردند بنابراین شناخت دقیق جمعیت‌های این ماهی در مناطق دریایی و مناطق صید آنها بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد و در نهایت جهت پاسخ به این سوال که آیا بین جمعیت‌های این ماهی در رودخانه ولگا (در بخش شمالی خزر) و رودخانه تجن (سواحل ایران) اختلافی وجود دارد یا نه، بررسی فوق انجام گرفت و تاکنون بررسی‌هایی بین جمعیت‌های شمال و جنوب این ماهی در دریای خزر انجام نگرفته، در نتیجه، این بررسی به‌عنوان اولین تحقیق در این خصوص می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۶۰ نمونه از ماهیان رودخانه ولگا که جهت تکثیر مصنوعی به کارگاه کیزانسکی شهر آستاراخان روسیه انتقال داده شدند و ۱۳ نمونه از سواحل جنوب خزر در محدوده رودخانه تجن که در کارگاه شهید رجائی ساری تکثیر گردیدند، نمونه‌برداری به‌عمل آمد. از هر ماهی به میزان لازم از بخش‌های نرم باله دمی برداشته شده و در الکل اتیلیک ۹۶ درصد نگهداری شدند (رضوانی گیلکلابی، ۱۹۹۷؛ پورکاظمی، ۱۹۹۶).

استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم (رضوانی گیل کلابی، ۱۹۹۷؛ پورکاظمی، ۱۹۹۶) انجام شد. برای بررسی کمی و کیفیت DNA استخراج شده از روش

جدول ۱- برنامه داده شده به دستگاه PCR جهت تکثیر ژن ND 5/6.

تعداد چرخه‌های حرارتی	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)	مراحل
۱	۵	۹۵	واسرشته‌سازی اولیه
	۱	۹۴	واسرشته‌سازی
۳۰	۱/۵	۵۳	الحاق
	۱	۷۲	بسط
۱	۱۰	۷۲	بسط‌نهایی

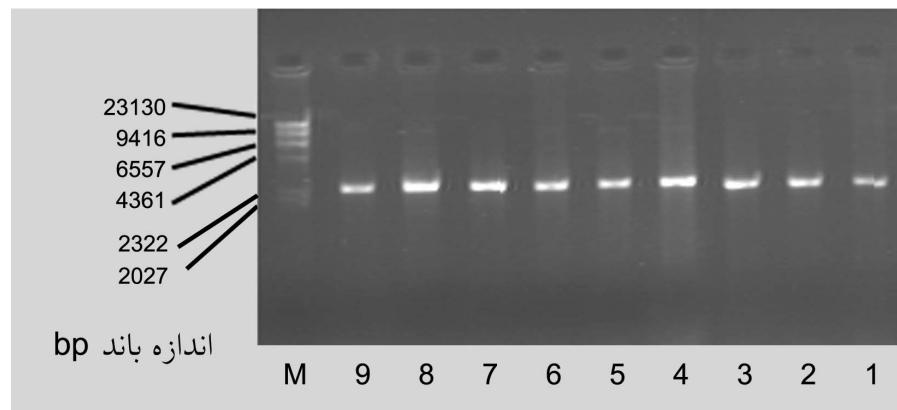
آنالیز آماری توسط نرم‌افزار رایانه‌ای Reap (راف و بنتزن، ۱۹۸۹) و میزان ارتباط هاپلوتیپ‌ها با استفاده از تست DSE و مقایسه پراکنش هاپلوتیپ‌ها با استفاده از تست Monte-Carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار انجام گرفت.

نتایج

کمیت و کیفیت DNA استخراجی مورد سنجش قرار گرفت و پس از اطمینان از مطلوب بودن DNA نسبت به تکثیر ژن ND 5/6 به کمک دستگاه PCR اقدام شد. طول تقریبی قطعه تکثیر شده (ژن ND5/6)، در حدود ۲۵۰۰ جفت باز می‌باشد و به کمک ژل آگارز و مارکر λ DNAHindIII و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و اشعه UV، از تکثیر ژن موردنظر اطمینان حاصل شد (شکل ۱). جهت یافتن پلی‌فیسیم در بین نمونه‌ها، محصول PCR توسط سی و یک آنزیم برش‌دهنده، مورد هضم قرار گرفت، تعداد دوازده آنزیم به نام‌های *KpnI HindIII*، *BclI XbaI BglII SmaI SalI PstI NdeI BamHI ApaI* و *TaqI* هیچ محل برشی بر روی ژن ND 5/6 نداشتند. تعداد چهارده آنزیم برش‌هایی را بر روی قطعه تکثیر شدن انجام دادند ولی در بین افراد مختلف این گونه هیچگونه تنوعی را نشان ندادند و تعداد و طول قطعات ایجاد شده به شرح (جدول ۳) می‌باشد. پنج آنزیم پس از هضم محصول PCR حالت پلی‌فیسیم یا چند شکلی را نشان دادند که برای نمونه هضم آنزیمی، آنزیم *RsaI* (شکل ۲) تعداد و طول قطعات ایجاد شده به شرح جدول ۴ می‌باشد.

الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و نیز اشعه UV استفاده گردید و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه گردید. برای جداسازی و تکثیر ژن موردنظر از آغازگرهای اختصاصی ND 5/6، mtDNA ساخت شرکت MBI آلمان (پورکاظمی، ۱۹۹۶) استفاده گردید که ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدهای آن به شرح زیر است: ND5 - 5' AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAG3' و ND6 - 5' TAACAACGATGGTTTTTCATAGTCA3' و اکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) برای تکثیر ژن ND 5/6، mtDNA طبق جدول ۱ انجام گرفت.

محصول PCR فوق با استفاده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد و همراه با مارکر λ DNAHindIII مورد سنجش قرار گرفت و پس از اطمینان از تکثیر ژن ND 5/6 جهت انجام آنالیز RFLP از آنزیم‌های برش‌دهنده: *EcoRV BglI AvaI AccI*، *AvaII XhoI DdeI NcoI HincII HhaI NdeI KpnI HindIII AluI EcoRI PvuII*، *ApaI BclI XbaI BglII SmaI SalI PstI MboI HinfI RsaI HaeIII TaqI BamHI* و *HpaII* استفاده شد. برای این منظور مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر آنزیم و دومیکرولیتر بافر آنزیم در یک تیوپ با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۴ تا ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور در دمای بهینه هر آنزیم قرار داده شد. محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌آکریل آمید شش درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره و همراه با مارکر 100 bp مورد بررسی قرار گرفتند.



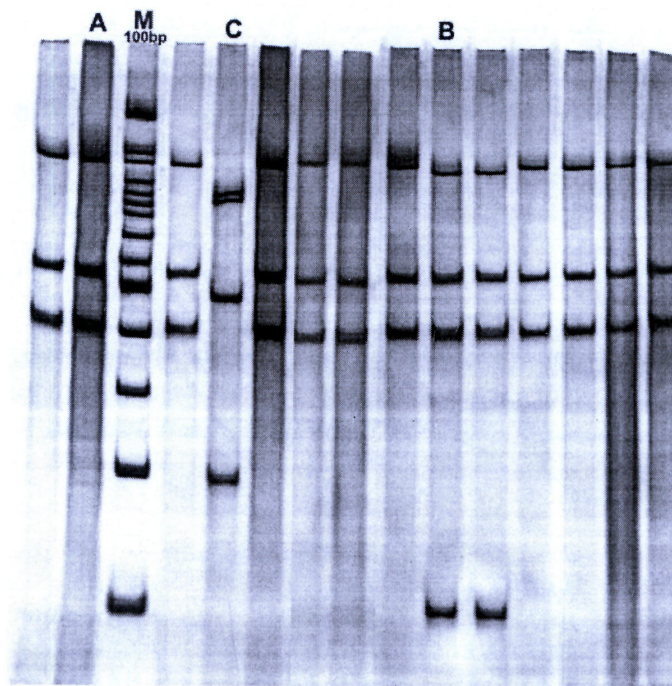
شکل ۱- محصول PCR نمونه‌های ماهی ازون‌برون دریای خزر (ستون‌های یک الی نه مربوط به ژن ND5/6 و ستون M مربوط به ژنوم λ هضم شده با آنزیم *HindIII* می‌باشد).

جدول ۳- نام آنزیم، تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصول PCR.

نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات	نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات
<i>HincII</i>	۲	۲۰۵۰ ، ۵۰۰	<i>AccI</i>	۲	۱۳۲۱ ، ۱۱۷۴
<i>NcoI</i>	۲	۱۵۹۰ ، ۹۰۰	<i>AvaI</i>	۲	۲۱۰۰ ، ۴۰۰
<i>XhoI</i>	۳	۱۱۵۰ ، ۱۰۵۰ ، ۲۸۵	<i>BglI</i>	۳	۱۴۵۸ ، ۶۰۵ ، ۴۳۳
<i>AvaII</i>	۴	۸۱۱ ، ۷۱۸ ، ۶۶۲ ، ۳۰۶	<i>DraI</i>	۲	۱۴۰۰ ، ۱۱۰۰
<i>PvuII</i>	۴	۱۳۵۰ ، ۵۰۰ ، ۴۴۵ ، ۲۱۵	<i>EcoRV</i>	۲	۱۴۵۰ ، ۱۰۵۰
<i>EcoRI</i>	۵	۱۱۰۰ ، ۵۵۰ ، ۴۱۰ ، ۳۷۰ ، ۹۰	<i>HhaI</i>	۲	۱۹۳۱ ، ۵۷۷
<i>DdeI</i>	۱۰	۲۵۷ ، ۲۵۷ ، ۲۲۱ ، ۱۶۴ ، ۱۵۵ ، ۱۲۵ ، ۱۰۴ ، ۵۰۰ ، ۳۸۹ ، ۳۰۶	<i>AluI</i>	۷	۶۶۳ ، ۴۵۴ ، ۴۳۷ ، ۴۱۸ ، ۲۳۰ ، ۱۸۱ ، ۱۱۸

جدول ۴- الگو و اندازه قطعات هضم شده توسط پنج آنزیم برشگر بر روی ژن ND 5/6 میتوکندریایی.

<i>MboI(sau3AI)</i>				<i>HpaII</i>				<i>HinfI</i>			<i>HaeIII</i>			<i>RsaI</i>		
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	A	B	C
۱۷۸۰	۱۵۲۰	۷۷۲	۲۵۰۰	۱۰۲۵	۱۲۶۰	۷۲۰	۱۰۸۱	۱۱۴۴	۱۰۶۶	۶۶۷	۸۴۵	۸۴۵	۸۴۵	۱۵۰۰	۱۳۹۵	۹۶۰
۲۶۵	۲۶۵	۷۳۲	-	۶۲۹	۶۲۹	۶۲۹	۴۴۰	۵۲۶	۵۲۶	۵۲۶	۳۲۰	۴۲۰	۷۷۰	۵۵۴	۵۵۴	۸۸۰
۲۲۸	۲۵۴	۴۰۰	-	۲۶۷	۲۶۷	۳۰۵	۲۵۱	۴۴۱	۴۴۱	۴۴۱	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۴۳۶	۴۳۶	۴۶۳
۲۱۵	۲۲۸	۲۲۸	-	۲۳۵	۲۱۵	۲۶۷	۱۹۸	۳۸۰	۳۸۰	۳۸۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	-	۱۰۵	۱۸۵
-	۲۱۵	۱۹۲	-	۲۱۵	۱۲۱	۲۳۵	۱۸۴	۸۸	۸۸	۲۷۰	۱۹۰	۱۹۰	۱۷۵	-	-	-
-	-	۱۷۶	-	۱۲۱	-	۲۱۵	۱۵۰	-	۷۵	۲۴۰	۱۷۵	۱۷۵	۱۵۵	-	-	-
-	-	-	-	-	-	۱۲۱	۱۲۱	-	-	-	۱۶۵	۱۶۵	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	۸۰	-	-	-	۱۵۵	۱۵۵	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰۰	-	-	-	-	-



شکل ۲- الگوی برشی ژن mtDNA ND 5/6 ماهی ازون برون با آنزیم *RsaI*.

ABADA، BBBAB و BAAAB مختص ناحیه شمال (رودخانه ولگا) بوده و در منطقه رودخانه تجن هیچ نمونه‌ای از آنها دیده نشد و هاپلوتیپ‌های AAAAA، AACAC و BBAAA مختص ناحیه رودخانه تجن در بخش جنوبی دریای خزر بوده و در رودخانه ولگا نمونه‌ای از آنها مشاهده نشد.

برای مقایسه χ^2 فراوانی هاپلوتیپ‌ها بین ولگا و تجن نتایج نشان داده است که $\chi^2=26/87$ بوده و پس از هزار بار تکرار $\chi^2=0/18 \pm 0/01$ بوده که اختلاف معنی‌داری را در فراوانی هاپلوتیپ‌های دو منطقه نشان نمی‌دهد، پنج آنزیم برش‌دهنده به ترتیب از چپ به راست به نام‌های: *RsaI*، *HaeIII*، *HinfI*، *HpaII*، *MboI* تعداد ۲۲ هاپلوتیپ به شرح زیر ایجاد کردند:

با استفاده از آنالیز RFLP محصول تکثیر شده ND 5/6 میتوکندریایی در مجموع ۱۸ هاپلوتیپ در بین ۶۰ نمونه ماهی ازون برون رودخانه ولگا و ۸ هاپلوتیپ مختلف در بین ۱۳ نمونه ناحیه رودخانه تجن و در مجموع ۲۲ هاپلوتیپ مختلف بین ۷۳ نمونه از دو منطقه مشخص گردید.

در رودخانه ولگا هاپلوتیپ‌های AAAAA، BAAAA، ABABA و ABAAA به ترتیب با ۲۸/۳۳ و ۱۱/۶۶ و ۱۱/۶۶ و ۸/۳۳ درصد فراوانی و در محدوده رودخانه تجن هاپلوتیپ‌های AAAAA و BAAAA به ترتیب با ۳۸/۴۶ و ۱۵/۴۰ درصد فراوانی رایج‌ترین هاپلوتیپ‌های مناطق فوق بودند.

هاپلوتیپ‌های AAACA، AAABA، ABBA، AAADA، BAACA، ABAAB، ABABA، ABABB، ABADB، CCCCC، ABABB، ABBA، ABADA

- | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 1.AAAAA | 6.ABAAA | 11.ABABA | 16.ABBBA | 21.BBBAB |
| 2.BAAAA | 7.AABAA | 12.AACAC | 17.ABABB | 22.BAAAB |
| 3.ACAAA | 8.ABBAA | 13.ABAAB | 18.ABADB | |
| 4.BBAAA | 9.AAABA | 14.BAACA | 19.CCCCC | |
| 5.AAAAB | 10.AAACA | 15.AAADA | 20.ABADA | |

در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته، تکثیر و طول قطعه حاصل نیز 2500 bp به دست آورده شد. در بررسی منابع اختلافاتی در اندازه قطعه تکثیر شده در سایر ماهیان دیده شده است برای مثال رضوانی (۱۹۹۷) طول قطعه ND 5/6 را برای تاس ماهی روسی 2400 bp گزارش نموده و امین زاده (۱۳۷۹) برای ماهی قزل آلابی رنگین کمان و تریانتافیلیدیس (۱۹۹۹) در دو گونه از گربه ماهیان اروپا نیز طول این قطعه از ژن میتوکندریایی را 2400 bp گزارش نمودند. تفاوتی که در بعضی از گونه‌ها در طول تکثیر شده ژن ND5/6 مشاهده می‌گردد، احتمالاً به دلیل تفاوت‌های نوکلئوتیدی در پرایمر و در دو انتهای ژن مربوطه می‌باشد (بیومت، ۱۹۹۴).

تجزیه و تحلیل RFLP حاضر روی ژن ND5/6 تکثیر شده با استفاده از تکنیک PCR میانگین تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت دو منطقه را به ترتیب 0.0108 ± 0.0001 و 0.087 ± 0.0001 و میزان تنوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیت رودخانه ولگا و رودخانه تجن را 0.13 درصد و اختلاف نوکلئوتیدی بین دو جمعیت فوق را 0.471 درصد نشان می‌دهد در حالیکه میانگین تنوع نوکلئوتیدی در درون جمعیت تاسماهی ایرانی در مطالعات عطائی، ۱۳۸۱ در سه منطقه جنوب دریای خزر (سواحل ایران) 0.000001 ± 0.04387 و میانگین تنوع هاپلوتیپی 0.7487 با مطالعه بر روی ژن D-Loop میتوکندریایی به دست آمد رضوانی (۲۰۰۰) با مطالعه ND5/6 میتوکندریایی میانگین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در درون جمعیت تاسماهی روسی را در سواحل جنوبی دریای خزر به ترتیب 0.0287 ± 0.0001 و 0.9645 ± 0.0042 و اختلاف نوکلئوتیدی بین جمعیت‌ها را 0.052 درصد گزارش نمودند.

پورکاظمی (۱۹۹۹) با مطالعه ژن D-Loop میتوکندریایی تاسماهی روسی در سواحل جنوبی دریای خزر میانگین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی را به ترتیب 0.05 ± 0.0001 و 0.75 ± 0.0001 به دست آورد، او میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی را در درون جمعیت ماهی

تست DSE برای محاسبات مربوط به میزان ارتباطات بین ۲۷ هاپلوتیپ مختلف انجام گرفت و طبق این تست حداقل اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ شماره ۲۲ با شماره‌های ۲ و ۵ و هاپلوتیپ شماره ۲۰ با شماره‌های ۱۵ و ۱۸ به میزان 0.45 و حداکثر اختلاف نوکلئوتیدی بین هاپلوتیپ شماره ۱۹ با هاپلوتیپ‌های شماره ۱۵ و ۱۸ به میزان 0.57 درصد می‌باشد.

در این بررسی تعداد پنج آنزیمی که تنوع را نشان دادند به‌طور متوسط در هر هاپلوتیپ $27/50$ قطعه را ایجاد کردند و تعداد متوسط بازهای بررسی شده ۱۱۰ باز می‌باشند.

میزان تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت نمونه‌های رودخانه ولگا 0.27 ± 0.088 و در نمونه‌های منطقه رودخانه تجن 0.89 ± 0.086 و میانگین دو منطقه 0.001 ± 0.087 محاسبه گردید. میزان تنوع نوکلئوتیدی در درون جمعیت نمونه‌های رودخانه ولگا 0.122 و در نمونه‌های منطقه رودخانه تجن 0.093 و میانگین دو منطقه 0.000 ± 0.108 محاسبه گردید. میزان تنوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیت فوق 0.13 درصد و اختلاف نوکلئوتیدی 0.471 درصد محاسبه گردید.

بحث

تکثیر ژن ND 5/6 از میتوکندری ماهی ازون‌برون با استفاده از پرایمرهای ND5 و ND6 و برنامه داده شده به دستگاه PCR باعث تولید قطعه واحدی تقریباً به طول 2500 bp (جفت باز) برای دوژن ND 5/6 میتوکندری این ماهی شده است. نتیجه حاصل با نتایجی که پورکاظمی، (۱۹۹۶) با استفاده از همین پرایمرها در این ماهی برای تکثیر ژن ND 5/6 به دست آورده بود، یکسان می‌باشد. همچنین گراس و همکاران (۲۰۰۲) ژن ND 5/6 را در ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* مورد مطالعه قرار دارند و طول قطعه تکثیر شده در این بررسی نیز 2500 bp گزارش شده و قاسمی (۱۳۸۲) نیز ژن مورد نظر را با استفاده از پرایمرهایی که

خزر معرفی کرد. همچنین ولف، ۱۹۹۹ تعداد چهار آنزیم برشگر *SspI*، *NlaIII*، *RsaI* و *Tru9I* پس از قطع محصول PCR ۶۲ bp مربوط به ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی جهت شناسایی ده گونه از ماهیان خاویاری معرفی نمود.

همچنین رضوانی (۱۳۸۰) هاپلوتیپ BBBBC که حاصل برش پنج آنزیم برشگر *HincII*، *HpaII*، *HinfI*، *AluI* و *RsaI* بر ژن سیتوکروم اکسیداز I به طول ۵۵۰-۵۳۰ bp میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) دریای عمان و خلیج فارس معرفی نمود.

نتایج حاصل از شبیه‌سازی Mote-carlo برای محاسبه χ^2 با ۱۰۰۰ بار تکرار اختلاف معنی‌داری را در فراوانی هاپلوتیپ‌های رودخانه ولگا و رودخانه تجن نشان نداده است ($\chi^2 = 0/18 \pm 0/01$). این امر بیانگر آن است که نمونه‌ها متعلق به دو جمعیت متفاوت از رودخانه ولگا و تجن نمی‌باشد.

با توجه به اینکه فاصله جغرافیایی بالای ۱۰۰۰ کیلومتر دو منطقه فوق می‌توانست یکی از عوامل مهم تشکیل دو جمعیت متفاوت از این گونه باشد (استابیل، ۱۹۹۶)، ولی نتایج بررسی‌ها چنین چیزی را نشان ندادند و این امر احتمالاً به دلیل صید ماهیان رودخانه تجن از نواحی دریا و محدوده تجن باشد و ماهیان رودخانه تجن در حقیقت گله‌هایی از ماهیان مهاجر جهت تغذیه از بخش‌های شمال دریای خزر به بخش‌های جنوبی و سواحل ایران هستند که توسط تورهای صیادی صید و به کارگاه‌ها انتقال داده می‌شوند و بهترین روش جهت جداسازی افراد متعلق به رودخانه ولگا و رودخانه تجن استفاده از پنج آنزیم برشگر و شناسایی هاپلوتیپ‌های نواحی فوق می‌باشد.

ازون‌برون سواحل جنوبی دریای خزر با مطالعه ژن ND5/6 میتوکندریایی به ترتیب ۰/۰۰۹±۰/۰۰۱ و ۰/۴۳۲±۰/۰۰۱ گزارش نمود. قاسمی (۱۳۸۲) میزان تنوع نوکلئوتیدی را در ماهی شیپ در مناطق مختلف دریای خزر ۰/۰۰۷۵۴ گزارش نمود و اطلاعات فوق بر اساس مطالعه ژن ND5/6 میتوکندریایی این ماهی به دست آمد. علت پایین بودن تنوع ژنتیکی در ماهیان به علت خونسرد بودن آنها می‌باشد و در موجودات خونسرد به دلیل متابولیسم پائین، سرعت تکاملی و تغییر نوکلئوتیدی mtDNA کم می‌باشد. در ضمن تنوع mtDNA تنها بر اساس موتاسیون می‌باشد و نوترکیبی در آن دخالتی ندارد (بیومنت، ۱۹۹۴).

با استفاده از پنج آنزیم برش‌دهنده به طور متوسط ۱۱۰ جفت باز مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۲۲ هاپلوتیپ مختلف به دست آمد. هاپلوتیپ‌های AAAAA و BAAAA به طور مشترک بیشترین فراوانی را به ترتیب در رودخانه ولگا با ۲۸/۳۳ و ۱۱/۶۶ درصد و در رودخانه تجن با ۳۸/۴۶ و ۱۵/۴۰ درصد دارا بودند. تعداد چهارده هاپلوتیپ مختص رودخانه ولگا بوده و تعداد چهار هاپلوتیپ نیز مختص رودخانه تجن بوده که در رودخانه ولگا از آنها دیده نشد.

با بررسی هاپلوتیپ‌های فوق می‌توان هاپلوتیپ‌های AAACA، AAABA، ABAAA، ABBA، ABAAB، ABABA را به عنوان مارکر ژنتیکی نمونه‌های مختص رودخانه ولگا به حساب آورد و هاپلوتیپ‌های AAAAB، BBAAA، ACAA و AACAC را به عنوان مارکر ژنتیکی نمونه‌های مختص رودخانه تجن نامید به بیان دیگر آنزیم‌های *RsaI*، *HpaII*، *HaeIII*، *HinfI*، *MboI* (*Sau3AI*) می‌توانند جهت رسیدن به هاپلوتیپ‌های فوق به کار روند. استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده جهت شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها در ماهیان متداول می‌باشد. قاسمی (۱۳۸۲) آنزیم برش‌دهنده *CfrIsI* را به عنوان مارکر جهت شناسایی ماهی شیپ رودخانه اورال در حوضه دریای

منابع

۱. امین‌زاده، س. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در قطعه ND 5/6 ژنوم میتوکندری به روش PCR-RFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، ۸۵ ص.
۲. بهمنی، م. ۱۳۷۷. بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاسماهیان، مجله علمی شیلات ایران، تابستان ۱۳۷۷، صفحه ۲۸-۹.
۳. پورکاظمی، م. ۱۳۷۶. نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخائر آن، مجله علمی شیلات ایران، پائیز، ۱۳۷۶. صفحه ۲۲-۱۳.
۴. رضوانی، گیل‌کلانی، س.، سیدعلی‌بابایی، س.ع.، و پورکاظمی، م. ۱۳۸۰. بررسی ملکولی جمعیت میگوی سبز (*Penaeus semisulcatus*) از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) بروش RFLP. مجله علمی شیلات ایران، تابستان ۱۳۸۰، صفحه ۳۰-۱۵.
۵. عطائی، ف. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاس‌ماهی ایران (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش ملکولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۵۷ ص.
۶. قاسمی، س.ا. ۱۳۸۲. مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شیب (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیولوژی ماهیان دریا، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۳ ص.
۷. لالویی، ف. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استان‌های گیلان و مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیولوژی ماهیان دریا، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۸ ص.
8. Avise, J.C., Bermingham, E., Kessler, G., and Saunders, N.C. 1984. Characterization of mitochondrial DNA Variability in a hybrid swara between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Evolution 38: 931-941.
9. Bermingham, E., Forbes, S.H., Fried land, K., and Pla., C. 1991. Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European Origin using restriction analysis of mtDNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48(5): 884-893.
10. Birstein, V.J., Doukakis, P., and Desalle, R. 1999. Molecular Phylogeny of Acipenserinae and Black Caviar Species Identification. J. Appl. Ichthyo.
11. Beumant, A.R. 1994. Genetic and evolution of aquatic organisms. Chapman and hall. London.
12. Chang, Y.S., Huang, F.L., and Lo, T.B. 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 38(2): 138-155.
13. Donald, E., Campton, A., Bass Frank, L., Chapman, A., and Bowen Brian, W. 2000. Genetic distinction of pallid, shovel nose, and Alabama sturgeon: emerging species and the US Endangered species Act. Conservation Genetics, 1:17-32.
14. Gross, R., Kohlmann, K., and Kersten, P. 2002. PCR-RFLP analysis of mitochondrial ND 3/4 and ND5/6 gene polymorphism in the European and East Asian subspecies of common carp (*cyprinus carpio*). Aquaculture. 204: 507-516.
15. Holcik, J. 1989. The Freshwater fishes of Europe. Vol. I. Part II, Acipenseriformes, AULA-Verlag, Wiesbaden.
16. Johansen, S., Berg, T., and Moum, T. 1994. Variability and evolution of mitochondrial DNA sequences from marine animals. In: Third International marine Biotechnology, Tromso, Norway, B3p.
17. Ludwig, A.N., Jennechens, I., Debus, L., Ludwig, A., Beeker, J., and Kirschbam, F. 2000. Genetic analyses of archival specimens of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio*. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 16(44): 181-190.
18. Ludwig, A., Natalia, M., Belfior, Christian Pitra, Victor svirsky and Ingo Jenneckens. 2001. Genetics, 158: 1203-1215.

19. Meyer, A. 1993. Evolution of Mito chondrial DNA in fishes. In: Biochemistry and molecular Biology of fishes, 2 Molecular Biology frontiers. Ed. Hochachka, Pp: 1-33.
20. Park, L.K., Brainard, M.A., Dightman, D.A., and Winans, G.A. 1993. Low level of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*oncorhynchus keta*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol. Vol. 2, No.6, Pp: 362-370.
21. Pourkazemi, M. 1996. Molecular and biochemical Genetic analysis of sturgeon stocks from the Caspian sea, Ph.D. Thesis of Biological sciences, University of Wales, Swansea. 260. p.
22. Pourkazemi, M., Skibinski, D.O., and Bear More, 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.
23. Rezvani Gilkolaei, S. 1997. Molecular Population Studies of sturgeon species in the southern Caspian sea. Ph.D. Thesis, school of Biological Sciences University of Wales, Swansea. 196 p.
24. Rezvani Gilkolaei, S. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequence of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from the southern Caspian sea. Iranian Journal of fisheries Sciences. Vol. 1, No1, Pp: 24-34.
25. Rezvani Gilkolaei, S. 2000. Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from southern Caspian sea using RFLP analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions. Iranian Journal of fisheried Sciences. Vol. 2, No1, Pp: 13-36.
26. Roff, D.A., and Bentzen, P. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X² problem of small sample size. Mol. Bio. Evo. Vol.2. Pp: 539-545.
27. Stabile, J., Waldman, J.R., Parauka, F., and Wirgin, J. 1996. Stocks structure and homing fidelity in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser Oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment Length polymorphism and sequence analyses of mitochondrial. DNA Genetics. 144: 467-475.
28. Triantafyllidis, A., Abatzopoulos, T.J., and Ecomomidis, P.S., 1999. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) Populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. The Genetical society of Great Britain. Heredity. 82:503-509.
29. Waldman, J.R., and Wirgin, I.I. 1997. Status and restoration options for Atlantic sturgeon in North America. Conservation Biology, No.3. Vol. 12, Pp: 631-638.
30. Wilding, C.S., Beaumont, A.R., and Latchford, J.W. 1997. Mitochondrial DNA variation in the scallop *pectin maximus* (L), assessed by a PCR-RFLP method. Heredity, Vol. 79, Pp: 178-189.
31. Wolf, C., Hubber, P., and Luthy, J. 1999. Differentiation of the Sturgeon species by PCR-RFLP. Food research International. 32: 699-705.

Study of mtDNA variation of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) population from the north (Volga River) and South (Sefidrud River) Caspian Sea Using RELP analysis of PCR Amplified ND 5/6 gene regions

A. Shabani¹, M. Pourkazemi² and S. Rezvani³

¹Faculty member of Dept., of Fisheries, Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources,
²International Sturgeon Research Institute, ³Iranian Fisheries Research Organization

Abstract

Genetic variation of Stellate Sturgeon (*Acipenser Stellatus*) from the North (Volga river) and South (Sefidrud river) Caspian Sea was investigated using NADH 5/6 gene and PCR-RFLP analysis. In this Study a total of 60 samples of Stellate Sturgeon from the North (Volga river) and 13 samples from the Southern (Sefidrud river) Caspian sea were collected. MtDNA ND 5/6 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR-product digested using 31 endonucleases restriction enzyme. Five enzymes of 31 enzymes showed polymorphism (*RsaI*, *HinfI*, *HpaII*, *HaeIII* and *MboI*). Totally 22 composite haplotypes among 73 samples were detected. Haplotypes AAAAA, BAAAA, ABABA from the Volga river showed 28.33% and 11.66% frequency, respectively, and from the Tajan river haplotypes AAAAA, ABBA showed 38.46% and 15.40% frequency, respectively. Average haplotype and nucleotide diversity within populations in Volga river was 0.88 ± 0.027 and 0.0122 and in Tajan river was 0.86 ± 0.089 and 0.0093, respectively. Average nucleotide diversity and nucleotide divergence among populations of North and South Caspian Sea were 1.126 and 0.047, respectively. Monte-Carlo simulation using 1000 replication was shown nonsignificant difference between sampling site in the southern and northern Caspian Sea ($X^2=0.036 \pm 0.006$).

Keywords: Stellate sturgeon; *Acipenser stellatus*; PCR-RFLP; mtDNA; Caspian sea; ND 5/6; Volga river; Tajan river; Iran