بررسي تنوع ژنتيكي جمعيت ماهي ازون برون۱۷۷۱ *Acipenser stellatus* **Pallas,** بخش شمالي (رودخانه ولگا) و جنوبي (رودخانه گرگانرود) درياي خزر با استفاده از ژن ND ۵/٦ به روش مولكولي PCR-RFLP

علي شعباني[۱]*، محمد پوركاظمي[۲]، سهراب رضواني[۳]، ابوالقاسم كمالي[٤]، ل.و. ويت ويتسكايا[٥]

۱- استاديار، گروه شيلات، دانشكده شيلات و محيط زيست، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي گرگان، گرگان، ايران
۲- دانشيار، مؤسسه تحقيقات بين‌المللي ماهيان خاوياري دكتر دادمان رشت، رشت، ايران
۳- دانشيار، مؤسسه تحقيقات شيلات ايران، تهران، ايران
٤- دانشيار، گروه شيلات، دانشكده شيلات و محيط زيست، دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي گرگان، گرگان، ايران
٥- استاد، دانشگاه فني دولتي آستاراخان، آستارخان، روسيه

چكيده

در بررسی حاضر، تنوع ژنتیکی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) دریای خزر با استفاده از ژن ND ۵/٦ میتوکندریایی و روش مولکولی PCR-RFLP بررسی شد. برای این کار تعداد ٦۰ نمونه از بافت باله دمی مولدان ماهی ازون برون رودخانه ولگا و ١٤ نمونه از بافت باله دمی مولدان این ماهی از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان (صید شده از محدوده رودخانه گرگانرود) مطالعه شد.

ژن ND ۵/٦ با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و سپس با استفاده از ۳۱ آنزیم برشگر اندونوکلئاز هضم گردید. از بین آنزیمها تعداد دوازده آنزیم هیچ منطقه برشی بر ژن مورد نظر نداشتند، تعداد چهارده آنزیم برشهای همسان و فقط پنج آنزیم برشگر *HinfI*، *RsaI*، *HaeIII*، *HpaII*، *Sau3AI*) *MboI*) تنوع چند شکلی از خود نشان دادند.

در مجموع از بین ٧٤ نمونه مورد مطالعه ۱۸ ترکیب هاپلوتیپی به دست آمد. در رودخانه ولگا هاپلوتیپهای AAAAA، BAAAA، ABABA بترتیب با ۲۸/٤٤٪، ۱۱/٦٦٪ و ۱۱/٦٦٪ و در محدوده رودخانه گرگانرود هاپلوتیپهای AAAAA و BAAAA بترتیب با ٦٤/۲۸٪ و ١٤/۲۸٪ بیشترین فراوانی را دارا بودند. هاپلوتیپ AAAAA – که دارای فراوانی بالای ٦۰٪ در محدودهٔ گرگانرود است– می‌توان به عنوان مارکر مولکولی برای شناسایی ماهی معرفی کرد. در همین حد نیز می‌توان نسبت به برگشت‌پذیری نمونه فوق پس از تکثیر به آبهای ایران اطمینان حاصل کرد. ١٤ هاپلوتیپ مختص رودخانه ولگا بود و در رودخانه گرگانرود و محدوده آن نمونه‌ای از آنها مشاهده نشد.

میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در جمعیت نمونه‌های ولگا بترتیب ۰/۰۱۲۲ و ۰/۰۲۷± ۰/۸۸ و در رودخانه گرگانرود ۰/۰۰۳۹۸ و ۰/۰۱٤٤ ± ۰/۵۹۳٤ محاسبه شد. همچنین میزان تنوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیت فوق ۰/۰۰۸٦٤٤ و اختلاف نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۵٤۲٪ محاسبه شد.

میزان χ^2 فراوانی هاپلوتیپها بین رودخانه ولگا و رودخانه گرگانرود برابر با ۹/۹٦ بود. آنالیز آماری و شبیه‌سازی مونت کارلو[1] با ۱۰۰۰ بار تکرار، برابر با ۰/۰۰۸۳ ± ۰/۹۲٦= χ^2 محاسبه شد. نتیجه حاصل اختلاف معناداری را در فراوانی هاپلوتیپهای دو منطقه مورد بررسی نشان نداد.

کلید واژگان: ماهی ازون برون، دریای خزر، PCR-RFLP، mtDNA ND ۵/٦، *Acipenser stellatus*، ایران، گرگانرود.

---

* نویسندهٔ مسؤول مقاله: تلفن: ۰۹۱۱۳۷۱۵۷۹٦، صندوق پستی: ٤۹۱۳۸–۱۵۷۳۹، E-mail: Ali_Shabany@yahoo.com

1. Monte-Carlo

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

تاسماهیان از زمانهای گذشته به عنوان منبع با ارزش گوشت و خاویار به شمار رفته است. دریای خزر یکی از مهمترین حوضه‌های آبی است که ۹۰٪ تولید ماهیان خاویاری جهان را به خود اختصاص می‌دهد[۱]. این دریا همراه با رودخانه‌های منتهی به آن محل زیست شش‌گونه از ماهیان خاویاری است که یکی از گونه‌های با ارزش آن ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* می‌باشد [۲، ۳]. اما متأسفانه مدتی است که ذخایر با ارزش ماهیان خاویاری دریای خزر از جمله ماهی ازون برون رو به کاهش گذاشته است. این کاهش جهانی است به گونه‌ای که کلیه گونه‌های ماهیان خاویاری جهان و همچنین تمام گونه‌های خاویاری حوضهٔ خزر در فهرست ماهیان در معرض خطر سازمان IUCN[1] قرار یافته است [۴]. از سال ۱۹۹۷ به بعد نام این ماهیان در فهرست کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های در حال انقراض (CITES)[2] قرار گرفته است [۵].

در حال حاضر ذخایر این ماهی در دریای خزر از دو طریق تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی بازسازی می‌شود. بر اساس تحقیقات انجام شده به طور تخمینی حدود ۳۰/۱٪ صید ازون برون، حاصل تکثیر مصنوعی، در کارگاههای تکثیر و پرورش می‌باشد. اگرچه تعداد بچه ماهیان حاصل از تکثیر مصنوعی در کارگاههای تکثیر و پرورش رقم بسیار بالایی را نشان می‌دهد اما این تعداد بچه ماهی هنوز نتوانسته است کاهش ذخایر حاصل از نبود تکثیر طبیعی تاسماهیان را جبران کند؛ علاوه بر این، نمی‌توان کتمان کرد که اگرچه با استفاده از تکثیر مصنوعی سالیانه میلیونها بچه ماهی خاویاری در دریای خزر رها سازی می‌شود، اما نباید مسائل ذخایر ژنتیکی و حفظ بانک ژنی جمعیتهای مختلف را نادیده گرفت [۱].

حفظ تنوع ژنتیکی در بازسازی ذخایر تاسماهیان به صورت قانونی پذیرفته شده است؛ بنابراین مدیران و صاحبنظران در امر تکثیر مصنوعی تاسماهیان، در برنامه‌ریزی و مدیریت بازسازی ذخایر باید نه تنها تنوع ژنتیکی و حفظ فراوانی جمعیتهای مختلف تاسماهیان را مدنظر قرار دهند بلکه در برنامه‌های اجرایی خود به عنوان یک دستورالمعل کاربردی به کار برند. پس اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیتها یا نژادهاست که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه‌ها حایز اهمیت است [۱، ۶].

اگرچه در دهه‌های گذشته در مقایسه با سایر مهره‌داران، مطالعات مولکولی و ژنتیکی روی گونه‌ها و جمعیتهای آبزیان محدود بوده است [۷]، اما در سالهای اخیر به کارگیری روشهای مولکولی در بررسیهای فیلوژنیک و جمعیتی آبزیان به عنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است، برای مثال مطالعه ماهی Bluegill (*Lepomis machruchirus*) توسط آویس[3] و همکاران در سال ۱۹۸٤ انجام شد [۸]. تعیین توالی نوکلئوتیدهای mtDNA در کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) به وسیله چانگ[4] و همکارانش در سال ۱۹۹٤[۹] و در ارتباط با همین ماهی بررسی ژنهای ND۳/٤ و ND ۵/٦ با روش PCR-RFLP در دو منطقه اروپا و شرق آسیا به وسیله گروس[5] و همکاران در سال ۲۰۰۲ بررسی شد. در مورد کاد اقیانوس اطلس نیز توالی نوکلئوتیدهای mtDNA به وسیله جانسون[6] و همکارانش در سال ۱۹۹٤ منتشر شد [۱۰]. همچنین روشهای مولکولی در بررسی جمعیت گونه‌هایی از آزادماهیان [۱۱، ۱۲]، اسکالوپ [۱۳]، ماهیان خاویاری

1. International Union For Conservation of Nature and Natural Resources.
2. Convenion of International Trade Endangere Species Funa and Flora.
3. Avis and *et al*
4. Chang and *et al*
5. Gross and *et al*
6. Johansen and *et al*

Archive of SID
www.SID.ir

[۱۴-۲۳] صورت پذیرفت که در آن اختلاف ژنتیکی در بین گونه‌ها یا جمعیتهای مختلف یک گونه بررسی شد. در ایران نیزدر سال ۱۳۸۰ قرائی توانست با استفاده از روش RAPD دوگونهٔ تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی را از یکدیگر تفکیک کند. کیوان شکوه در سال ۱۳۸۰ از روش RAPD برای تعیین جنسیت فیل ماهی استفاده کرد که پرایمر اختصاصی جنسیت مشخص نگردید. مطالعه تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی در رودخانه سفیدرود، جنوب شرقی و جنوب غربی دریای خزر با استفاده از روشPCR-RFLP و در ناحیه D-LOOP درسال ۱۳۸۱ به وسیله عطایی انجام شد [۲۴].

ماهی ازون برون دارای دو شکل است؛ یکی ازون برون خزر شمالی (*Acipenser stellatus* pallas) و دیگری ازون برون خزر جنوبی یا کورافرم (*Acipenser stellatus* nation Cyrensis, Berg) که به علت نبود اختلافات مورفولوژیک، تفکیک این دو شکل از نظر ظاهری امکان‌پذیر نیست [۲۵].

از آنجا که در ایران مولدان مورد نیاز کارگاههای تکثیر مصنوعی این ماهی از دریا تأمین می‌شوند بنابراین شناخت دقیق جمعیتهای این ماهی در مناطق دریایی و مناطق صید آنها بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در نهایت برای پاسخ به این سوال که آیا بین جمعیتهای این ماهی در رودخانه ولگا (در بخش شمالی خزر) و رودخانه تجن (در بخش جنوبی و سواحل ایران) اختلافی وجود دارد یا خیر، بررسی مولکولی جمعیت ماهی ازون برون این دو ناحیه با استفاده از ژن ND۵/۶ – که یکی از ژنهای میتوکندری است– با روش مولکولی PCR-RFLP انجام شد. با توجه به اینکه تاکنون بررسیهایی بین جمعیتهای شمال و جنوب این ماهی در دریای خزر انجام نشده است، بنابراین بررسی حاضر به عنوان اولین تحقیق در این خصوص است.

۲- مواد و روش‌کار

در این تحقیق ۶۰ نمونه از ماهیان رودخانه ولگا (انتقال داده شده برای تکثیر مصنوعی به کارگاه کیزانسکی شهر آستاراخان روسیه) و ۱۴ نمونه از سواحل جنوب خزر در محدوده رودخانه گرگانرود (تکثیر شده در کارگاه شهید مرجانی گرگان) نمونه‌برداری شد. از هر ماهی درحدود دو گرم از بخشهای نرم باله دمی برداشته و در الکل اتیلیک ۹۶٪ نگهداری شد [۳، ۱۴]. استخراج DNA با استفاده از روش فنل ـ کلروفرم انجام شد [۱۴].

برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و نیز اشعه UV استفاده شد. غلظت آن نیز با استفاده از اسپکتروفتومتری و با سنجش میزان جذب نوری نمونه‌های DNA در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm و نسبت A۲۶۰/۲۸۰ محاسبه گردید[۲۴]. برای جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر از آغازگرهای[1] (پرایمرهای) اختصاصی ND ۵/۶، mtDNA ساخت شرکت MBI آلمان [۱۴] استفاده شد که توالی جفت بازهای آن به شرح زیر است:

ND۵ : ۵ ′ AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAG ۳′

ND۶: ۵′ TAACAACGATGGTTTTTCATAGTCA ۳′

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با کمک دستگاه PCR مدل TC۳۴۱، Bioamersham pharmacia انجام شد. برای هر نمونه یک تیوپ ۰/۲ mL انتخاب و پس از شماره‌گذاری بر اساس جدول ۱، مواد به آن اضافه شد؛ سپس دستگاه PCR بر اساس جدول ۲ برنامه ریزی و تیوپها در آن قرار داده شد.

1. Primer

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱ مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

مقدار براي واكنش ۵۰µL	غلظت مواد	
۱ µ L	۱۰۰ng	DNA
۰/۵ µ L–۰/۲	۵u/µl	DNA Taq Polymerase
۱ µ L	۱۰mM	dNTPs
۳ µ L	۵۰mM	MgcL2
۵ µ L	۱۰ X	PCR Buffer
۱ µ L	۲۰Pmol	پرایمر ۱(ND5)
۱ µ L	۲۰Pmol	پرایمر ۲(ND6)
۳۷/۶ µ L	--	آب مقطر

جدول۲ برنامه داده شده به دستگاه PCR برای تکثیر ژن ND ۵/۶

تعداد چرخه حرارتي	زمان (دقیقه)	درجه حرارت °c	مراحل
۱	۵	۹۵	واسرشته سازی اولیه
۳۰	۱	۹٤	واسرشته سازی
	۱/۵	۵۳	الحاق
	۱	۷۲	بسط
۱	۱۰	۷۲	بسط نهایی

محصول PCR با استفاده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد و همراه با مارکر λDNA *Hind III* سنجش و پس از اطمینان از تکثیر ژن ND ۵/٦ با استفاده از آنزیمهای برش دهنده، هضم آنزیمی شدند. برای اجرای آنالیز RFLP از آنزیمهای برش دهنده: *Acc I*، *Ava I*، *Bgl I*، *Dra I*، *EcoR V*، *Hha I*، *Hinc II*، *Nco I*، *Dde I*، *Xho I*، *Ava II*، *Pvu II*، *EcoR I*، *Alu I*، *Hind III*، *Kpn I*، *Nde I*، *Pst I*، *Sal I*، *Sma I*، *Bgl II*، *Xba I*، *Bcl I*، *Apa I*، *BamH I*، *Taq I*، *Hae III*، *Rsa I*، *Hinf I*، *Mbo I*، *Hpa II* (در مجموع ۳۱ آنزیم) استفاده شد. برای این منظور مقدار ۵µL محصول PCR، ۱ µL آنزیم و ۲ µL بافر آنزیم در یک تیوپ با آب مقطر به حجم۲۰µL رسانده و به مدت ٤ تا ٢٤ ساعت در داخل انکوباتور در دمای بهینه هر آنزیم قرارداده شد. محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌آکریل آمید ٦٪ و رنگ‌آمیزی نیترات نقره همراه با مارکرbp ۱۰۰ مورد بررسی شدند.

تجزیه و تحلیلهای آماری با نرم‌افزار رایانه‌ای ریپ[1] [۲۶] انجام شد. در این برنامه میزان ارتباط هاپلوتیپها با استفاده از آزمون DSE و مقایسه پراکنش هاپلوتیپها با

1. Reep

Archive of SID
www.SID.ir

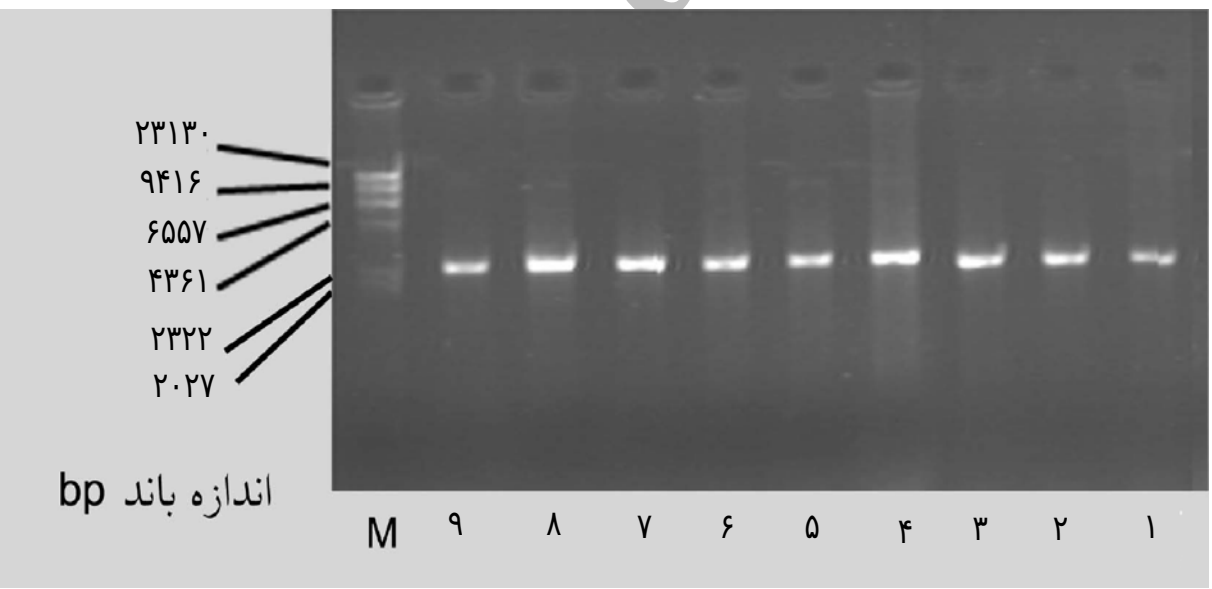
استفاده از آزمون مونت کارلو با هزار بار تکرار صورت پذیرفت.

۳- نتایج

با استفاده از محلول فنل ـ کلروفرم و بر اساس روش ذکر شده در بخش مواد و روشها DNA از باله ماهیان استخراج گردید، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده سنجش و پس از اطمینان از مطلوب بودن DNA، نسبت به تکثیر ژن ND ۵/٦ به کمک دستگاه PCR اقدام شد. طول تقریبی قطعه تکثیر شده (ژنND ۵/٦)، در حدود ۲۵۰۰ جفت باز بود که به کمک ژل آگارز، مارکر *λDNAHindIII*، رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و اشعه UV، از تکثیر ژن مورد نظر اطمینان حاصل شد (شکل۱).

برای یافتن چندشکلی در بین نمونه‌ها، محصول PCR با ۳۱ آنزیم برش‌دهنده، هضم شد، تعداد ۱۲ آنزیم با نامهای *HindIII، KpnI، NdeI، PstI، SalI، SmaI، BglII، XbaI، BclI، ApaI، BamHI* و *TaqI* هیچ محل برشی بر ژن ND۵/٦ نداشتند. تعداد ١٤ آنزیم برشهایی را روی قطعه تکثیر شده ایجاد کردند اما در بین افراد مختلف این گونه هیچگونه تنوعی مشاهده نشد. تعداد و طول قطعات ایجاد شده به شرح جدول ۳ است.

۵ آنزیم پس از هضم محصول PCR، حالت چند شکلی نشان دادند؛ تعداد و طول قطعات ایجاد شده به شرح جدول٤ می‌باشد.



شکل۱ محصول PCR نمونه‌های ماهی ازون برون دریای خزر (ستونهای یک تا نه مربوط به ژن ND۵/٦ و ستون M مربوط به ژنوم λ هضم شده با آنزیم *HindIII* است).

www.SID.ir

جدول۳ نام آنزیم، تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصول PCR

نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات(bp)
AccI	۲	۱۱۷٤ ، ۱۳۲۱
AvaI	۲	٤۰۰ ، ۲۱۰۰
BglI	۳	٤۳۳ ، ٦۰٥ ، ۱٤٥۸
DraI	۲	۱۱۰۰ ، ۱٤۰۰
EcoRV	۲	۱۰٥۰ ، ۱٤٥۰
HhaI	۲	٥۷۷ ، ۱۹۳۱
HincII	۲	٥۰۰ ، ۲۰٥۰
NcoI	۲	۹۰۰ ، ۱٥۹۰
DdeI	۱۰	۱۰٤ ،۱۲٥، ۱٥٥ ، ۱٦٤ ، ۲۲۱ ، ۲٥۷ ، ۲٥۷ ، ۳۰٦ ، ۳۸۹ ، ٥۰۰
XhoI	۳	۲۸٥ ، ۱۰٥۰ ، ۱۱٥۰
AvaII	٤	۳۰٦ ، ٦٦۲ ، ۷۱۸ ، ۸۱۱
PvuII	٤	۲۱٥ ، ٤٤٥ ، ٥۰۰ ، ۱۳٥۰
EcoRI	٥	۹۰ ، ۳۷۰ ، ٤۱۰ ، ٥٥۰ ، ۱۱۰۰
AluI	۷	۱۱۸ ، ۱۸۱ ، ۲۳۰ ، ٤۱۸ ، ٤۳۷ ، ٤٥٤ ، ٦٦۳

جدول٤ الگو و اندازه قطعات هضم شده به وسیله پنج آنزیم برشگر روی ژن ND ٥/٦ میتوکندریایی

MboI(sau3AI)				***HpaII***				***HinfI***			***HaeIII***			***RsaI***		
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	A	B	C
۱۷۸۰	۱٥۲۰	۷۷۲	۲٥۰۰	۱۰۲٥	۱۲٦۰	۷۲۰	۱۰۸۱	۱۱٤٤	۱۰٦٦	٦٦۷	۸٤٥	۸٤٥	۸٤٥	۱٥۰۰	۱۳۹٥	۹٦۰
۲٦٥	۲٦٥	۷۳۲	–	٦۲۹	٦۲۹	٦۲۹	٤٤۰	٥۲٦	٥۲٦	٥۲٦	۳۲۰	٤۲۰	۷۷۰	٥٥٤	٥٥٤	۸۸۰
۲۲۸	۲٥٤	٤۰۰	–	۲٦۷	۲٦۷	۳۰٥	۲٥۱	٤٤۱	٤٤۱	٤٤۱	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	٤۳٦	٤۳٦	٤٦۳
۲۱٥	۲۲۸	۲۲۸	–	۲۳٥	۲۱٥	۲٦۷	۱۹۸	۳۸۰	۳۸۰	۳۸۰	۲٥۰	۲٥۰	۲٥۰	–	۱۰٥	۱۸٥
–	۲۱٥	۱۹۲	–	۲۱٥	۱۲۱	۲۳٥	۱۸٤	۸۸	۸۸	۲۷۰	۱۹۰	۱۹۰	۱۷٥	–	–	–
–	–	۱۷٦	–	۱۲۱	–	۲۱٥	۱٥۰	–	۷٥	۲٤۰	۱۷٥	۱۷٥	۱٥٥	–	–	–
–	–	–	–	–	–	۱۲۱	۱۲۱	–	–	–	۱٦٥	۱٦٥	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	۸۰	–	–	–	۱٥٥	۱٥٥	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱۰۰	–	–	–	–	–

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از آنالیز RFLP محصول تکثیر شده ND ۵/٦ میتوکندریایی در مجموع ۱۸ هاپلوتیپ از بین ٦۰ نمونه ماهی ازون برون رودخانه ولگا و ۵ هاپلوتیپ مختلف از بین ١٤ نمونه ناحیه رودخانه گرگانرود و در مجموع ۱۸ هاپلوتیپ مختلف بین ۷٤ نمونه از دو منطقه مشخص گردید.

در رودخانه ولگا هاپلوتیپهای AAAAA، BAAAA، ABABA و ABAAA بترتیب با ۲۸/۳۳٪ و ۱۱/٦٦٪ و ۱۱/٦٦٪ و ۸/۳۳ ٪ فراوانی و در محدوده رودخانه گرگانرود هاپلوتیپهای AAAAA و BAAAA بترتیب با ٦٤/۲۸ ٪ و ۱٤/۲۸٪ فراوانی رایجترین هاپلوتیپهای مناطق فوق بودند.

سیزده هاپلوتیپ مختص ناحیه شمال (رودخانه ولگا) بود و در محدودهٔ رودخانه گرگانرود هیچ نمونهای از آنها دیده نشد، اما ۵ هاپلوتیپ ناحیه رودخانه گرگانرود به صورت مشترک در رودخانه ولگا نیز وجود داشت.

میزان χ^2 محاسبه شده بین رودخانه ولگا و گرگانرود برابر با ۹/٦٦ و پس از ۱۰۰۰ بار تکرار میزان ۰/۰۰۸۳ ± ۰/۹۲٦= χ^2 محاسبه شد. شایان ذکر اینکه اختلاف معناداری بین فراوانی هاپلوتیپهای دو منطقه مشاهده نشد.

پنج آنزیم برشدهنده بترتیب از چپ به راست با نامهای:

RsaI, HaeIII, HinfI, HpaII, MboI

تعداد ۱۸ هاپلوتیپ به شرح زیر ایجاد کردند:

1.AAAAA	7.AAACA	13.ABABB
2.BAAAA	8.ABABA	14.ABADB
3.ABAAA	9.ABAAB	15.CCCCC
4.AABAA	10.BAACA	16.ABADA
5.ABBAA	11.AAADA	17.BBBAB
6.AAABA	12.ABBBA	18.BAAAB

آزمون DSE برای محاسبات مربوط به میزان ارتباط بین ۱۸ هاپلوتیپ بر اساس جدول ۵ محاسبه گردید.

در این بررسی تعداد پنج آنزیمی که تنوع نشان دادند به طور متوسط در هر هاپلوتیپ ۲۷/۵٦ قطعه ایجاد کردند. تعداد متوسط بازهای بررسی شده ۱۱۰/۲۲ باز بود.

میزان تنوع هاپلوتیپی درون جمعیت نمونههای رودخانه ولگا ۰/۸۸±۰/۰۲۷ و در نمونههای منطقه رودخانه گرگانرود ۰/۱٤٤±۰/۵۹۳٤ و میانگین دو منطقه ۰/۰۲۱۲±۰/۷۳۹۱ محاسبه گردید. همچنین میزان تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت نمونههای رودخانه ولگا ۰/۰۱۲۲ و در نمونههای منطقه رودخانه گرگانرود ۰/۰۰۳۹۸ و میانگین دو منطقه ۰/۰۰۰۰۲±۰/۰۰۸۱ محاسبه گردید.

میزان تنوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیت فوق ۰/۰۰۸٦٤٤ و اختلاف نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۵٤۲ محاسبه شد.

٤- بحث

تکثیر ژن ND ۵/٦ از میتوکندری ماهی ازون برون با استفاده از پرایمرهای ND۵ و ND٦ و برنامه داده شده به دستگاه PCR باعث تولید قطعه واحدی به طول تقریبی ۲۵۰۰ bp (جفت باز) برای دوژن ND۵/٦ میتوکندری این ماهی شده است. نتیجه حاصل با نتایجی که پورکاظمی[1] (۱۹۹٦) با استفاده از همین پرایمرها در این ماهی به دست آورده بود، یکسان میباشد. همچنین گراوس[2] و همکاران در سال ۲۰۰۲ ژن ND۵/٦ را در ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* مطالعه کردند [۲۷]؛ طول قطعه تکثیر شده در این بررسی نیز ۲۵۰۰bp گزارش شد. قاسمی (۱۳۸۲) ژن مورد نظر را با پرایمرهایی که در این تحقیق استفاده شد، تکثیر کرد. او نیز طول قطعه حاصل را ۲۵۰۰ bp به دست آورد. در بررسی منابع، اختلافاتی در اندازه قطعه تکثیر شده در دیگر ماهیان دیده شده است؛ برای مثال رضوانی[3] (۱۹۹۷) طول قطعه ND ۵/٦ را برای تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedti* ۲٤۰۰bp گزارش کرد[۱۵]. امینزاده (۱۳۷۹) برای ماهی قزلآلای رنگینکمان *Oncorhynchus mykiss* [۲۸] و ترینتافیلیدس[4] و همکاران (۱۹۹۹) در دو گونه از گربه ماهیان اروپا *Silurus glanis* و *Silurus aristotelis* نیز طول این قطعه از ژن میتوکندریایی را ۲٤۰۰bp گزارش کردند [۲۹]. تفاوتی که در بعضی از گونهها در طول تکثیر شده ژن ND ۵/٦

1. Pourkazami,
2. Gross and *et al*
3. Rezvani
4. Triantafyllidis and *et al*

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده می‌شود، احتمالاً بـه دلیـل تفاوتهـای نوکلئوتیـدی در پرایمر و در دو انتهای ژن مربوط می‌باشد[۳۰].

تجزیه و تحلیـل RFLP حاضـر روی ژن ND۵/٦ تکثیـر شده با استفاده از تکنیک PCR میـانگین تنـوع نوکلئوتیـدی و تنـــوع هـــاپلوتیپی درون جمعیـــت دو منطقـــه را بترتیـــب ۰/۰۰۰۰۲±۰/۰۰۸۱ و ۰/۷۳۹۱±۰/۰۲۱۲، میـــــزان تنـــــوع نوکلئوتیدی بین دو جمعیـت رودخانـه ولگـا و گرگـانرود را ۰/۰۰۸٦٤٤ و اختلاف نوکلئوتیدی بـین دو جمعیـت فـوق را ۰/۰۰۰۵٤۲ نشان می‌دهد. میزان تنوع نوکلئوتیدی ایـن مـاهی بین دو جمعیت ولگا و گرگانرود ۰/۰۰۸٦٤٤ به دست آمد که در مقایـسه بـا میـزان تنـوع نوکلئوتیـدی بـه دسـت آمـده در مطالعـــات قاســـمی(۱۳۸۲) روی مـــاهی شـــیپ (۰/۰۰۷۵٤) اختلاف چندانی را نشان نمی‌دهد[۳۱].

عطـایی در سـال ۱۳۸۱ میـزان تنـوع نوکلئوتیـدی را در تـاس‌مـاهی روسـی ۰/۰٤٤ [۲۴] و پورکـاظمی (۱۹۹٦) در مطالعات ساختار ژنتیکی جمعیت ازون بـرون ناحیـه جنـوبی دریـای خـزر, میـزان تنـوع نوکلئوتیـدی را ۰/۰۰۹ گـزارش کردند[۱۴]؛ این مقادیر تقریباً برابر با محاسبات بدسـت آمـده است.

علـت پـایین بـودن تنـوع ژنتیکـی در ماهیـان بـه علـت خونـسرد بـودن آنهاسـت. در موجـودات خونـسرد بـه دلیـل متابولیسم پایین، سرعت تکاملی و تغییر نوکلئوتیدی mtDNA کم می‌باشد؛ ضمن آنکه تنوع mtDNA فقط بر اساس جهـش (موتاسیون) است و نوترکیبی در آن دخالتی ندارد [۳۰].

با استفاده از ۵ آنزیم برش دهنـده در روش RFLP بـرای تعیین میزان تنوع، در مجموع به طور متوسـط ۱۱۰/۲۲ جفـت باز بررسی شد. با توجه به تعداد بازهای بررسـی شـده تنـوع حاصل در این گونه را نمی‌توان به حـساسیت کـم ایـن روش نسبت داد.

در این تحقیق تعداد ۱۸ هاپلوتیپ مختلف به دست آمـد. فقط هاپلوتیپ AAAAA به طور مشترک بیشترین فراوانـی را در هر دو منطقـه بترتیـب در رودخانـه ولگـا و گرگـانرود بـا ۲۸/۳۳٪ و ٦٤/۲۸٪ دارا بودند. ۱۳ هاپلوتیپ مختص رودخانه ولگا بود و در محدودهٔ رودخانـه گرگـانرود نمونـه‌ای از آنهـا مشاهده نشد. با بررسی هاپلوتیپهای فوق مـی‌تـوان هاپلوتیـپ AAAAA را با فراوانی بالای ٦۰٪ در محدودهٔ گرگـانرود, بـه عنوان مارکر مولکـولی بـرای شناسـایی مـاهی معرفـی کـرد؛ همچنین می‌توان در همین حد نسبت به برگشت‌پذیری نمونه فوق پس از تکثیر به آبهای ایران اطمینان حاصل کرد.

استفاده از آنزیمهـای بـرش‌دهنـده بـه عنـوان مارکرهـای مولکولی بـرای شناسـایی گونـه‌هـا و زیرگونـه‌هـا در ماهیـان متداول است. قاسمی (۱۳۸۲) آنزیم برش‌دهنده *Cfr*۱۳۱ را به عنوان مارکر برای شناسـایی مـاهی شـیپ رودخانـه اورال در حوضه دریای خزر معرفی کرد[۳۱]. همچنین ولـف[1] (۱۹۹۹) تعـداد ٤ آنـزیم برشـگر *RsaI*, *NLaIII*, *SspI* و *Tru9I* را بـه عنوان مارکر مولکـولی پـس از قطـع محـصول ٤٦۲ bp PCR مربوط به ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی بـرای شناسـایی ده گونـه از ماهیـان خاویـاری معرفـی کـرد[۲۳]. همچنـین رضوانی(۱۳۸۰) نیز هاپلوتیپ BBBBC (که حاصـل از بـرش پنج آنزیم برشگر *HpaII*, *HincII*, *HinfI*, *AluI* و *RsaI* بر ژن سیتوکروم اکسید از I به طول ۵۵۰bp-۵۳۰ میگوی ببری سـبز (*Penaeus semisulcatus*) دریای عمان و خلیج فارس است) را به عنوان مارکر ژنتیکی برای شناسایی میگوی ببری سبز در مناطق فوق معرفی کرد[۳۲].

نتایج حاصل از شبیه‌سازی مونت - کارلو[2] برای محاسـبه χ^2 بـا ۱۰۰۰ بـار تکـرار اخـتلاف معنـاداری را در فراوانـی هاپلوتیپهـای رودخانـه ولگـا و رودخانـه گرگـانرود نـشان نداد(χ^2=۰/۹۲٦±۰/۰۰). این امر بیانگر آن است کـه نمونـه‌هـا متعلق به دو جمعیت متفاوت از رودخانـه ولگـا و گرگـانرود نمی‌باشد.

استابایل[3] و همکاران در سال ۱۹۹٦ پنج جمعیت متفاوت از تاس‌مـاهی *A.oxyrinchus desotei* را در منطقـه آمریکـای

1. Wolf
2. Monte- Carlo
3. Stabile and *et al*

Archive of SID
www.SID.ir

شمالی تا خلیج مکزیک گزارش و عامل ایجاد آن را فاصله زیاد جغرافیایی این مناطق عنوان کردند[۲۲]. بنابراین فاصله جغرافیایی مهمترین عامل در شکل‌گیری ساختار ژنتیکی جمعیتهاست[۳]. اما با وجود فاصله جغرافیایی بالایی که بین دو منطقه وجود دارد (بیشتر از ۱۰۰۰Km) اختلافی بین دو جمعیت فوق مشاهده نشد. عدم مشاهدهٔ اختلاف بین دو جمعیت فوق در این بررسی دلیل بر نبود دو جمعیت مستقل از این ماهی در رودخانه ولگا و گرگانرود نیست زیرا در این تحقیق نمونه‌های رودخانه گرگانرود از دریا صید شدند نه از رودخانه؛ چنانچه با از بین بردن موانع بتوان ماهیان مهاجر به رودخانه گرگانرود را صید کرد و این بررسی را روی آنها انجام داد، احتمالاً نتایج متفاوتی به دست خواهد آمد. دلیل دیگر تعداد آنزیمهای به کار رفته و تعداد بازهای مورد بررسی است به گونه‌ای که از حدود ۲۵۰۰ جفت باز ژن ND۵/۶ میتوکندری این ماهی فقط حدود ۱۱۰ جفت باز آن بررسی شد. نتایج حاصل مربوط به این ۱۱۰ جفت باز است؛ در حالی که حدود ۲۴۰۰ جفت باز بررسی نشده است و چه بسا با بررسی بیشتر و توالی‌یابی ژن فوق نتایجی متفاوت از آنچه به دست آمده, به دست آید.

از آنجا که هاپلوتیپ AAAAA فراوانی بالای ۶۴٪ را در محدودهٔ رودخانه گرگانرود داراست، می‌توان هاپلوتیپ فوق را که با استفاده از هضم آنزیمی پنج آنزیم برش دهندهٔ *RsaI, HaeIII, HinfI, HpaII, MboI* به دست آمده است, به عنوان مارکر مولکولی جمعیت ماهی ازون برون محدودهٔ رودخانهٔ گرگانرود معرفی کرد. چنانچه مراکز تکثیر ماهیان خاویاری بخواهند از مولدان دریایی برای تکثیر استفاده کنند، می‌توان با روش مولکولی ذکر شده و با استفاده از آنزیمهای فوق در فاصلهٔ زمانی کوتاه نسبت به تشخیص نمونه‌ها و در صورت یکی بودن با هاپلوتیپ فوق نسبت به تکثیر مولدان اقدام کنند.

۵- منابع

[۱] پورکاظمی م.؛ "نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخایر آن"؛ *مجله علمی شیلات ایران*؛ پاییز ۱۳۷۶؛ صص.۱۳-۲۲.

[۲] بهمنی م.؛ "بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاسماهیان"؛ *مجله علمی شیلات ایران*؛ تابستان ۱۳۷۷؛ صص. ۹-۲۸.

[3] Pourkazemi M., Skibinski D.O., Bear more A.; "Application of mtDNA d-Loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian sea". *J. Appl. Ichthyol.* 1999; 15: 23-28.

[4] IUCN; IUCN Red List of Threatened Animals. Gland, Switzerland: IUCN. 1996; 70: 235-236.

[5] Ivanov V. P., Vlasenko A. D.; "The Relict of the Caspian Sea, The Sturgeons". *Fish Farming and Fishing*. 2001; 1: 20-21.

[۶] لالوئی ف؛ "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؛ ۱۳۷۹؛ ص. ۷۸.

[7] Meyer A.; Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Biochemistry and molecular Biology of fishes, 2 Molecular Biology frontiers. Ed. Hochachka; 1993; pp. 1-33.

[8] Avise J. C., Bermingham E., Kessler G., Saunders N. C.; "Characterization of mitochondrial DNA Variability in a hybrid swara between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*)". *Evaluation*; 1984; 38: 931-941.

[9] Chang Y. S., Huang F. L., Lo, T. B.; "The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome". *J. Mol. Evol.;* 1994; 38(2): 138-155.

[10] Johansen S., Berg T., Moum. T.; "Variability and evolution of mitochondrial DNA sequences from marine animals. In: Third International marine Biotechnology, Tromso, Norway; 1994; B3p.

Archive of SID
www.SID.ir

[11] Bermingham E., Forbes S. H., Fried land K., Pla. C.; "Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European Origin using restriction analysis of mtDNA". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1991; 48(5): 884-893.

[12] Park L. K., Brainard M. A., Dightman D. A., Winans G. A.; Low level of intraspescific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*oncorhynchus keta*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*; 1993; 2 (6): 362-370.

[13] Wilding C. S., Beaumont A. R., Latchford J. W.; "Mitochondrial DNA variation in the scallop *pectin maximus* (L), assessed by a PCR-RFLP method". *Heredity*; 1997; 79: 178-189.

[14] Pourkazemi M.; "Molecular and biochemical Genetic analysis of sturgeon stocks from the Caspian sea"; *Ph.D. Thesis of Biological sciences*; University of Wales, Swansea.1996; p. 260.

[15] Rezvani Gilkolaei S.; "Molecular Population Studies of sturgeon species in the southern Caspian sea". ; *Ph.D. Thesis, school of Biological Sciences University of Wales*, Swansea; 1997; p. 196.

[16] Rezvani Gilkolaei S.; 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*; 1999; 1 (1): 24-34.

[17] Rezvani Gilkolaei S.; 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 fisheries Sciences*; 2000; 2 (1): 13-36.

[18] Birstein V. J., Doukakis P., Desalle R.; Molecular Phylogeny of Acipenserinae and Black Caviar Species Identification; *J. Appl. Ichthyo*; 1999.

[19] Waldman J. R., Wirgin I. I.; "Status and restoration options for Atlantic sturgeon in North America. *Conservation Biology*. 1997; 12 (3): 631-638.

[20] Donald E. Campton Anna L. Bass Frank A.; Chapman and Brian W. Bowen; "Genetic distinction of pallid, shovel nose, and Alabama sturgeon: emerging species and the US Endangered species Act". *Conservation Genetics*; 2000; 1: 17-32.

[21] Ludwig A. N., Jennechens I. Debus L. Ludwig A. Beeker J. Kirschbam F.; "Genetic analyses of archival specimens of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio*". *Bol. Inst. Esp. Oceanogr;* 2000; 16(44): 181-190.

[22] Ludwig A., Natalia M. Belfior Christian Pitra, Victor svirsky, Ingo Jenneckens. Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics*; 2001; 158: 1203-1215.

[23] Stabile J., Waldman J. R., Parauka F., Wirgin J.; 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*; 1996; 144: 467-475.

[24] Wolf C., Hubber P., Luthy J.; "Differentiation of the Sturgeon Species by PCR-RFLP. Food Research International". 1999; 32: 699-705.

[۲۵] عطـایی ف.؛ "بررسـی تنـوع ژنتیکـی تـاس‌مـاهی ایـران (*Acipenser persicus*) در رودخانه سفیدرود با اسـتفاده از روش ملکـولی PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعـات مورفولوژیکی"؛ *پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد علوم جانوری*؛ دانشکده علوم پایه؛ دانشگاه شهید بهشتی؛ ۱۳۷۹؛ ص. ۱۵۷.

[26] Holcik J.; The Freshwater fishes of Europe. Vol. I. Part II, Acipenseriformes, AULA-Verlag, Wiesbaden; 1989.

[27] Roff D. A., Bentzen P.; "The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X^2 problem

Archive of SID
www.SID.ir

of small sample size". *Mol. Bio. Evo*; 1989; 2: 539-545.

[28] Gross R., Kohlmann K., kersten. P.; 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*; 2002; 204: 507-516.

[۲۹] امین‌زاده س.؛ "بررسی تنوع ژنتیکی ماهیهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در قطعه ND ۵/٦ ژنوم میتوکندری به روش PCR-RFLP"؛ *پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی*؛ دانشکده علوم پایه؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۷۹؛ ص. ۸۵.

[30] Triantafyllidis A., Abatzopoulos T. J., Ecoenomidis P. S.; "Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) Populatioms, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. The Genetical society of Great Britain". *Heredity*. 1999; 82: 503-509.

[31] Beumant, A.R.; Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman and hall. London; 1994.

[۳۲] قاسمی س.؛ "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؛ ۱۳۸۲؛ ش. ۱؛ ص. ۷۳.

[۳۳] رضوانی گیل‌کلایی س.، سیدعلی‌بابایی س. ع. و پورکاظمی م.؛ "بررسی ملکولی جمعیت میگوی سبز (*Penaeus semisulcatus*) از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسید از I (COI) به روش RFLP."؛ *مجله علمی شیلات ایران*؛ تابستان ۱۳۸۰؛ صص. ۱۵-۳۰.

Archive of SID

www.SID.ir