نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی

Journal homepage: http://jair.gonbad.ac.ir

شناسایی ماهی آزاد دریای‌خزر *Salmo caspius* (Kessler, 1877) و قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) با استخراج DNA از آب (eDNA)

سیده سارا جعفری‌کناری [۱]، رسول قربانی*[۲]، حمیدرضا رضایی [۳]، رحمت‌اله ندافی [۴]، حدیثه کشیری [۵]، فرانسوآ پومپنون [۶]

[۱] دانشجو دکتری، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲] دانشیار، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۳] استاد، گروه محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۴] عضو هیات علمی‌دانشگاه کشاورزی اپسالا، سوئد

[۵] دانشیار، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۶] استاد دانشگاه گرنوبل فرانسه

نوع مقاله:
پژوهشی اصیل

https://doi.org/10.22034/jair.10.2.11

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۰۰/۰۵/۱۹
پذیرش: ۰۰/۰۶/۰۸

نویسنده مسئول مکاتبه:
رسول قربانی، دانشیار، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: rasulghorbani@gmail.com

چکیده

اثبات وجود گونه در مناطق مختلف می‌تواند برای مطالعه ردیابی الگوی مهاجرتی گونه مفید باشد. استفاده از روش‌های غیرتهاجمی مانند eDNA می‌تواند در ردیابی و پراکنش و بهبود مدیریت منابع آبی و گونه‌ها تأثیر به‌سزایی داشته باشد. در این مطالعه ۱۵ نمونه آب از مناطق مختلف حوضه جنوبی دریای‌خزر گرفته شد. برای جداسازی DNA از آب، نانوذرات مغناطیسی با پوشش سیلیس اصلاح شده با آمین استفاده شد. در این مطالعه برای اولین بار از روش مگنت‌های آمینه برای جداسازی DNA محیطی از یک نمونه آب استفاده شد. DNA سه نمونه آب از خروجی آب مرکز تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در رودخانه تجن ساری، نمونه آب از قفس ماهیان آزاد در نوشهر و نمونه آب از اطراف قفس پرورشی ماهی آزادخزر در تنکابن به‌درستی استخراج شد و موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نمونه شماره ۱ در کلید قزل‌آلا رنگین‌کمان و همچنین نمونه شماره ۲ و ۳ در کلید ماهی‌آزاد دریای‌خزر قرار گرفتند، که نشان‌دهنده این است که گونه‌ها به‌درستی با نانوذرات مغناطیسی سلیکاته آمینه جداشده‌اند و حضورشان در پیکره آبی توسط DNA محیطی تثبیت‌شده است.

واژه‌های کلیدی:
نانوذرات مغناطیسی، DNA محیطی ، اثبات گونه، حوضه جنوبی خزر

۱ | مقدمه

به‌منظور بهبود مدیریت ارزیابی ذخایر آبزیان، شناسایی ساختار مولکولی جمعیتی، مهاجرت و عوامل محیطی تأثیرگذار باتوجه به نوع گونه اهمیت دارد. هرچه دانش ما از جمعیت‌ها و تنوع درون گونه‌ای گونه‌ها بیشتر باشد، تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت‌آمیزتر است (Janati *et al*., 2013). یک روش درحال ظهور که تشخیص بسیاری از گونه‌های آبزیان را بهبود می‌بخشد تجزیه و تحلیل DNA محیطی (eDNA) است. این روش تعیین‌کننده حضور گونه‌ای براساس جمع-آوری، استخراج، و افزایش DNA از محیط زیست است (Ficetola *et al*., 2008; Goldberg *et al*., 2011; Jerde *et al*., 2011). مطالعات اخیر انجام شده نشان داد که تشخیص eDNA می‌تواند یک روش قابل اعتماد تعیین توزیع گونه‌های مختلفی از ماهیان اکوسیستم آب شیرین و همچنین اقیانوس‌ها باشد (Jerde *et al*., 2011; Dejean *et al*., 2011; Minamoto *et al*., 2012; Thomsen *et al*., 2012a; Wilcox *et al*., 2013). روش های تشخیص eDNA حساسیت بیشتری از روش‌های سنتی نمونه‌گیری، مانند الکتروفیشینگ یا آزمون تصویری نشان داده‌اند ، به‌ویژه هنگامی که حضور گونه‌های نادر ویا کم تراکم را تعیین می‌کند.

مطالعات انجام شده نیز همبستگی مثبت بین غلظت eDNA و رابطه فراوانی تنوع موجودات زنده را نشان داده است (Goldberg *et al* ., 2013; Takahara *et al*., 2012; Thomsen *et al*., 2012b; Pilliod *et al*., 2013). حتی وقتی یک جانور آبزی دیده نشود ، با ریختن پوست، دفع مواد زائد، آزادسازی گامتها و تجزیه، آثاری ازخود در آب برجای می‌گذارد. محققان می‌توانند با جمع‌آوری یک نمونه آب، DNA گونه موردنظر را تشخیص داده و مشخص کنند که این گونه اخیراً در پیکره آب بوده است یا خیر. ثابت شده است که DNA محیط ابزاری حساس، دقیق و مقرون به‌صرفه برای تشخیص گونه‌ها در محیط‌های آبی است و خصوصاً از آنجاکه غیرتهاجمی است و خطری برای حیوانات آبزی ندارد، بسیارجذاب‌است.ماهی‌آزاد دریای‌خزر، *salmo*

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

caspius (Kessler, 1877) از باارزش‌ترین گونه‌های ایران و جهان محسوب می‌شود که در سال‌های اخیر درمعرض خطر انقراض قرار گرفته است و جمعیت گونه وحشی آن در دریای‌خزر به‌ندرت وجود دارد و صید می‌شود. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)، نیز عضو مهم دیگری از این خانواده می‌باشد. این ماهی یکی از مهم‌ترین گونه ماهیان آب شیرین است که سهم بالایی در تأمین غذای انسان دارد (Sattari *et al*., 2003) و به‌عنوان گونه اصلی در اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان و ایران در آمده است. ماهی آزاد دریای‌خزر جزء ماهیان مهاجر این دریا بوده و برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوزه دریای‌خزر وارد می‌شود و بعد از تخم‌ریزی به دریا باز می‌گردد. مهاجرت این ماهی جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌ها، دو نوبت در سال صورت می‌گیرد، گروهی از ماهیان در فصل پاییز به رودخانه مهاجرت می‌کنند، دسته‌ای دیگر در فصل بهار به رودخانه‌ها مهاجرت کرده و تا زمستان (حدود ۱۱-۱۰ ماه) در رودخانه می‌مانند تا زمان تخم‌ریزی آنها فرا رسد. ماهی آزاد همانند سایر گونه‌های قزل‌آلای قهوه‌ای در مرحله پرورش در آب شیرین رشد نسبتاً کندی در مقایسه با قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد با این وجود همانند برخی دیگر از زیر گونه‌های مهاجر قزل‌آلای قهوه‌ای نظیر قزل‌آلای دریایی قابلیت رشد بسیار شگرفی در آب‌های شور و لب شور دارد. زیر گونه خزر بزرگ‌ترین فرم قزل‌آلای قهوه‌ای است. به‌دلیل تکثیر گسترده ماهی قزل‌آلا در بیشتر رودخانه‌های منتهی به دریای‌خزر، همچنین قفس‌های پرورشی مستقر در دریا، امکان فرار برخی از ماهیان و ورود به پیکره دریا وجود دارد. و امکان جابه‌جایی مانند مهاجرت در آب وجود خواهد داشت، که در این صورت در مسیر حرکتی بقایای موکوس مترشحه از سطح بدن ماهی می‌تواند در پیکره آب باقی بماند. از این رو می‌توان با این احتمال از محیط آبی استخراج DNA انجام داد، و حضور یک گونه را معین کرد.

به‌دلیل اهمیت نوع گونه ماهی آزاد و باتوجه به فقدان اطلاعات لازم در زمینه تأثیر عوامل اکولوژیکی بر ساختار جمعیت‌های آن در دریای‌خزر، در این مطالعه سعی شده با استفاده از داده‌های ژنتیکی DNA محیطی، پراکنش و تشخیص ماهی آزاد دریای‌خزر در سواحل جنوبی خزر (استان گلستان، مازندران و گیلان) فراهم شود. در روش DNA محیطی احتیاج به استفاده از ماهی و یا آسیب رساندن و صید آن نیست، از این رو به‌خاطر نبودن نمونه کافی از گونه موردنظر برای اولین بار در ایران از روش استخراج DNA از محیط طبیعی (eDNA) به‌منظور ردیابی نقاط پراکنش گونه در سواحل دریای‌خزر صورت خواهد گرفت. با این روش وجود گونه در نقاط مختلف دریای‌خزر بررسی خواهد شد و صحت یا عدم‌صحت مهاجرت آن بررسی خواهد شد. همچنین ردیابی و پراکنش این گونه‌ها می‌تواند در ارزیابی ذخایر گونه‌ای، مدیریت منابع، آینده نگری و برآورد سودآوری شیلاتی گونه‌ها تاثیر به‌سزایی داشته باشد و در کاهش هزینه‌های صیادی اثرگذار باشد.

۲ | مواد و روش‌ها

ماهی آزاد دریای‌خزر جزء ماهیان مهاجر محسوب می‌شود. باتوجه به الگوی مهاجرتی این گونه و با درنظر گرفتن مناطق پرورشی آن و قزل‌آلای رنگین‌کمان در دریای‌خزر، مناطقی برای نمونه‌برداری انتخاب شدند که بیشترین احتمال رد شدن ماهی از آن‌ها وجود داشته است. نمونه‌های آب در فصل تکثیر ماهی آزاد دریای‌خزر (فصل پاییز و زمستان) و از کل حوضه جنوبی‌خزر (انزلی، تنکابن، عباس آباد، هراز، نوشهر، فریدونکنار، بابلسر، ساری، بندرترکمن) گرفته شد. لیست کامل نمونه‌های گرفته شده به تفصیل در جدول ۱ آمده است. به‌منظور صحت بیشتر آزمایش از قفس و همچنین از مناطقی در نزدیکی قفس‌های ماهی در درون دریا و نیز مراکز تکثیر نمونه‌برداری انجام شد.

جدول۱- محل نمونه برداری

شماره نمونه	محل تقریبی نمونه برداری آب
۱	آب دریا از درون قفس پرورش ماهی قزل‌آلا واقع در دریا در بندرترکمن (PEN)
۲	آب مرکز تکثیر قزل‌آلا و آزاد تنکابن واقع در دوهزار
۳	آب کمی پایین تر از آب خروجی از سد شهید رجایی ساری
۴	آب کمی‌بعد از خروجی مرکز تکثیر و پرورش قزل‌آلا در زیر سد شهید رجایی ساری
۵	آب رودخانه از خروجی بعد از مرکز تکثیر قزل‌آلا و آزاد تنکابن واقع در دوهزار
۶	آب رودخانه منتهی به دریای‌خزر در منطقه عباس آباد- تنکابن
۷	آب دریا در محل مصب که ورودی رودخانه به دریا است در فریدونکنار
۸	آب رودخانه هراز کمی‌بعد از استخر پرورش ماهی واقع در رودخانه هراز
۹	آب رودخانه فریدونکنار قبل از ریختن به دریا
۱۰	آب دریا در منطقه بندر ترکمن حوالی قفس‌های پرورشی
۱۱	آب دریا در منطقه بابلسر از درون قفس پرورش ماهی قزل‌آلا و آزاد
۱۲	آب دریا در منطقه بابلسر بیرون از قفس حوالی قفس‌های پرورشی
۱۳	آب دریا در منطقه بندر انزلی نزدیک به اسکله حوالی محل ورود آب رودخانه به دریا
۱۴	آب دریا در منطقه نوشهر نزدیک به اسکله حوالی محل ورود آب رودخانه به دریا
۱۵	آب دریا در منطقه نشتارود حوالی محل ورود آب رودخانه به دریا

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

نمونه گیری از آب (نمونه eDNA): برای اینکار از عمق کمتر از ۱۰ سانتی‌متر بالایی سطح آب نمونه‌ها جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در تیوپ‌های استریل دربدار ذخیره و در مجاورت یخ برای انجام آزمایش-های بعدی به فریزر ۲۰- منتقل شدند.

جداسازی DNA از آب با مگنت آمینه (Amineted magnet): برای جداسازی DNA از آب از مگنت‌های آمینه شده استفاده شد. مولکول DNA چون بار الکتریکی دارد، به سر باردار مگنت می‌چسبد. ابتدا باید pH آب کمی پایین بیاید چون این واکنش در محیط اسیدی اتفاق می‌افتد، باتوجه به شور یودن آب دریا مقادیر مواد زیر محاسبه و به نمونه‌های آب اضافه شد. استات سدیم ۵۰ مولار ($C_2H_3NaO_2$) به مقدار ۱۶۴/. گرم و ۲/۳۳۶ گرم نمک NaCl یک مولار به نمونه اضافه شد.پس از رساندن PH به ۵/۵ ,۱۰۰ ماکرولیتر مگنت آمینه اضافه شد. بعد از دوساعت ابتدا با مگنت‌ها را با آهن ربا قوی جمع میکنیم. سپس با۱۰۰ ماکرولیتر Tris HCl ۰/۲۵ مولار ۶/۸ =PH دوبار شست و شو داده شد. ۵۰ ماکرولیتر بافر شست‌وشو (Elution Buffer) اضافه شد و در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت در هیتر قرار گرفته شد. در نهایت مایع شسته شده را درون میکروتیوب تمیز و استریل ریخته می‌شود و در آخر برای پایداری بیشتر ۱۰ماکرولیتر Tris HCl نیم مولار اضافه شد. مایع باقی مانده در انتها DNA است (Ashtari *et al*., 2005).

جداسازی DNA با نانوپارتیکل مگنت پوشیده شده با سیلیکا (silica-coated magnetic nanoparticles): برای ساختن نانوپارتیکل سیلیکا ۱۰ ماکرولیتر اتانول ۹۹٪ را با ۱ ماکرولیتر تئوس (تترا اتیل اورتو سیلیکات TEOS) را به‌مدت پنج دقیقه روی استیرر قرار داده ,سپس ۴۵ ماکرولیتر اتانول ۹۹٪ را با ۱۰ ماکرولیتر آمونیوم ۲۵٪ و ۵ ماکرولیتر هیدرازین مخلوط کرده و به مایع قبلی اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت روی استیرر چرخیدند. مایع شیری رنگ به‌دست آمده ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و با الکل جهار بار شست‌وشو داده شد. در ادامه لایزین فعال (Activeited Lysine) به نانوپارتیکل به‌دست آمده اضافه شد. PH را با اسید HCl به ۳ رسانده شد. در سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه گذاشته، دوبار با آب مقطر شست‌وشو داده شد. نمونه‌ها به مراتب گفته شده در بالا آماده‌سازی شدند و با ۱۵۰ ماکرولیتر از نانوپارتیکل به‌دست آمده به نمونه آب اضافه شده و به‌مدت دوساعت روی شیکر (تکان‌دهنده) قرار گرفتند. سپس دوبار با Tris HCl شست و شو داده شدند. ۱۵۰ ماکرولیتر بافر اتصال‌دهنده (binding buffer) اضافه شده، به‌مدت ۳۰ دقیقه روی هیتر در دمای ۶۰ درجه قرار گرفتند و در انتها ۱۰ ماکرولیتر Tris HCl اضافه شد (Kang *et al*., 2009).

تعیین شناسه ژنتیکی و صحت سنجی DNA استخراج شده با توالی یابی ژنتیکی: به‌منظور بررسی ثبت خط شناسه ژنتیکی ماهی آزاد و دریای‌خزر و قزل‌آلا رنگین‌کمان, برای قطعه‌ای حدوداً bp250 از ژن COI، که دو ماهی را ازهم متمایز می‌کند,آغازگرهای اختصاصی زیر برای تکثیر طراحی و استفاده شد:

SalmoF: 5' CCAGCACCHTCTAAYATCTCAGT 3'
SalmoR: 5' AAGAAAGATGCYCCGTTRGC 3'

بدین منظور برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مقادیر DNA ۱ میلی‌لیتر, ۱۰ میلی‌گرم مستر میکس, پرایمرهای فوروارد و ریورس ۱ میکرولیتر, آب مقطر (DNase RNase Free) استفاده شد. همه درون تیوب ۰/۲ استریل ریخته و در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شدند.

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) ژن سیتوکروم b: واکنش PCR به‌صورت زیر برای تکثیر ژن سیتوکروم b به اجرا در آمد: ابتدا برای یافتن دمای بهینه تست گرادیان دمایی گذاشته شد و دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد بهترین باند مشاهده شد. واسرشتگی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، الحاق دو رشته DNA در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط اولیه به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت پس از اتمام ۴۰ چرخه مرحله بسط نهایی به‌مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Sambrook and Russell, 2006) پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲درصد بررسی گردید. و سپس برای انجام توالی‌یابی به روش سنگر به شرکت ژن فن آوران ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل eDNA: به‌منظور شناسایی مولکولی توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از BLAST با توالی‌های پایگاه داده ژن (Gen Bank) همردیف (Align) و مقایسه می‌شوند. بلاست نام یک نرم‌افزار کاربردی در علوم سلولی و مولکولی و ژنتیک است که مخفف واژگان Basic Local Alignment Search Tool یا ابزار پایه‌ای برای جستجوی برهم‌نهی‌های موضعی است. با این نرم‌افزار می‌توان توالی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها یا توالی نوکلئوتیدها را در DNA را با هم مقایسه کرد. این نرم‌افزار توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی که بیشترین شباهت را با توالی موردنظر دارد از دیگر قابلیت‌های این نرم‌افزار است. برای آنالیز و صحت سنجی از دو توالی ثبت شده قزل‌آلا و ماهی آزاد در بانک داده با شماره دسترسیLT617546.1:117-263 و MG434732.1:123-263 استفاده شد. کلیه اطلاعات به‌دست آمده در برنامه‌های نرم‌افزاری، MEGA-6 و نرم‌افزار BioEdite مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳ | نتایج

نتایج به‌دست آمده از تعداد ۱۵ نمونه آب از حوضه جنوبی دریای‌خزر، پس از بررسی کیفیت DNA استخراج شده و فرستاده شده برای توالی‌یابی، قطعه‌ای به طول حدود ۲۰۰ جفت باز از ژن COI با آغازگر اختصاصی طراحی شده، سه نمونه در توالی‌یابی موردتأیید قرار گرفت. پس از بررسی این سه نمونه با ژن‌های ثبت شده در پایگاه داده ژن، از این سه نمونه، دو نمونه همپوشانی بالای ۹۵٪ با گونه ماهی آزاد دریای‌خزر و یک نمونه همپوشانی بالای ۹۵٪ با گونه قزل‌آلا رنگین‌کمان داشتند. در تصاویر زیر درصد هم‌پوشانی هر یک از نمونه‌ها براساس لیست بانک ژن نشان داده شده است فلش قرمز درصدهای هم‌پوشانی با توالی الگو ما را نشان می‌دهند.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Oncorhynchus mykiss isolate O.M-04/Cytb/AJK/2016 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitoc...	Oncorhynchus...	259	259	96%	4e-65	97.99%	1136	MG434732.1
Oncorhynchus mykiss isolate O.M-03/Cytb/AJK/2016 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitoc...	Oncorhynchus...	259	259	96%	4e-65	97.99%	1136	MG434731.1
Oncorhynchus mykiss isolate O.M-02/Cytb/AJK/2016 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitoc...	Oncorhynchus...	259	259	96%	4e-65	97.99%	1136	MG434730.1
Oncorhynchus mykiss isolate O.M-01/Cytb/AJK/2016 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitoc...	Oncorhynchus...	259	259	96%	4e-65	97.99%	1136	MG434729.1
Oncorhynchus mykiss voucher NEFC_F16-293 mitochondrion, complete genome	Oncorhynchus...	259	259	96%	4e-65	97.99%	16660	MF621750.1

شکل ۱- درصد نزدیکی و همانندی نمونه ۱ با گونه قزل‌آلا رنگین‌کمان

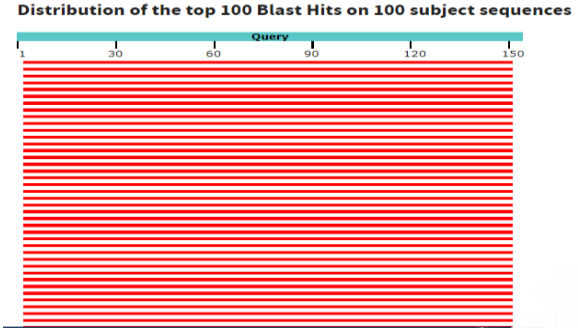
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Salmo trutta mitochondrial cytb gene for cytochrome b, specimen voucher T26053	Salmo trutta	171	171	97%	2e-38	86.01%	1140	LT617546.1
Salmo ciscaucasicus isolate Terek33 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo ciscauc...	171	171	97%	2e-38	86.01%	842	MG029553.1
Salmo ciscaucasicus isolate Terek32 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo ciscauc...	171	171	97%	2e-38	86.01%	842	MG029552.1
Salmo trutta caspius isolate Kura04 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo caspius	171	171	97%	2e-38	86.01%	842	MG029548.1

شکل ۲- درصد نزدیکی و همانندی نمونه ۲ با گونه آزاد دریای‌خزر

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Salmo trutta mitochondrial cytb gene for cytochrome b, specimen voucher T26053	Salmo trutta	206	206	96%	5e-49	88.44%	1140	LT617546.1
Salmo ciscaucasicus isolate Terek33 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo ciscauc...	206	206	96%	5e-49	88.44%	842	MG029553.1
Salmo ciscaucasicus isolate Terek32 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo ciscauc...	206	206	96%	5e-49	88.44%	842	MG029552.1
Salmo trutta caspius isolate Kura04 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Salmo caspius	206	206	96%	5e-49	88.44%	842	MG029548.1

شکل ۳- درصد نزدیکی و همانندی نمونه ۳ با گونه آزاد دریای‌خزر

مقدار E-value هرچه به صفر نزدیک تر باشد اطمینان ما به نتیجه به‌دست آمده بیشتر می‌شود. نتایج BLAST براساس این دو شاخص مرتب می‌شوند و بنابراین توالی‌هایی که در لیست هستند، توالی‌هایی هستند که اطمینان در شباهت آنها به توالی الگوی مورد نظرمان بیشتر است. بنابراین نمی‌تواند مقداری دقیقاً مساوی صفر بگیرد اما می‌تواند مقدار بزرگتر از ۱۰ داشته باشد همچنین می‌تواند مقدار آن به طول توالی نیز بستگی داشته باشد مقدار E-value در شکل‌ها با آکولاد قرمز مشخص شده‌اند. تصویر زیر، خلاصه گرافیکی از BLAST توالی‌ها که از سایت NCBI گرفته شده است را نشان می‌دهد. نمای کلی از توالی‌های پایگاه داده است که با دنباله توالی تقاضا تراز شده است. این میله‌های افقی رنگ‌بندی شده با نمره و نشان‌دهنده میزان هم‌ترازی در دنباله را نمایش می‌دهند. این خطوط رنگی موازی نشان‌دهنده کیفیت میزان تشابه توالی تقاضا با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی گفته شده است. به‌عبارتی نوع رنگ، درجه تشابه را نشان می‌دهد. رنگ قرمز مؤید بیشترین درجه تشابه و رنگ مشکی حائز کمترین تشابه با توالی تقاضا است. هر مقدار توالی موردنظر با توالی‌های موجود در بانک ژن مشابهت بیشتری داشته باشد رنگ و طول خطوط قرمز بیشتر و ممتدتر می‌شود. به‌همین ترتیب برای هر سه نمونه آنالیز شده ما، شکل زیر به‌دست آمده است که نشان‌دهنده مشابهت زیاد نمونه‌های ما با نمونه‌های ثبت شده در بانک داده جهانی است. حداکثر برآورد احتمال پارامتر گامای مجزا برای نرخ مکان‌های مورد بررسی ۰/۵۳۷۸ است. الگو و نرخ جایگزینی براساس مدل Tamura-Nei (1993) (+G) برآورد شد. توزیع گاما گسسته برای مدل‌سازی تفاوت نرخ تکاملی بین مکان‌ها (۵ دسته ، [+G]) استفاده شد. میانگین نرخ تکاملی در این دسته‌ها ۰/۰۳، ۰/۱۸، ۰/۵، ۱/۱۳، ۳/۱۸ جایگزینی در هر سایت بود. فرکانس‌های نوکلئوتیدی ٪A = 21.74 ، ٪T/U = 29.21 ، ٪C = 32.07 و ٪G = 16.98 است. برای برآورد مقادیر ML، توپولوژی درخت به‌طور خودکار محاسبه شد. حداکثر احتمال ورود به سیستم برای این محاسبه - ۳۵۰،۷۵۷ بود . تفاوت در سوگیری ترکیب پایه در هر مکان نشان داده شده است. توجه داشته باشید که حتی وقتی الگوهای جایگزینی در بین نسب‌ها یکدست باشند، فاصله ترکیب‌بندی با تعداد تفاوت بین توالی‌ها ارتباط خواهد داشت.



شکل ۴- نتیجه بلاست به‌صورت خلاصه گرافیک و تشابه کامل توالی موردنظر با ده‌ها توالی موجود در بانک ژن

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

جدول ۲- برآورد ترکیب بین دنباله‌ها

شاخص	P				
	۱	-			
	۲	۰/۱۸۴۹	-		
تفاوت سوگیری ترکیب بین دنباله‌ها	۳	**۰/۰۴۶۱**	۰/۱۱۷۲	-	
	S. trutta	۰/۰۴۹	۰/۲۵۸۷	۰/۰۳۵	-
	O. mykiss	۰/۰۲۱۳	۰/۱۹۱۵	۰/۰۲۱۳	۰/۰۲۸۴
	۱	-			
	۲	۰/۰۸	--		
برآورد واگرایی تکاملی بین دنباله‌ها	۳	۱	۰/۱۸	-	-
	S. trutta	۱	۰/۰۴۶	۱	
	O. mykiss	۱	۰/۰۶۶	۱	۱
	۱	-			
	۲	۰/۰۹۸	-		
آزمایش همگنی الگوهای جایگزینی بین توالی‌ها	۳	۱	۰/۱۶۴	-	
	S. trutta	۱	**۰/۰۳۲**	۱	-
	O. mykiss	۱	۰/۰۷	۱	۱
	۱	--			
	۲	۰/۱۰۲۷			
برآورد عدم جهت ترکیب پایه خالص بین دنباله‌ها	۳	۰	۰/۰۴۸۳	-	
	S. trutta	۰	۰/۱۶۷۸	۰	-
	O. mykiss	۰	۰/۱۱۳۵	۰	۰

احتمال رد این فرضیه صفر که توالی‌ها با همان الگوی جایگزینی تکامل یافته اند ، همانطور که از میزان تفاوت در سوگیری های ترکیب پایه بین توالی‌ها قضاوت می‌شود (آزمون شاخص اختلاف). برای برآورد مقادیر p از آزمون مونت کارلو با استفاده از فرمول زیر به کمک نرم‌افزار MEGA به‌دست آمد. R = [A*G*k1+T*C*k2]/[(A+G)*(T+C)]

هر ورودی احتمال جایگزینی (r) از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگو و نرخ جایگزینی بر اساس مدل (Tamura-Nei, 1993) برآورد شد. مونت کارلو (۵۰۰ تکرار) استفاده شده است که در زیر مورب نشان داده شده است. مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ مهم تلقی می‌شوند (p =۰/۰۴۶ و p =۰/۰۳۲) برآورد شاخص اختلاف در هر مکان برای هر جفت دنباله در بالای مورب نشان داده شده است. نرخ جایگزینی‌های مختلف انتقالی به‌صورت پررنگ و جایگزینی‌های عرضی به‌صورت کج نشان داده‌شده است (جدول۳). هنگام ارزیابی آنها باید مقادیر نسبی r را درنظر گرفت. برای سادگی، مجموع مقادیر r برابر با ۱۰۰ است ، فرکانس‌های نوکلئوتیدی A = 21.74٪، T/U = 29.21٪، C = 32.07٪ و G = 16.98٪ است. برای برآورد مقادیر ML، توپولوژی درخت به‌طور خودکار محاسبه شد. حداکثر احتمال ورود به سیستم برای این محاسبه ۳۵۸/۳۴۳- بود. جهت کلی انتقال/واگرایی R ۳/۴۹۸ = است. k_1= میزان احتمال جانشینی باز پورین و k_2 = میزان احتمال جانشینی باز پریمیدین است. باتوجه به جدول ۷ هر ورودی احتمال جایگزینی (r) از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) را نشان می‌دهد. برای سادگی، مجموع مقادیر r برابر با ۱۰۰ است. نرخ جایگزینی‌های مختلف انتقالی به‌صورت برجسته و مقادیر جایگزینی‌های عرضی به‌صورت کج نشان داده‌شده است. فرکانس‌های نوکلئوتیدی 22.07% (A), 28.84% (T/U), 32.19% (C), و 16.91% (G) است. نسبت‌های نرخ انتقال/واگرایی k_1 = ۴/۴۴۵ (پورین) و k_2 =۷/۱۷۹ (پیریمیدین) است.

جدول ۳- شاخص‌های تجزیه و تحلیل نوکلئوتیدی

		A	T/U	C	G
حداکثر برآورد احتمال شاخص گاما برای نرخ مکان‌های مورد بررسی	A	-	۳/۳۴۹۵	۳/۶۷۶۷	۹/۵۱۸۰
	T/U	۲/۴۹۲۷	-	۲۸/۹۷۲۱	۱/۹۴۷۴
	C	۲/۴۹۲۷	۲۶/۳۹۴۱	-	۱/۹۴۷۴
	G	۱۲/۱۸۳۰	۳/۳۴۹۵	۳/۶۷۶۷	-
برآورد حداکثر احتمال ماتریس جایگزینی	A	-	۳/۵۵	۳/۸۹	۹/۷۱
	T/U	۲/۶۴	-	۲۸/۰۴	۲/۰۶
	C	۲/۶۴	۲۵/۵۴	-	۲/۰۶
	G	۱۲/۴۲	۳/۵۵	۳/۸۹	-
حداکثر برآورد احتمال کامپوزیت الگوی جایگزینی نوکلئوتیدها	A	-	۳/۵۵	۳/۹۷	**۹/۲۷**
	T	۲/۷۲	-	**۲۸/۴۸**	۲/۰۸
	C	۲/۷۲	**۲۵/۵۱**	-	۲/۰۸
	G	**۱۲/۰۹**	۳/۵۵	۳/۹۷	-
حداکثر تخمین احتمال جهت انتقال/تغییر	A	-	۲/۷۳۷۵	۲/۷۳۷۵	۱۹/۵۲۴۹
	T	۲/۷۳۷۵	-	۱۹/۵۲۴۹	۲/۷۳۷۵
	C	۲/۷۳۷۵	۱۹/۵۲۴۹	-	۲/۷۳۷۵
	G	۱۹/۵۲۴۹	۲/۷۳۷۵	۲/۷۳۷۵	-

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

تخمین جهت انتقال/تغییر 3.57 (R) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل ۲ پارامتری (Kimura, 1980) برآورد شد. فرکانس‌های نوکلئوتیدی A = 25.00٪، T/U = 25.00٪، C = 25.00٪ و G = 25.00٪ است. آنالیز ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌ها نیز به‌صورت زیر به‌دست آمده است. میزان نزدیکی مقدار ترکیب نوکلئوتیدی در دامنه داده شماره ۱ به این میزان در قزل‌آلا رنگین کمان و همچنین نزدیکی این مقدار در شماره‌های ۲و ۳ با آزاد دریای‌خزر نشان‌دهنده جداشدن درست نمونه‌ها از یکدیگر و نزدیکی و قرار گرفتن در طبقه‌بندی هریک از گونه‌ها دارد.

Tajima's D یک آماره آزمایش ژنتیک جمعیت است. D تاجیما به‌عنوان تفاوت بین دو معیار تنوع ژنتیکی محاسبه می‌شود. توجه به جدول مقدار آماره آزمون تاجیما کوچکتر از صفر است که از نظر تفسیر بیولوژیکی به معنی آلل‌های کمیاب فراوان رفت و برگشت انتخابی اخیر، افزایش جمعیت پس از تنگنای اخیر، ارتباط با ژن جارو شده است. همچنین D منفی نشان‌دهنده چندشکلی بیش از حد با فرکانس پایین نسبت به انتظار است، که نشان‌دهنده افزایش اندازه جمعیت است (Tajima, 1989; Kumar *et al.*, 2018; Nei & Kumar, 2000).

تاریخ تکامل درخت تبار زایی با استفاده از ماتریس تشابه نی و لی (Nei & Li, 1979) و روش UPGMA ترسیم گردید. نتیجه حاصل همان‌طور که در بالا با درصد همانندی توالی‌ها نیز نشان داده‌شده بود، یکی‌از نمونه‌ها در گروه ماهی قزل‌آلا و دو نمونه دیگر در گروه ماهی آزاد قرار گرفت. درخت مطلوب با مجموع طول شاخه = ۲۵,۲۵۰۰۰۰۰۰ نشان داده شده است. درصد درختان تکراری که گونه‌های مربوطه در آن در آزمون راه اندازی بوته (۱۰۰۰ تکرار) در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. درخت به مقیاس کشیده می‌شود، طول شاخه‌ها در واحدهای مشابه فاصله‌های تکاملی است که برای استنباط درخت فیلوژنتیک استفاده می‌شود. فواصل تکاملی با استفاده از روش تعداد تفاوت محاسبه شد و در واحد تعداد تفاوت پایه در هر دنباله است.

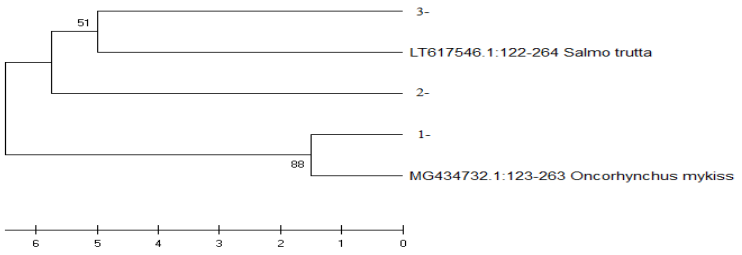
جدول ۳- ترکیب نوکلئوتیدی

دامنه داده‌ها	T(U)	C	A	G	کل
1	۳۱/۸۱۸۱۸۱۸۲	۳۱/۸۱۸۱۸۱۸	۲۰/۷۷۹۲۲۰۸	۱۵/۵۸۴۴۱۵۶	۱۵۴
2	۲۹/۴۵۲۰۵۴۷۹	۳۰/۱۳۶۹۸۶۳	۲۰/۵۴۷۹۴۵۲	۱۹/۸۶۳۰۱۳۷	۱۴۶
3	۲۹/۶۰۵۲۶۳۱۶	۳۲/۲۳۶۸۴۲۱	۲۱/۰۵۲۶۳۱۶	۱۷/۱۰۵۲۶۳۲	۱۵۲
S. trutta	۲۷/۲۷۲۷۲۷۲۷	۳۳/۵۶۶۴۳۳۶	۲۳/۰۷۶۹۲۳۱	۱۶/۰۸۳۹۱۶۱	۱۴۳
O. mykiss	۲۷/۶۵۹۵۷۴۴۷	۳۲/۶۲۴۱۱۳۵	۲۳/۴۰۴۲۵۵۳	۱۶/۳۱۲۰۵۶۷	۱۴۱
میانگین	۲۹/۲۱۱۹۵۶۵۲	۳۲/۰۶۵۲۱۷۴	۲۱/۷۳۹۱۳۰۴	۱۶/۹۸۳۶۹۵۷	۱۴۷/۲

جدول ۴-نتایج آزمایش بی‌طرفی تاجیما

D	π	Θ	p_s	S	m
-۰/۸۹۷۷۰۳	۰/۰۷۴۰۲۶	۰/۰۸۴۱۵۶	۰/۱۷۵۳۲۵	۲۷	۵

اختصارات: m = تعداد دنباله‌ها ، n = تعداد کل سایتها ، S = تعداد محلهای تفکیک، ps = S/n، Θ = ps/a1، π = تنوع نوکلئوتیدی، D= آمار آزمون تاجیما



شکل ۵- دندوگرام مقایسه توالی‌های نمونه‌های موردبررسی براساس روش Clustal W و نرم‌افزار MEGA

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت اکولوژیک گونه‌ایی مثل ماهی آزاد دریای‌خزر که گونه ارزشمندی بعد از تاس‌ماهیان در این منطقه است، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. اثبات وجود گونه در مناطق مختلف و موردنظر می‌تواند برای مطالعه ردیابی الگوی مهاجرتی گونه مفید باشد. ماهی آزاد دریای‌خزر، به‌دلیل فشار صیادی زیاد و عوامل محیطی، جز گونه‌های درمعرض خطر انقراض قرار گرفته است. در سال‌های اخیر به‌علت تمایل بیشتر به آبزیان و مصرف بیشتر گونه‌های پرورشی و همچنین کمک به بازیابی ذخایر ماهیان اقدام به پرورش ماهی در قفس در دریای‌خزر شده است. یکی از اثرات و فرضیه‌هایی که در پرورش ماهی در قفس بر محیط دریایی محتمل است، فرار تصادفی گونه‌ها از قفس‌هاست. باتوجه به بررسی مطالعات انجام شده، احتمال فرار قزل‌آلا از قفس‌های پرورشی وجود دارد که می‌تواند اثرات زیادی بر اکوسیستم منطقه و آبزیان بگذارد. در مطالعه‌ای کوساک و همکاران (Cussac *et al.*, 2014)، ورود ماهی‌های قزل‌آلا در پاتاگونیا منجر به تأثیرات چشم‌گیری بر دریاچه‌های آن و همچنین تأثیر عمده بر فراوانی هر دو جمعیت ماهی قزل‌آلا بومی و معرفی شده داشته است. داچمن و همکاران

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

(Deutschmann *et al*., 2018) یک کاوشگر با دو برچسب خاص برای تشخیص eDNA قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta, L.*) طراحی کردند و از این کاوشگر برای توصیف سرنوشت eDNA رها شده از تأسیسات آبزی‌پروری در جریان کم کوهستان Wehebach، آلمان استفاده کردند. مشخص شد که کاوشگر مخصوص ماهی قزل‌آلا قهوه‌ای است، زیرا در استخرهایی که قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) قرار دارد مثبت نبود.. نتایج آنها نشان می‌دهد که آزاد شدن DNA از ماهی قزل‌آلا قهوه‌ای ممکن است در مرحله زندگی و/یا وابسته به سن باشد. در هر دو روش مورد استفاده ما در این مطالعه نمونه‌هایی بودند که باند مطلوبی ندادند یا کاملاً جوابی ندادند که می‌تواند به‌دلیل تخریب مولکول DNA و رقیق شدن آن در پیکره آبی و بر اثر اختلاط جریان آب و شرایط طبیعی محیطی از جمله اثر نور فرابنفش خورشید نیز باشد. نمونه شماره یک با نانوپارتیکل سیلیکا و دو نمونه دیگه با مگنت آمینه استخراج شده‌اند. در نهایت باتوجه به آزمون و خطاهای مختلف این دو پروتکل ارجحیت خاصی نسبت به یکدیگر ندارند. هدف ما فقط استخراج و بیان وجود گونه با استفاده از نمونه محیطی بود که حاصل شد. در محیط طبیعی کنترل شرایط محیطی امری سخت است و پیشامدهای غیرمترقبه غیرقابل اجتناب و محتمل است که همه این عوامل می‌تواند روی کیفیت و غلظت نمونه‌ها تأثیرگذار باشد.

این مطالعه برای اولین بار وجود یک گونه آبزی در حوضه جنوبی خزر را به روش eDNA مورد بررسی قرار داد. استخراج DNA از آب یک روش کارآمد و قابل اعتماد و همسو با محیط زیست می‌باشد که می‌تواند وجود گونه، مخصوصا گونه‌های نادر و کمیاب را بدون حضور ظاهری خود گونه در محیط آبی مشخص کند. استفاده از چنین روش-های غیرتهاجمی می‌تواند در بهبود کیفیت مدیریت منابع آبی و مطالعات روی گونه‌های موجود در پیکره آبی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. باتوجه به شاخص E-value که بسیار نزدیک به صفر به‌دست آمده است، مؤید اطمینان و صحت وجود گونه موردنظر ما و نزدیکی آنها به گونه‌های ثبت شده در بانک جهانی بوده است. شاخص توزیع شکل گاما با مقدار ۰/۵ نشان داد که نرخ جهش بین نمونه‌ها بالاست و این نشان-دهنده جدایی گونه‌ای بین نمونه‌ها است (ضرایب بزرگ‌تر از یک به‌عنوان ضریب ناهمگونی پایین به‌حساب می‌آیند). شاخص اختلاف در هر مکان برای همه جفت های دنباله‌ای نشان داده شده است. مقادیر بیشتر از صفر تفاوت‌های بزرگتر در سوگیری‌های ترکیب پایه را نسبت به انتظار براساس واگرایی تکاملی بین توالی‌ها و به‌طور تصادفی نشان می‌دهد (Kumar & Gadagkar, 2000 ; Kumar *et al*., 2018). همچنین نرخ کل transition/transversion (R) با استفاده از روش تامورا و همکاران (Tamura *et al*., 2013) انجام شد. در تخمین الگوی جانشینی در مطالعه نجارلشگری و همکاران (Najar Lashgari *et al*., 2013) بیشترین مقدار واژگونی ۱۷۰ و بیشترین مقدار جایگزینی ۹۰ در رودخانه چالوس بود. این مقدار در این مطالعه برای کل نمونه‌های صید شده از درای خزر به‌صورت کلی محاسبه شد که مقدار واژگونی ۲۳۲ و مقدار جایگزینی ۱۳۷ بود. میانگین درجه خویشاوندی در مطالعه ماهیان آزاد دریای‌خزر توسط نجارلشگری و همکاران (Najar Lashgari *et al*., 2013) بیشترین مقدار را برای رودخانه سردآبرود ۰/۳۴ به‌دست آوردند. این مقدار در مطالعه ما ۰/۹۹ به‌دست آمد.

بیشترین نسبت نوکلئوتید مشاهده شده از نمونه‌های استخراج شده مربوط به باز سیتوزین به میزان ۳۰/۱۳ در نمونه شماره سه و کمترین باز مربوط به باز گوانین به میزان ۱۵/۵۸ در نمونه شماره ۱بود. این میزان در مطالعه نجارلشگری و همکاران (Najar Lashgari *et al*., 2013) روی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد خزر برای بیشترین درصد مربوط به باز آدنین و کمترین درصد باز گوانین بود. نسبت‌های نرخ انتقال/واگرایی k_1 =۴/۴۴۵ (پورین) و k_2 =۷/۱۷۹ (پیریمیدین) بود. تخمین جهت انتقال/تغییر ۳/۵۷ (R) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل ۲ پارامتری کیمورا (Kimura, 1980) و بیشترین جایگزینی مربوط به باز A به G بود. مقدار آماره آزمون تاجیما (D Tajima's) با توجه به مطالعه ما منفی ۰/۸۰ به‌دست آمده است این درحالی است که کمترین مقدار در مطالعه نجارلشگری و همکاران (Najar Lashgari *et al*., 2013) برای ماهی آزادخزر در رودخانه سردآبرود مقدار منفی ۰/۵۰ بوده است. آزمون تاجیما (D Tajima's) به‌منظور شناسایی هرگونه انحراف ازفرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن محاسبه شد. در این مطالعه نشان داده شد که مقدار D منفی و غیرمعنی‌دار به‌دست آمده که ممکن است به‌دلیل اندک بودن نمونه‌های مورداستفاده در مطالعه باشد. همچنین D منفی نشان‌دهنده چندشکلی بیش از حد با فرکانس پایین نسبت به انتظار است ، که نشان‌دهنده افزایش اندازه جمعیت است (Tajima, 1989; Kumar *et al*., 2018; Nei & Kumar, 2000). میانگین تفاوت‌های جفتی و تعداد محل‌های تفکیک، هر کدام به گونه‌ای مقیاس‌بندی می‌شوند که انتظار می‌رود در جمعیتی با اندازه ثابت درحال تحول بی‌طرفانه یکسان باشند. هدف از آزمایش تاجیما (D Tajima's) این است که بین یک توالی DNA که به‌طور تصادفی درحال تکامل است (بیطرف) و یکی که تحت یک فرآیند غیرتصادفی درحال تکامل است، تمایز قائل شود. در کل جمعیت، فراوانی یک جهش خنثی به‌طور تصادفی از طریق رانش ژنتیکی در نوسان است. باتوجه به دندوگرام مقایسه‌ای توالی‌های نمونه‌های مورد بررسی براساس روش Clustal W (Sneath *et al*., 1973; Felsenstein, 1985; Kumar *et al*., 2018)، قرار گرفتن نمونه شماره ۱ در کلید قزل‌آلا رنگین‌کمان و همچنین نمونه شماره ۲ و ۳ در کلید ماهی آزاد دریای‌خزر ، نشان‌دهنده این است که گونه‌ها به‌درستی با روش استفاده شده در مطالعه جداشده و حضورشون در پیکره آبی توسط DNA محیطی تثبیت‌شده است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد این مطالعه برای اولین بار وجود یک گونه آبزی در حوضه جنوبی خزر را به روش eDNA موردبررسی قرار داد. استخراج DNA از آب یک روش کارآمد و قابل اعتماد و همسو با محیط زیست می‌باشد که می‌تواند وجود گونه، مخصوصاً گونه‌های نادر و کمیاب را بدون حضور ظاهری خود گونه در محیط آبی مشخص کند. استفاده از چنین روش‌های غیرتهاجمی می‌تواند در بهبود کیفیت مدیریت منابع آبی و مطالعات روی گونه‌های

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

موجود در پیکره آبی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. همچنین ردیابی و پراکنش این گونه‌ها می‌تواند در ارزیابی ذخایر گونه‌ای، مدیریت منابع، آینده‌نگری و برآورد سودآوری شیلاتی گونه‌ها تأثیر به‌سزایی داشته باشد و در کاهش هزینه‌های صیادی اثر گذار باشد. باتوجه به شاخص E-value تعریف آن به‌صورت ساده این است که چقدر احتمال دارد که توالی جفت شده با توالی الگوی ما به‌طور تصادفی جفت شده باشد و هیچ رابطه معنی‌داری بین آنها وجود نداشته باشد. مقدار این شاخص که بسیار نزدیک به صفر به‌دست آمده است مؤید اطمینان و صحت وجود گونه موردنظر ما و نزدیکی آن‌ها به گونه‌های ثبت شده در بانک جهانی بوده است. شاخص توزیع شکل گاما با مقدار ۰/۵ نشان داد که نرخ جهش بین نمونه‌ها بالاست و این نشان‌دهنده جدایی گونه‌ای بین نمونه‌ها است (ضرایب بزرگ‌تر از یک به‌عنوان ضریب ناهمگونی پایین به‌حساب می‌آیند). بیشترین نسبت نوکلئوتید مشاهده شده از نمونه‌های استخراج شده مربوط به باز سیتوزین به میزان ۳۰/۱۳ در نمونه شماره ۳ و کمترین باز مربوط به باز گوانین به میزان ۱۵/۵۸ در نمونه شماره ۱ بود. نسبت‌های نرخ انتقال/واگرایی k_1 =۴/۴۴۵ (پورین) و k_2=۷/۱۷۹ (پیریمیدین) بود. تخمین جهت انتقال/تغییر ۳/۵۷ (R) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل ۲ پارامتری کیمورا (Kimura, 1980) و بیشترین جایگزینی مربوط به باز A به G بود. مقدار آماره آزمون تاجیما باتوجه به مطالعه ما منفی ۰/۸۰ به‌دست آمده است. تست تاجیما به منظور شناسایی هرگونه انحراف ازفرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن محاسبه شد. در این مطالعه نشان داده شد که مقدار D منفی و غیرمعنیدار به‌دست آمده که ممکن است به‌دلیل اندک بودن نمونه‌های مورد استفاده در مطالعه باشد. در این مطالعه ۱۵ نمونه آب از مناطق مختلف حوضه جنوبی دریای‌خزر گرفته شد. برای جداسازی DNA از آب، نانوذرات مغناطیسی با پوشش سیلیس اصلاح شده با آمین استفاده شد. در این مطالعه برای اولین بار از روش مگنت‌های آمینه برای جداسازی DNA محیطی از یک نمونه آب استفاده شد. DNA سه نمونه آب از خروجی آب مرکز تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در رودخانه تجن ساری، نمونه آب از قفس ماهیان آزاد در نوشهر و نمونه آب از اطراف قفس پرورشی ماهی آزاد خزر در تنکابن به‌درستی استخراج شد و موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نمونه شماره ۱ در کلید قزل‌آلا رنگین‌کمان و همچنین نمونه شماره ۲ و ۳ در کلید ماهی آزاد دریای‌خزر قرار گرفتند، که نشان‌دهنده این است که گونه‌ها به‌درستی با نانوذرات مغناطیسی سلیکاته آمینه جداشده اند و حضورشان در پیکره آبی توسط DNA محیطی تثبیت‌شده است.

باتوجه به جواب دادن سه نمونه آب می‌توان از آن به‌عنوان یک روش تازه و جایگزین برای مطالعات شناسایی و اکولوژیکی گونه‌ای استفاده کرد. هرچند در گام‌های بعدی نیاز به بهسازی روش استفاده شده و رسیدن به یک روش قوی‌تر و قابل اتکا احساس می‌شود، ولی به عنوان قدم اول در مطالعه محیطی بدون استفاده از خود گونه و فقط با اثری که در محیط طبیعی می‌گذارد، این روش یک پنجره‌ای تازه رو به مطالعات اکولوژیکی گشوده است و ادامه و تکمیل آن در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

پست الکترونیک نویسندگان

سیده سارا جعفری‌کناری: ss.jk.sara@gmail.com
رسول قربانی: rasulghorbani@gmail.com
حمیدرضا رضایی: hamid.r.rezaei@gmail.com
رحمت‌اله ندافی: Rahmat.Naddafi@slu.se
حدیثه کشیری: hadiskashiri@gmail.com
فرانسوآ پومپنون: francois.pompanon@univ-grenoble-alpes.fr

REFERENCES

Ashtari P., Xiaoxiao H., Wang K., Gong P. 2005.An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles.Talanta, 67(3):548-554.9140.

Dejean T., Valentini A., Duparc A., Pellier-Cuit S., Pompanon F., Taberlet P., Miaud C. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS ONE, 6, e23398.

Deutschmann B., Müller AK., Hollert H., Brinkmann M. 2019. Assessing the fate of brown trout (*Salmo trutta*) environmental DNA in a natural stream using a sensitive and specific dual-labelled probe, Science of The Total Environment, 655:321-327.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39:783-791.

Ficetola G.F., Miaud C., Pompanon F., Taberlet P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters, 4: 423-425.

Goldberg C.S., Pilliod D.S., Arkle R.S., Waits L.P. 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. PLoS ONE, 6, e22746.

Janatti A., Norozi M., Nazemi A. 2013. Investigation of genetic structure of common carp (Cyprinus carpio) population in Anzali wetland and Gorganrood estuary by molecular microsatellite method. Journal of Aquaculture Development, 7 (3): 10-1.

Jerde C.L., Mahon A.R., Chadderton W.L., Lodge D.M. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. Conservation Letters, 4: 150-157.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35:1547-1549.

Minamoto T., Yamanaka H., Takahara T., Honjo M.N., Kawabata Z.I. 2012.Surveillance of fish species composition using environmental DNA. Limnology, 13: 193-197.

Najar Lashgari S., Rezvani gilkolaee S., Miar A., Mohamadalikhani M. 2013. Study of genetic diversity of Caspian salmon population *Salmo trutta caspius* migrating to Chalous river using sequencing method, the first national conference on passive defense in marine sciences, Bandar Abbas, Iran.

Nelson J.S. 2006. Fishes of the World. New York: Fourth Edition. USA. 622p.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

Nei M., Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, NY, USA.

Pilliod D.S., Goldberg C.S., Arkle R.S., Waits L.P., Richardson J. 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 70: 1123-1130.

Pilliod D.S., Goldberg C.S., Arkle R.S., Waits L.P. 2014. Factors influencing detection of eDNA from a streamdwelling amphibian. Molecular Ecology Resources, 14: 109-116.

Sambrook J., Russell D. 1990. Molecular cloning. Laboratory Manual CSHL Press, 2344p.

Sattari M., Shahsavani D., Shafiei Sh. 2003. Fisheries 2 (systematic). Haghshenas Publications. Tehran, Iran. (In perisan).

Sneath P.H.A., Sokal R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, USA.

Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics, 123:585-595.

Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z.I. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS ONE, 7, e35868.

Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10:512-526.

Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101:11030-11035.

Thomsen P.F., Kielgast J., Iversen L.L., Moller P.R., Rasmussen M., Willerslev E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE, 7, e41732.

Thomsen P.F., Kielgast J., Iversen L.L., Wiuf C., Rasmussen M., Gilbert M.T.P., Orlando L., Willerslev E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 21: 2565-2573.

Wilcox T.M., McKelvey K.S., Young M.K., Jane S.F., Lowe W.H., Whiteley A.R., Schwartz M.K. 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. PLoS ONE, 8, e59520.

نحوه استناد به این مقاله:

جعفری‌کناری س.، قربانی ر.، رضایی ح.ر.، ندافی ر.، کشیری ح.، پومپنون ف. ۱۴۰۱. شناسایی ماهی‌آزاد دریای‌خزر *Salmo caspius* (Kessler, 1877) و قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) با استخراج DNA از آب (eDNA). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی،(۲)۱۰: ۱۸-۹ .
https://doi.org/10.22034/jair.10.2.11

Jafari Kenari S., Ghorbani R., Rezaei H., Naddafi R., Kashiri H., Pompanon F. 2022. Identification Caspian salmon *Salmo caspius* (Kessler, 1877) and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) by extracting DNA from water (eDNA). Journal of Applied Ichthyological Research, 10(2): 9-18. https://doi.org/10.22034/jair.10.2.11

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]

Identification Caspian salmon *Salmo caspius* (Kessler, 1877) and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) by extracting DNA from water (eDNA)

Jafari Kenari S[1]., Ghorbani R[2*]., Rezaei H[3]., Naddafi R[4]., Kashiri H[5]., Pompenon F[6].

[1] PhD student, Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2] Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[3] Prof., Dept. of Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[4] faculty members of Uppsala Agricultural University, Sweden.
[5] Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[6] Prof., of the University of Grenoble, France

Type:

Original Research Paper

https://doi.org/10.22034/jair.10.2.11

Paper History:

Received: 10-08-2021
Accepted: 30-08- 2021

Corresponding author:

Ghorbani R. Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: rasulghorbani@gmail.com

Abstract

Proof of species existence in different regions can be useful for studying the migration pattern of the species. The use of non-invasive methods such as eDNA can be very effective in tracking and dispersing and improving the management of water resources and species. In this study, 15 water samples were taken from different areas of the southern Caspian Sea basin. Amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles were used to separate DNA from water. In this study, for the first time, the amino magnet method was used to separate environmental DNA from a water sample. DNA of three water samples were properly extracted ,from the water output of Oncorhynchus mykiss farm in Tajan river in Sari, water samples from salmon cages in Nowshahr and water samples from around Caspian salmon farming cages in Tonekabon were properly examined. The results showed that sample No. 1 was located in the rainbow trout clad and samples No. 2 and 3 were located in the Caspian Sea salmon clad, indicating that the species were properly isolated with amino silicate magnetic nanoparticles and their presence in the aqueous body was confirmed by environmental DNA.

Keywords: Magnetic nanoparticles, environmental DNA, Species proof, Southern Caspian Basin

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-04-20]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.11]