



الگوی تنوع آلی نشانگرهای پلی‌زومی SSR در مطالعه ژنتیک جمعیت‌های تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

دریای خزر

سجاد نظری^{۱*}، محمد پورکاظمی^۲، مجیدرضا خوش‌خلق^۳

^۱مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

^۲مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران

^۳دانشیار، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

چکیده

ساختار ژنتیک تاس‌ماهی ایرانی دریای خزر با استفاده از هشت مارکرهای تتراپلوئیدی میکروستلاپت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۹۵ نمونه از مولدین تاس‌ماهی ایرانی از مناطق مختلف دریای خزر جمع‌آوری شد. DNA ژنومی با استفاده از روش فنل کلروفورم استخراج و کمیت و کیفیت آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۸ جفت پرایمر پلی‌مورفیک میکروستلاپت صورت گرفت. در این بررسی حداقل ۸ در ناحیه ۲ و حداکثر ۱۴ آلل رودخانه سفیدرود مشاهده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب بین ۰/۶۵۷ و بین ۰/۷۸۴ بود. مشخص شد که نمونه‌های رودخانه سفیدرود اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های سواحل غربی و شرقی حوضه جنوبی خزر دارند ($p \geq 0/001$) و این اختلاف در مورد نواحی شیلاتی سواحل شرقی با سواحل غربی حوضه جنوبی خزر نیز دیده شد. درخت فیلوژنی براساس معیار ژنتیکی neighbor-joining مشخص گردید که نمونه‌های تاس‌ماهی ایرانی جمع‌آوری شده از سفیدرود در یک کلاستر و سایر نمونه‌ها در کلاستر مجزا قرار دارند با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اعلام نمود که در حوضه جنوبی دریای خزر جمعیت‌های مستقل تاس‌ماهی ایرانی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی:

میکروستلاپت، تاس‌ماهی ایرانی، ژنتیک جمعیت، دریای خزر

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

DOI: 10.22034/jair.8.5.5

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۰۰/۰۹/۲۴

پذیرش: ۰۰/۱۱/۱۰

نویسنده مسئول مکاتبه:

سجاد نظری، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

ایمیل: sajadnazari13@gmail.com

۱ | مقدمه

ماهیان خاویاری از ابتدایی‌ترین و قدیمی‌ترین ماهیان غضروفی-استخوانی‌اند که حدود ۲۵۰ میلیون سال پیش تکوین یافته‌اند (Ludwig, 2001). این رده شامل ۲۷ گونه می‌باشد (Fain et al., 2000). از ۲۷۰۰۰ گونه ماهی که در آب‌های سراسر جهان شناسایی شده است ۲۷ گونه ماهیان خاویاری از گران‌بهارترین آنها به حساب می‌آیند که زیستگاه آنها منحصراً در نیم‌کره شمالی می‌باشد. تاس-ماهیان از رده ماهیان استخوانی (Osteichthyes) و فوق‌راسته ماهیان غضروفی-استخوانی (Chondostei) و از راسته تاس‌ماهی شکلان (Acipenseriformes) و خانواده تاس‌ماهیان (Acipenseridae) و متعلق به دو جنس *Huso* و *Acipenser* می‌باشند. تاس‌ماهیان موجود در دریای خزر، جنس *Huso* گونه فیل‌ماهی و جنس *Acipenser* گونه تاس‌ماهی ایرانی (قره برون)، تاس‌ماهی روسی (چالباش)، ازون برون (دراکول)، شیپ و استرلیاد را شامل می‌شوند. شش گونه مذکور که در آب‌های خزر و رودخانه‌های منتهی به آن وجود دارند در مجموع ۹۰ درصد از کل ذخایر ماهیان خاویاری جهان را تشکیل می‌دهند

(Abdolhay et al., 2006). با قرار گرفتن نام تمام این ماهیان در لیست CITES برنامه مدیریتی حفاظتی رسیدگی به صید و کنترل تجارت بین‌المللی این ماهیان باارزش از طریق کنوانسیون مزبور در ۱۶۷ کشور عضو اجرا می‌شود. لذا به منظور اعمال مدیریت شیلاتی به جهت حداکثر برداشت مجاز و پایدار از ذخایر این ماهیان لازم است اقدامات مؤثری برای حفظ و بازسازی ذخایر تاس‌ماهیان انجام شود که از آن جمله می‌توان اشاره‌ای به تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری نمود و به همین دلیل حدود ۳۰ مرکز تکثیر مصنوعی و پرورش انواع تاس‌ماهیان در کشورهای حاشیه دریای خزر وجود دارد که هر ساله حدود ۹۰ میلیون قطعه انواع بچه‌ماهیان خاویاری را از مولدین این ماهیان تکثیر کرده و جهت بازسازی و حفظ ذخایر به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر رهاسازی می‌نمایند که از این طریق حدود ۹۰ درصد از ذخایر کنونی فیل‌ماهی و بیش از ۸۰ درصد از ذخایر تاس‌ماهی روسی و ایرانی و ازون برون دریای خزر محصول تکثیر مصنوعی و پرورش بچه تاس‌ماهیان می‌باشد (Pourkazemi, 1996)

از ژنوم تمایل دارند که به این "مناطق لکه‌های داغ ریزماهوره‌ای (SSR hot spots) گفته می‌شود. فراوانی ریزماهوره‌ها در نواحی مجاور ژن بیشتر است که نقش اساسی در تنظیم آنها دارند (Jovne and Lagonda, 1996; Katti et al., 2001; Ellegren, 2000).

بررسی جمعیتی تاس‌ماهی ایرانی جنوب دریای خزر با استفاده از روش‌های مختلف انجام پذیرفته است (Pourkazemi, 1999, Khoshkolgh et al., 2011; Nazari et al., 2012, 2020) که هدف این تحقیق بررسی امکان شناسایی و مقایسه ساختار ژنتیک جمعیت‌های تاس‌ماهی ایرانی در سواحل جنوبی شامل رودخانه سفیدرود و نواحی پنج‌گانه شیلاتی در سواحل جنوبی دریای خزر با استفاده از پرایمرهای پلی پلوئیدی مایکروساتلایت می‌باشد.

۲ | مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در مناطق جنوبی دریای خزر توسط گروه تحقیقاتی گشت ارزیابی ذخایر مؤسسه تحقیقات تاس‌ماهیان دریای خزر و با همکاری کشتی‌های تحقیقاتی ایرانی (شناور سی‌سرا ۲ و کشتی گیلان با قدرت ۱۰۰۰ اسب بخار) انجام پذیرفت. بدین منظور طی سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۱ تعداد ۱۹۵ نمونه از مولدین تاس‌ماهی ایرانی از مناطق مختلف نمونه‌برداری شامل: نواحی ۵ گانه شیلاتی و رودخانه سفیدرود جمع‌آوری و سپس ۲ گرم از باله دمی آنها در الکل اتیلیک ۹۶٪ قرار داده و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) انتقال داده شد. DNA ژنومی با استفاده از روش فنل کلوپورم استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد.

هدف اصلی ژنتیک جمعیت است. تغییرات ژنتیکی در گونه‌ها و جمعیت‌ها آنها را قادر می‌سازد تا بتوانند نسبت به تغییرات محیط‌زیست سازگار شوند. تغییرات ژنتیکی جدید در جمعیت‌ها ممکن است در اثر جهش‌های خودبه‌خودی و یا مهاجرت از جمعیتی که دارای افرادی با ذخایر ژنتیکی متفاوت هستند اتفاق بیفتد. تعداد و فراوانی نسبی آلل‌ها در یک جمعیت یکی از مهم‌ترین محاسبات مربوط به تنوع ژنتیکی است (Carvalho and Pitcher, 1994; Ciftci and Okumus, 2002). یکی از مهم‌ترین نیازها در مدیریت شیلاتی شناخت واحدهای تولیدکننده یا ذخایر گونه‌ها می‌باشد. نداشتن آگاهی کافی از ساختار ذخیره می‌تواند به برداشت نادرست (بیشتر یا کمتر) از آن منجر گردد (Ryman and Stahl, 1980; Beacham et al., 2002). از مشکلات اساسی برای مدیریت شیلاتی عدم تعریف دقیق از جمعیت‌های متعلق به یک گونه و ارتباط آن با مفهوم ذخیره است (Carvalho and Hauser, 1995).

ریزماهوره‌ها توالی‌های کوتاه نوکلئوتیدی (معمولاً ۱ تا ۶ جفت باز) هستند که پشت سر هم تکرار می‌شوند. آلل‌های ریزماهوره به‌وسیله تفاوت در تعداد تکرارها مشخص می‌شوند. جایگاه‌های ریزماهوره تحت نام‌های مختلفی معرفی می‌شوند. اسامی دیگر نشانگر ریزماهوره عبارت‌اند از توالی‌های تکراری کوتاه پشت سرهم (STR, Short tandem repeats)، توالی مکان‌های نشان‌دار (STM_s, Sequence tagged microsatellite) و چندشکلی طولی توالی ساده (SSLP Simple sequence length polymorphism) که در مقالات یاد شده‌اند (Robinson et al., 2004) تعداد ریزماهوره‌ها به اندازه ژنوم موجود بستگی دارد بنابراین تعداد ریزماهوره‌ها در مهره‌داران فراوان‌تر از سایر موجودات است (Katti et al., 2001). پراکندگی ریزماهوره‌ها در ژنوم یکسان نیست و اغلب آنها به تجمع گروهی در یک ناحیه خاص

جدول ۱- تعداد و محل جمع‌آوری نمونه‌های تاس‌ماهی ایرانی در مناطق مختلف دریای خزر جهت آنالیز میکروستلایت

تعداد نمونه‌ها	منطقه	استان
۴۵	ناحیه ۱ (آستارا - بندرانزلی)	گیلان
۳۲	رودخانه سفیدرود	
۳۶	ناحیه ۲	
۲۰	ناحیه ۳ (نوشهر - ساری)	مازندران
۲۴	ناحیه ۵ (چابکسر - نوشهر)	
۳۸	ناحیه ۴ (میانکاله - بندر ترکمن)	گلستان
۱۹۵	مجموع	



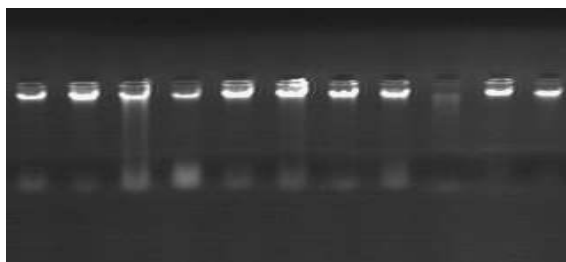
شکل ۱- نقشه مناطق نمونه‌برداری تاس‌ماهی ایرانی

جایگاه‌های میکروساتلایتی، برنامه Arliquin و Phylip محاسبه گردید. برای تعیین رابطه تکاملی از معیارهای (Nei, 1972, 1978) استفاده و درخت تکاملی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ترسیم گردید.

۳ | نتایج

کمیت و کیفیت DNA به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد:

الف - روش الکتروفوزی: بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNAهای استخراج شده از باله تاس‌ماهی ایرانی به روش فنل - کلروفوم از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشند. باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند و این بیانگر آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی، فنلی و آلودگی به RNA می‌باشد (تصویر ۲).



تصویر ۲- کیفیت باندهای DNA تاس‌ماهی ایرانی بر روی ژل آگارز

۱۵۰-۲۵۰ ng/1 بود که پس از رقیق‌سازی و همسان‌سازی غلظت DNA، در غلظت ۱۰۰ ng/1 مورد استفاده قرار گرفت. نتایج PCR: پس از تغییر شرایط PCR بهترین شرایط به دست آمده از نظر غلظت مواد و شرایط برنامه ترمال سایکلر به نحوی که حداقل باند اضافی را دارا باشد و باندهای اصلی دارای وضوح کامل باشند طبق شرایط جدول ۲ به دست آمد.

بررسی کمی DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری: برای تعیین کمیت DNA نمونه‌ها پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل ND1000) با آب مقطر استریل، ۲۰ میکرولیتر DNA ژنومی به‌وسیله آب مقطر به حجم ۳۰۰ μL رسانده شد، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/280 به‌وسیله دستگاه اندازه‌گیری و ثبت گردید.

برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد که شامل مراحل زیر است را انجام داده و سپس باتوجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط گردید. در مرحله اول با مشخص نمودن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) و باندهای اضافی غلظت مناسب MgCl₂، DNA ژنومی، آغازگر و dNTPs به کار گرفته شد و پس از اتمام کار نمونه‌ها به یخچال منتقل گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، تعداد آلل‌های واقعی و تعداد آلل‌های مؤثر (Effective allele) در

ب - اسپکتروفتومتری DNA: میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm به‌وسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌عنوان شاخص کمیت می‌باشد. نمونه‌هایی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه‌های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی براساس فرمول محاسبه شده در کلیه نمونه‌ها بین

جدول ۲- جایگاه‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز میکروساتلایت تاس‌ماهی ایرانی

Locus	اندازه آلل	غلظت مواد	برنامه PCR	Repeat motif	Primer source (s)
<i>AfuG 19</i>	126-198	1. 3mM MgCl ₂ , 150μM dNTPs, 10pmol each primer and 1. 2UTaq DNApolymeraz	94/3min[94/30sec, 60/25sec and 72/30sec] ³⁰ ,72/5min	(TTG) ₉	May et al., 1997
<i>AfuG 34</i>	138-180	1mM MgCl ₂ , 200 μM dNTPs, 20pmol each primer and 1UTaq DNApolymerase	94/3min[94/30sec, 51/25sec and 72/30sec] ³⁰ ,72/5min	(GTT) ₁₀	May et al., 1997
<i>AfuG 39</i>	78-216	1. 5mM MgCl ₂ , 150μM dNTPs, 15pmol each primer and 0. 75 UTaq DNApolymerase	94/3min[94/30sec, 57/25sec and 72/30sec] ³⁰ ,72/5min	GTT ₁₀	May et al., 1997
<i>AfuG 68</i>	184-260	1mM MgCl ₂ , 200 μM dNTPs, 20pmol each primer and 1UTaq DNApolymerase	94/3min[94/30sec, 60/25sec and 72/30sec] ³⁰ ,72/5min	GATA ₁₃	May et al., 1997

- ادامه جدول

	AfuG 19			AfuG 34			AfuG 39			AfuG 68		
	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He	A
منطقه ۱	0.62	0.63	9	0.61	0.74	6	0.79	0.86	0	0.67	0.86	8
منطقه ۲	0.51	0.65	8	0.65	0.67	5	0.70	0.74	1	0.60	0.83	9
سفیدرود	0.79	0.87	16	0.76	0.78	11	0.84	0.93	4	0.74	0.84	13
منطقه ۵	0.54	0.56	7	0.55	0.61	6	0.64	0.71	4	0.50	0.86	9
منطقه ۳	0.78	0.88	10	0.58	0.77	10	0.81	0.82	6	0.79	0.89	11
منطقه ۴	0.52	0.78	9	0.41	0.84	6	0.76	0.77	6	0.62	0.88	11

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

در این بررسی بیشترین F_{st} محاسبه شده بین گروه‌های نمونه ناحیه ۱ (گیلان) و سفیدرود (به میزان ۰/۳۲) و کمترین مقدار آن بین نمونه‌های ناحیه ۴ (گلستان) و ناحیه ۳ (مازندران) (به میزان ۰/۱۱) به‌دست آمد. میزان F_{st} اختلاف معنی‌داری بین جمعیت تاس‌ماهی ایرانی در منطقه ترکمنستان با کلیه مناطق به‌غیر از ناحیه ۳ (مازندران) نشان می‌دهد و جمعیت تاس‌ماهی ایرانی رودخانه سفیدرود اختلاف معنی‌داری را با نمونه‌های خزر شمالی و نواحی ۱ و ۲ و ۴ و ۵ شیلاتی نشان نمی‌دهد که در نتیجه یک جمعیت مستقل تاس‌ماهی ایرانی شامل جمعیت تاس‌ماهی ایرانی رودخانه سفیدرود قابل تشخیص می‌باشد. گرچه در مطالعات ژنتیک جمعیت، ارزیابی فیلوژنی شاخص مناسبی برای تمایز جمعیت‌ها نیست ولی وضعیت نمودارها و کلاستر می‌تواند تفکیک مناطق نمونه‌برداری را بهتر نشان دهد. در این بررسی با استفاده از معیارهای (Nei, 1972, 1978) درخت فیلوژنی ترسیم شد. در مورد تاس‌ماهی ایرانی براساس معیار (Nei, 1972) نمونه‌های سفیدرود در یک کلاستر و سایر نمونه‌ها در کلاستر دیگر قرار دارد.

باتوجه به نتایج حاصله می‌توان عنوان نمود نمونه‌های تاس‌ماهی موردبررسی از تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردارند و میزان هتروزیگو-سیتی بالا مؤید این مطلب بوده است. تصمیم‌گیری در مورد اینکه کدام نژادها باید حفظ شوند، بایستی براساس ملاک‌های موردنظر و با در نظر گرفتن کاربرد فعلی و منظور نمودن حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی در مخزن ژنی هر گونه صورت گیرد. این امر برای آن است که در توسعه پایدار سیستم‌های تولیدی برای نیازهای پیش‌بینی نشده آتی منظور شوند. (Templeton, 2004) با حفظ نمونه‌هایی از تمامی نژادهای یک گونه که دارای بیشترین تفاوت ژنتیکی می‌باشند، می‌توان حداکثر تنوع ژنتیکی را حفظ نمود. این نمونه‌ها نژادهایی را شامل می‌گردند که دارای آلل‌ها یا ترکیبات آللی منحصر به فرد می‌باشند. شرح کامل تفاوت ژنتیکی بین هر نژادی امکان‌پذیر نیست ولی معیارهای فاصله ژنتیکی بهترین شرح در دسترس برای بیان تفاوت ژنتیکی آنها می‌باشند. کاهش در ذخایر ژنتیکی جمعیت‌های ماهیان یکی از مشکلات مهم آبی‌پروری محسوب می‌شود و مطالعات تنوع ژنتیکی در زمینه-های مختلف به‌خصوص اصلاح نژاد می‌تواند به‌کار گرفته شود. امروزه تنوع ژنتیکی بسیاری از جوامع ماهیان دچار تغییر شده و از طرف دیگر

فعالیت‌های انسانی تا حدی ساختار جمعیت‌ها را تغییر می‌دهند که حتی از طریق افزایش تکثیر مصنوعی سبب یکسان سازی ژنتیکی می‌شوند (Ferguson et al., 1995; Zhao et al., 2005). امروزه کاربرد نشانگرهای مولکولی منجر به پیشرفت سریع در مطالعات مربوط به تشخیص تنوع ژنتیکی و آمیزش درون گونه‌ای، تعیین والدین، تشخیص گونه و نژادها و بازسازی نقشه‌های دقیق خویشاوندی برای گونه‌های آبزیان شده است (Hansen et al., 2000; Liu and Cordes, 2004). در سال‌های اخیر، استفاده از DNA هسته کاربرد وسیعی برای بیولوژی جمعیت پیدا کرده است. از این رو برای دستیابی به یک نتیجه بهتر و دقیق‌تر در مطالعات ژنتیک جمعیت‌ها، استفاده از لوکوس‌های DNA هسته‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است (Bentzen et al., 1991; Rezvani Gilkolaei, 2000; Chistiakov et al., 2006). میکروستاپل‌ها به‌دلیل داشتن سطوح بالای پلی‌مورفیسم، اندازه نسبتاً کوچک و روش‌های تشخیصی سریع به‌طور گسترده‌ای برای مطالعه اختلافات ژنتیکی بین جمعیت‌های نزدیک به هم (Norris et al., 2001; Gerlach et al., 1999) استفاده می‌شوند. تشخیص ذخایر ژنتیکی، انتخاب مولدین، بازسازی نقشه‌های خویشاوندی متراکم، تعیین نقشه ژنی صفات مهم اقتصادی جهت استفاده از آنها در برنامه‌های تولیدمثلی به کار می‌روند (Cross and King, 1983; Zane et al., 2002; Chistiakov et al., 2006). در این بررسی هشت پرایمر میکرو-ستاپل به کار برده شد که همه آنها پلی مورفیک از خود نشان دادند. باتوجه به نتایج حاصل از بررسی حاضر می‌توان ادعان داشت که در اغلب جایگاه‌ها انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان می‌دهند. انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را می‌توان به آمیزش‌های خویشاندی در بین نمونه‌ها، تعداد کم نمونه‌ها و خطای نمونه‌برداری (نمونه‌برداری از افراد خویشاند) نسبت داد (Silverstein et al., 2004; Zhao et al., 2009; Pujolar et al., 2005). و باتوجه به نبود ثبت شجره ماهیان مطالعات بیشتری را بایستی در آینده در دستور کار قرار داد. معمولاً در یک جامعه محدود افراد خویشاوند باهم آمیزش داشته و باعث از دست رفتن تنوع و کاهش سازگاری و شایستگی می‌شود.

به‌نظر می‌رسد جمعیت‌های مورد استفاده در این بررسی تنوع مناسبی داشته است و بنابراین نماینده مناسبی برای معرفی به یک برنامه اصلاح نژادی هستند. این جمعیت‌ها این قابلیت را دارند که

- Kincaid H. 1980. Fish Breeding Manual. Kearneysville: U.S. Fish and Wildlife Service National Fisheries Center.
- Liu Z.J., Cordes J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Moghim M., Heist E.J., Tan S.G., Pourkazemi M., Siraj S., Panandam S., Pourgholam J.M., Kor R., Laloie D., Taghavi M.J. 2012. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin, 1897) and cross-species amplification in four commercial sturgeons from the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11 (3): 548-558.
- Nazari S., Pourkazemi M., Khoshkholgh M.R. 2020. Analysis of the genetic structure of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) populations: Comparison of control region sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19 (6) 3201-3220.
- Nazari S., Pourkazemi M., Koshkholgh M.R., Azizzadeh L. 2013. Population structure and variation in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin 1897) from the Caspian Sea as determined from mitochondrial DNA sequences of the control region. *Progress in Biological Science*, 3: 67-80.
- Pourkazemi M. 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph. D. thesis. University of Wales, Swansea, UK.
- Pourkazemi M. 2006. Caspian Sea sturgeon Conservation and Fisheries: Past present and Future. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (Supplement 1): 12-16.
- Pourkazemi M., Nazari S., Khoshkholgh M.R., Azizzadeh L. 2012. Genetic Relationships among Populations of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in the south Caspian Sea Detected by Mitochondrial DNA-Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 10 (2): 215-226.
- Pourkazemi M., Skibinski D.O.F., Beardmore J.A. 1999. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 23-28.
- Robinson A.J., Love C.G., Battery J., Barker G., Edward P. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Application Notes*, 20: 1475-1476.
- Ryman N., Stahl G. 1980. Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 82-87.
- Simon R.C., McIntyre J.D., Hemmingsen R.A. 1986. Family size and effective population size in a hatchery stock of coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 2434-2442.
- Templeton N.S. 2004. Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies. Marcel Dekker, New York.
- Vecsei P., Artyukhin E. 2001. Threatened fishes of the world: *Acipenser persicus* Borodin, 1897 (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes*, 61:160. DOI: 10.1023/A: 1011046303819
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

به‌عنوان ذخیره ژنتیک مناسب استفاده شود و تقریباً از نظر ژنتیکی متفاوت هستند. هر چند در بررسی‌های آینده نیازمند است تا با استفاده از لوکوس‌های بیشتر که در سال‌های اخیر از تاس‌ماهی ایرانی معرفی شده‌اند، نمونه‌های مراکز پرورشی مختلف کشور جهت دستیابی به نتایج جامع‌تر نیز مورد مطالعه قرار گیرند.

پست الکترونیکی نویسنده:

Sajadnazari13@gmail.com

سجاد نظری:

REFERENCES

- Abdolhay H.A., Baradaran Tahori H. 2006. Fingerling production and Release for Stock Enhancement of Sturgeon in the Southern Caspian Sea: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (1): 125-131.
- Beacham T.D., McIntosh B., Macconnachie C. 2002. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Columbia. *Journal of Fish Biology*, 61: 1021-1032.
- Bentzen P., Harris A.S., Wright J.M. 1991. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprints of important aquaculture species of salmonids and tilapia. In Burke T., Dolf G. (Eds), *DNA fingerprinting Approaches and Application*. Basel, Switzerland. pp: 243-262.
- Busack C., Halliburton R., Gall G. 1979. Electrophoretic variation and differentiation in four strains of domesticated trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 21: 81-94.
- Carvalho G.R., Hauser L. 1995. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Carvalho G.R. and Pitcher T.J. (Eds), *Molecular Genetics in Fisheries*, London: Chapman & Hall, UK. pp: 55-80.
- Chistiakov D.A., Helleman B., Volckaert F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1-29.
- Ciftci Y., Okumus I. 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2: 145-155.
- Hansen M., Nielsen E., Ruzzante D., Bouza C., Mensberg K. 2000. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta L.*) using microsatellite DNA markers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 2130-2139.
- Jug T., Berrebi P., Snoj A. 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout population as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, 123: 381-388.
- Katti M.V., Rängeker R.K., Gupa V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeat in Eukaryotic genome sequence. *Molecular Biology*, 18: 1161-1167.
- Khoshkholgh M., Pourkazemi M., Nazari S., Azizzadeh L. 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequence analysis. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 9: 27-36.

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

نحوه استناد به این مقاله:

نظری س.، پورکاظمی م.، خوش‌خلق م.ر. الگوی تنوع آلی نشانگرهای پلی‌زومی SSR در مطالعه ژنتیک جمعیت‌های تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) دریای خزر. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۳۹۹. ۴۰-۳۴: ۸(۵).

Nazari s., Pourkazemi M., Khoshkholgh M. Patterns of allelic variation of polysomic SSR markers in population genetic assessment of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) in Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyological Research*, University of Gonbad Kavous. 2021, 8(5): 34-40.

Patterns of allelic variation of polysomic SSR markers in population genetic assessment of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) in Caspian Sea

Nazari S^{1*}, Pourkazemi M², Khoshkholgh M³.

¹Shahid Motahary Cold-water Fishes Genetic and Breeding Research Center, IFSRI, AREEO, Yasouj, Iran

²Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

³Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowemeh Sara, Iran

Type:

Original Research Paper

DOI: 10.22034/jair.8.5.5

Paper History:

Received: 15-12-2021

Accepted: 30-01-2022

Corresponding author:

Nazari S. Shahid Motahary Cold-water Fishes Genetic and Breeding Research Center, IFSRI, AREEO, Yasouj, Iran

Email: Sajadnazari13@gmail.com

Abstract

Genetic structure of *Acipenser persicus*, in the Caspian Sea was studied using tetrasomic microsatellite markers. A total of 195 specimens of *A. persicus* breeders were collected from the sampling stations located in the five fishery catch zones as well as from the Sefidrud River in the south Caspian region. About 2 g of caudal fin samples was collected from each sturgeon specimen and preserved in 96% ethyl alcohol and then transferred to the genetic laboratory of the International sturgeon research Institute. Genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method. DNA quality and content was determined using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Polymerase Chain Reaction (PCR) of genomic DNA fin samples was carried out using 8 pairs of microsatellite tetrasomic primers of which all of primers were polymorphic. All PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Following the scoring of alleles, all parameters related to population genetics were calculated using the Phylip and Arliquin program and the phylogenetic relationship between samples was plotted using neighbor-joining tree. Number of alleles in *A. persicus* varied from a minimum of 8 (Zone 2) to a maximum of 14 alleles per locus (Sepidrud River). The observed and expected heterozygosity was between 0.657 and 0.784 respectively. Significant differences were detected between *A. persicus* specimens collected from Sepidrud River ($P \leq 0.001$) and those collected in the south Caspian Sea. Significant differences were also detected between specimens caught in the eastern fishery zones and those caught in the western fishery zones of the south Caspian Sea ($P \leq 0.001$). Based on genetic criteria it is evident from the phylogenetic tree plotted that *A. persicus* specimens collected from the Sepidrud River belonged to one cluster and all other specimens belonged to a separate cluster. Based on the results obtained it may be concluded that three independent populations of *A. persicus* are found in the Caspian Sea which include the Sepidrud population, and the population of the fishery zone three in which this calls for further investigations on the genetic structure.

Keywords Microsatellite, *A. persicus*, population genetics, Caspian Sea.