



بررسی ژنتیکی مولدین فیل ماهی (*Huso huso*)، توصیه‌هایی برای مدیریت ذخایر و آبی‌پروری

رضوان‌اله کاظمی^۱، مهتاب یارمحمدی^{۱*}، ایوب یوسفی جوردی^۱، محمد حسن زاده صابر^۱
^۱ مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، رشت، ایران

چکیده

فیل ماهی (*Huso huso*) یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی خاویاری ایران است که مدیریت مؤثر این گونه جهت حفظ ذخایر و توسعه آبی‌پروری، نیاز به آگاهی از ساختار، الگوهای جفت شدن و تنوع ژنتیکی مولدین آن دارد. هدف از این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی مولدین پرورشی نسل اول در دو مرکز بانک ژن زنده مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید بهشتی استان گیلان با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهوره بود. نمونه بافت باله‌دمی ۱۴۷ مولد و پیش مولد فیل‌ماهی پرورشی در دو سایت پرورش ماهیان خاویاری (۴۷ نمونه از مرکز بانک ژن و ۱۰۰ نمونه از مرکز شهید بهشتی) در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی جهت تکثیر جایگاه‌های ریزماهوره با استفاده از استات آمونیوم استخراج گردید. چهار جایگاه ریزماهوره (LS68، LS57، LS19 و LS39) جهت بررسی تنوع ژنتیکی در دو گروه از ماهیان مورد مطالعه تکثیر شد. از بین ۱۴۷ نمونه فیل‌ماهی دو جمعیت مورد مطالعه، ۱۹۸ آلل شناسایی شد (۱۲۳ آلل در جمعیت مولدین بانک ژن و ۷۵ آلل در جمعیت مولدین شهید بهشتی) که تمامی آن‌ها به‌صورت دو بانندی بودند. تنوع ژنتیکی در دو جمعیت بانک ژن و مرکز شهید بهشتی به‌ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۶۸ بود. نتایج نشان داد که مولدین مرکز شهید بهشتی از غنای آللی و تنوع ژنتیکی مناسب و مولدین بانک ژن از غنای آللی مطلوب ولی شاخص هتروزیگوسیتی کاهش یافته برخوردار بودند. شاخص تمایز ژنتیکی (F_{ST}) بین دو جمعیت ۰/۳۴ بود که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین دو جمعیت مورد مطالعه بود. همچنین فاصله و شباهت ژنتیکی Nei براساس ماتریکس جمعیت به‌ترتیب، ۱/۴۹۱ و ۰/۲۲۵ بود، درحالی‌که براساس آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت فیل‌ماهی مورد مطالعه ۹۲ درصد و داخل جمعیت ۸ درصد مشخص شد. مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های فیل‌ماهی در دو مرکز مهم شیلاتی کشور توانست اطلاعات اولیه شرایط ژنتیکی ذخایر این ماهیان باارزش را از نقطه نظر حفاظت ذخایر و نیز برنامه‌های مدیریتی آبی‌پروری تجاری، فراهم سازد.

واژه‌های کلیدی:

فیل ماهی، *Huso huso*، ریزماهوره، تنوع ژنتیکی، حفاظت ذخایر

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۰۸/۰۶

پذیرش: ۹۹/۰۹/۳۰

DOI: 10.22034/jair.9.1.61

نویسنده مسئول مکاتبه:

مهتاب یارمحمدی، مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، رشت، ایران

ایمیل:

mahtabyarmohammadi@gmail.com

۱ | مقدمه

تاس‌ماهیان با قدمت بیش از ۲۵۰ میلیون سال، یکی از قدیمی‌ترین ماهیان و به‌عنوان فسیل زنده روی زمین بوده، در نیم‌کره شمالی زمین پراکنش دارند (Billard and Lecointre, 2000). از لحاظ حفاظتی همه گونه‌های تاس‌ماهیان در پیوست ۲ کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های درحال انقراض (CITES) قرار دارند (IUCN Red List, 2017). از ۲۷ گونه تاس‌ماهی شکلان (Acipenseriformes)، تعداد ۶ گونه ارزشمند آن شامل فیل‌ماهی (*Huso huso*)، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاس‌ماهی روسی (*A. gueldenstadtii*)، ازون‌برون (*A. stellatus*)، شیپ (*A. nudiventris*) و استرلیاد (*A. ruthenus*) در دریای خزر و حوضه آبریز آن، به‌عنوان بزرگترین

زیستگاه طبیعی ماهیان خاویاری جهان، زیست می‌نمایند. تاس‌ماهیان دریای خزر از گونه‌های با ارزش و اقتصادی شیلاتی بوده که صرف‌نظر از اهمیت آنها در اقتصاد، به‌دلیل مشکلات زیستگاهی و آلودگی‌های دریای خزر و صید بی‌رویه به‌شدت در معرض خطر انقراض قرار دارند (Pourkazemi, 2006). به‌طوری‌که براساس آخرین آمارها میزان صید ماهیان خاویاری از حدود ۲۰۵۸ تن در سال ۱۳۷۱ به حدود ۱۳ تن در سال ۱۳۹۸ در آب‌های ایرانی دریای خزر رسیده است که بیش از ۹۹ درصد کاهش نشان می‌دهد (Fisheries Organization, 2019). در سال‌های اخیر، جهت به‌حداقل رساندن فشار بر جمعیت‌های وحشی، آبی‌پروری تاس‌ماهیان با اهداف

این ذخایر در صورت انقراض کامل تاس‌ماهیان در دریای خزر از آنها می‌توان به‌منظور اهداف بازسازی ذخایر نیز استفاده نمود. در حال حاضر برخی از برنامه‌های بازسازی ذخایر و تشکیل بانک‌های ژن تاس‌ماهیان بدون توجه به مدیریت ژنتیکی و فقط از تعداد کمی از مولدین استفاده می‌شود که این امر سبب کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش احتمال درون آمیزی در جمعیت نسل اول و نسل‌های متعاقب آن خواهد شد. تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر ارزیابی ژنتیکی مولدین پرورشی نسل F₁ در گونه‌های مختلف تاس‌ماهیان در کشور ارائه نشده است. باتوجه به مطالعه انجام شده روی جمعیت‌های وحشی تاس‌ماهیان دریای خزر توسط (Pourkazemi et al., 2008)، بیشتر جمعیت‌های ماهیان دریای خزر از بین رفته‌اند. بنابراین به‌منظور توسعه پایدار صنعت آبی‌پروری تاس‌ماهیان با اهداف بازسازی ذخایر و آبی‌پروری، نیاز به حفظ تنوع ژنتیکی در نسل‌های آتی این ماهیان می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر مطالعه تنوع ژنتیکی مولدین و پیش‌مولدین فیل ماهی نسل F₁ موجود در بانک ژن زنده تاس‌ماهیان مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و مرکز بازسازی ذخایر شهیدبهشتی با استفاده از روش ریزماهواره (میکروستلایت) به‌منظور دستیابی به اطلاعات مورد نیاز مدیریت ژنتیکی تکثیر و برنامه‌های مرتبط با بازسازی ذخایر و آبی‌پروری در گونه فیل‌ماهی است.

۲ | مواد و روش‌ها

نمونه‌های بافتی باله دمی از ۱۴۷ فیل ماهی پرورشی (*Huso huso*) در دو سایت پرورش ماهیان خاویاری در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۹ جمع‌آوری و تا شروع آزمایش‌ها در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند. جمعیت‌های فیل‌ماهی پرورشی نسل اول (F₁) شامل پیش‌مولدین و مولدین از مراکز بانک ژن مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر (۴۷ نمونه) و مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهیدبهشتی (۱۰۰ نمونه) مورد مطالعه قرار گرفتند.

DNA ژنومی جهت تکثیر ریزماهواره‌ها از نمونه‌های بافت باله‌دمی با استفاده از روش استات آمونیوم استخراج گردید (Chakmehdouz, 2005). از میان ۱۲ جایگاه ریزماهواره مورد بررسی شامل (LS68, LS57, LS19, LS39, LS54, LS34, SPL104, AFUG9, AFUG56, AFUG36, AFUG74, AFUG112)، چهار جایگاه (LS68, LS57, LS19 و LS39 که دارای بیشترین حالت چندشکلی (پلی‌مورفیسم) برای انجام آنالیز ژنتیکی بودند مورد استفاده قرار گرفت (ay et al., 1997; McQuown et al., 2000, Welsh et al., 2003) (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل DNA الگو با غلظت ۴۰ نانوگرم، بافر 1X واکنش PCR، پرایمرها با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مولار، dNTPها با غلظت نهایی ۰/۲۵ میلی‌مولار، MgCl₂ با غلظت نهایی ۳/۳ میلی‌مولار و آنزیم Taq Polymerase به میزان ۰/۶ واحد (سیناکلون، ایران) آماده گردید و از آب مقطر دوبار تقطیر استریل جهت رسیدن به حجم نهایی موردنظر استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Mastercycler ep gradient, 96 plus, Eppendorf, Germany)

تولید گوشت و خاویار در ایران گسترش یافته است (Pourali, 2006). در بین گونه‌های تاس‌ماهی، فیل‌ماهی به‌علت رشد سریع و سازگاری با رژیم‌های غذایی مختلف، به‌عنوان گونه اصلی پرورشی در ایران مورد توجه قرار گرفته است (Kalbasi et al., 2013). پرورش تجاری تاس‌ماهیان در کشور از سال ۱۳۸۷ آغاز گردیده است و در حال حاضر پرورش ماهیان خاویاری در ۱۳۲ مزرعه در ۲۵ استان کشور در حال انجام می‌باشد (Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization, 2019). به‌منظور توسعه پایدار این صنعت در کشور نیاز به تأمین بچه‌ماهیان با کیفیت می‌باشد که این امر مستلزم وجود مولدین با کیفیت است. بنابراین شناسایی ساختار ژنتیکی و تهیه شناسنامه ژنتیکی مولدین پرورشی نسل اول تاس‌ماهیان دریای خزر از اولین اقدامات مهم به‌منظور حفاظت از آنها و توسعه آبی‌پروری تاس‌ماهیان در کشور می‌باشد. از جمله فعالیت‌هایی که در زمینه بهبود و توسعه پایدار آبی‌پروری ماهیان خاویاری کشور در حال انجام می‌باشد ارزیابی ژنتیکی مولدین نسل F₁ و تهیه شناسنامه ژنتیکی در مراکز تولید تاس‌ماهیان پرورشی است (Yarmohammadi, 2019; Farasati et al., 2020). مطالعات ژنتیکی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای بسیاری از اهداف از جمله شناسایی افراد، تجزیه و تحلیل دودمان و بررسی تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌های موجود خصوصاً در ماهیان خاویاری به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zane et al., 2002; Barmintseva, 2018). به‌دلیل بالا بودن تنوع قطعات تکرار شونده در نتیجه جهش و همچنین به‌علت الگوی توارث هم‌بارز در نشانگرهای ریزماهواره، ارزش به‌کارگیری آن‌ها در مطالعات ژنتیکی دو چندان می‌شود (Liu and Cordes, 2004). به‌عنوان مثال در مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مشخص شد که در برنامه‌های بازسازی ذخایر تاسماهی چینی (*A. sinensis*)، ۵ تا ۱۰ درصد جمعیت ماهیان جوان در دریا حاصل از فعالیت‌های تکثیر مصنوعی این گونه می‌باشد (Zhu et al., 2002). در همین راستا در نتیجه بررسی ساختار ژنتیک جمعیت تاسماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*) مشخص گردید که روش ریزماهواره از توانایی بالایی در نشان دادن تنوع ژنتیکی تاس‌ماهیان روسی برخوردار است (Khoshkholgh et al., 2007). در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ازون‌برون (*A. stellatus*) در قسمت‌های شمالی و جنوبی دریای خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره میزان تنوع ژنتیکی اندک برآورد شد که علت آن به کاهش تعداد افراد جمعیت‌ها نسبت داده شد (Norouzi and Pourkazemi, 2016).

مولدین نسل F₁ نگهداری شده در بانک ژن زنده مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و نیز مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهیدبهشتی، باتوجه به وظایف سازمانی این دو مرکز، به‌عنوان ذخایر ارزشمند گونه‌های در حال انقراض تاس‌ماهیان دریای خزر می‌باشند. به‌طوری‌که علاوه بر استفاده از نتایج حاصل در توسعه آبی‌پروری تاس‌ماهیان در کشور، با مدیریت صحیح

و تحت شرایط زیر صورت پذیرفت: واسرشته سازی اولیه (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی پرایمر (Annealing) مربوطه، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه

سانتی گراد. به منظور بسط (Extension) و در پایان به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی گراد به منظور بسط نهایی تیمارهای دمایی اعمال گردید (جدول ۱).

جدول ۱- جایگاه ها، توالی پرایمر، محدوده بازی، توالی تکرار شونده و دمای اتصال آغازگرهای ریزماهواره

جایگاه زن / کد دسترسی در بانک ژنی	توالی پرایمر (۵'-۳')	محدوده اندازه (bp)	توالی تکراری	دمای اتصال (°C)
LS68/U72739	F-TATTGCATGGTGTAGCTAAAC R-TCCTCTTTGGCAATTTGTTCC	۱۷۴-۱۴۰	(TTG _۹)	۵۵
LS57/ AF276173	F-TTATATGGGTGGGGTGGATG R-TCCTCTTTGGCAATTTGTTCC	۲۹۰-۱۸۱	(TCRT _{۱۲})	۵۷
LS19/U72730	F-ATCTTAGCCGTCTGTGGTAC R-CAGGTCCCTAATACAATGGC	۱۷۴-۱۴۰	(TTG _۹)	۵۵
Ls39/U72734	F-TTCTGAAGTTCACACATTG R-ATGGAGCATTATTGGAAGG	۱۷۲-۱۱۹	(GTT _{۱۰})	۵۵

مورد مطالعه همگی دو باندی (دیسومیک) و بین ۱ تا ۲ آلل در هر نمونه را تکثیر نمودند. جدول ۲ شامل اطلاعات در مورد تعداد آلل، تعداد آلل اختصاصی، تعداد آلل های مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، شاخص ثبات (Fixation Index) و تعداد آلل های اختصاصی می باشد. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده و مورد انتظار به ترتیب از ۰/۶۸۰ تا ۰/۸۸۸ (جمعیت مرکز شهیدبهرشتی) و ۰/۴۴۱ تا ۰/۹۵۰ (جمعیت بانک ژن) بود. بالاترین متوسط تعداد آلل (۳۰/۷۵) در جمعیت بانک ژن و کمترین تعداد متوسط آلل (۱۸/۷۵) در جمعیت شهیدبهرشتی مشاهده شد (جدول ۲). آلل های اختصاصی در همه جمعیت ها مشاهده شدند، به طوری که بیشترین تعداد آلل های اختصاصی (۲۴/۷۵) در جمعیت بانک ژن مشاهده شد (جدول ۲).

تعداد ۱۹۸ آلل در این دو جمعیت شناسایی شد (۷۵ آلل در جمعیت مولدین شهیدبهرشتی و ۱۲۳ آلل در جمعیت مولدین بانک که تمامی آن ها به صورت دو باندی (دیسومیک) بودند. در جمعیت مولدین شهیدبهرشتی جایگاه LS19 با ۲۲ و در جمعیت مولدین بانک ژن جایگاه LS57 با ۴۱ آلل، بالاترین میزان چند ریختی را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

به منظور انجام آشکارسازی محصولات PCR، الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۶٪ انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، فرآیند رنگ آمیزی ژل ها با استفاده از روش نیترا ت نقره صورت پذیرفت (Blum *et al.*, 1987). اندازه باندها و آلل ها با استفاده از نرم افزار BIO-GEN (Vilbert-Lumart, France) براساس دستورالعمل شرکت سازنده، تعیین شد. پروفایل ژنتیکی شامل لیست اندازه آلل ها در جایگاه های مورد مطالعه برای هر نمونه تهیه گردید. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)، تعادل هاردی-واینبرگ، تعداد آلل مؤثر (N_e)، تعداد آلل اختصاصی (N_{pa})، شاخص ثبات (fixatin index) (F)، ماتریکس فاصله (DA)، و آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای هر جمعیت با استفاده از نرم افزار GenAlex (V6.5) (Peakall and Smouse, 2012) محاسبه گردید.

۳ | نتایج

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گله مولدین فیل ماهی پرورشی از چهار جفت نشانگر ریزماهواره شامل LS68، LS57، LS19 و LS39 استفاده شد که همگی آن ها باندهای چندشکلی را تولید کردند. نشانگرهای

جدول ۲ - اطلاعات ژنتیکی دو جمعیت فیل ماهی مطالعه شده براساس آنالیز DNA میکروستلایت. N_a: تعداد آلل های متفاوت، N_e: تعداد آلل های مؤثر،

H_o: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F: شاخص ثبات، N_{pa}: تعداد آلل های خصوصی.

جمعیت	تعداد	N _a	N _e	H _o	H _e	F	N _{pa}
شهید بهشتی	۱۰۰	۱۸/۷۵	۹/۱۹	۰/۶۸	۰/۸۹	۰/۲۳	۱۲/۷۵
بانک ژن	۴۷	۳۰/۷۵	۲۰/۷۵	۰/۴۴	۰/۹۵	۰/۵۴	۲۴/۷۵

جدول ۳:- تعداد آلل‌های ثبت شده در این بررسی به تفکیک جمعیت و میانگین آنها در سطح جمعیت

N _e		N _s		جایگاه آلی
بانک ژن	شهید بهشتی	بانک ژن	شهید بهشتی	
۲۱/۱۳	۹/۲۴	۳۲	۱۵	LS68
۲۸/۱۴	۶/۸۷	۴۱	۱۹	LS57
۱۷/۹۶	۱۱/۴۸	۲۵	۲۲	LS19
۱۵/۷۸	۹/۱۸	۲۵	۱۹	LS39
	۱۴/۹۷		۲۴/۷۵	میانگین

از آزمون X^2 در هر دو جمعیت در جدول ۴ ارائه شده است. همه جایگاه‌ها در دو جمعیت مورد مطالعه، عدم انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند.

میزان تنوع ژنتیکی برآورد شده در جمعیت مولدین پرورشی با استفاده از شاخص‌هایی از قبیل هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) و همچنین بررسی تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده

جدول ۴:- تنوع ژنتیکی چهار جایگاه مورد بررسی در دو جمعیت مولدین پرورشی فیل ماهی

N _e		جایگاه آلی
بانک ژن	شهید بهشتی	
LS68		
۰/۲۹۸	۰/۵۳۰	H_o
۰/۹۵۳	۰/۸۹۲	H_e
***	***	H-W
LS57		
۰/۶۴	۰/۷۷	H_o
۰/۹۶	۰/۸۵	H_e
***	***	H-W
LS19		
۰/۶۶	۰/۹۵	H_o
۰/۹۴	۰/۹۱	H_e
***	***	H-W
LS39		
۰/۱۷	۰/۴۷	H_o
۰/۹۴	۰/۸۹	H_e
***	***	H-W

H_o هتروزیگوسیتی مشاهده شده، H_e هتروزیگوسیتی مورد انتظار، H-W احتمال در تعادل هاردی - واینبرگ (ns عدم معنی داری، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$).

ذخایر و یا جمعیت‌های ماهیان نه تنها برای حفاظت جمعیت‌های طبیعی، بلکه برای تکثیر ذخایر گونه‌های ارزشمند در شرایط آبی‌پروری مهم می‌باشد (Fopp-Bayat and Ciereszko, 2012; Kaczmarczyk and Fopp-Bayat, 2013). آنالیز مولکولی ارائه شده در این پژوهش اولین مطالعه جهت مقایسه تنوع ژنتیکی (براساس آنالیز DNA میکروستلایت) دو جمعیت از مولدین پرورشی فیل ماهی در دو مرکز بازسازی ذخایر و بانک ژن در کشور می‌باشد. در این مطالعه، متوسط تعداد آلل (۳۰/۷۵ - ۱۸/۷۵)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۸ - ۰/۴۴) و هتروزیگوسیتی قابل انتظار (۰/۸۹ - ۰/۹۵) در جمعیت‌های مطالعه شده فیل ماهی می‌باشد که با گزارش‌های ارائه شده در جمعیت‌های دیگر تاس‌ماهیان قابل مقایسه بود (Pekarik *et al.*, 2019; Ivanova *et al.*, 2017; Fopp-Bayat *et al.*, 2015; Fopp-bayat and Furgata-Selezniow, 2010). به‌عنوان مثال، در مطالعه انجام شده توسط خوش‌خلق و همکاران (Khoshkholgh *et al.*, 2013) با استفاده از نشانگر ریزماهواره روی جمعیت‌های طبیعی

ساختار ژنتیک جمعیت برای هر کدام از جایگاه‌های ژنی در این دو جمعیت از طریق مؤلفه F_{st} (شاخص ثبات کل جمعیتی) مورد بررسی قرار گرفت (Weir and Cockerham., 1984). میانگین این شاخص F_{st} در جایگاه‌های LS68، LS57، LS19، LS39 به ترتیب ۰/۰۳۶، ۰/۰۴۲، ۰/۰۲۸، ۰/۰۳۰ و میانگین ۰/۰۳۴ به ثبت رسید. براساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز GenAlex، فاصله و شباهت ژنتیکی Nei بر اساس ماتریکس جمعیت به ترتیب، ۱/۴۹۱ و ۰/۲۲۵ بود. در بررسی صورت پذیرفته با آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) در سطح ۹۹ درصد مشخص شد که تنوع ژنتیکی میان دو جمعیت ۹۲٪، درحالی‌که در داخل جمعیت‌ها ۸٪ بود.

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت‌های آبی‌پروری ممکن است تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر پرورشی را از طریق لقاح خویشاوندی و یا تکثیر تعدادی معدودی از مولدین کاهش دهد (Norris *et al.*, 1999). بنابراین شناسایی ژنتیکی

تاس ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده از مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار پایین تر بود که این امر نشان دهنده کاهش تنوع ژنتیکی و وجود احتمالی درون آمیزی در افراد جمعیت ماهیان وحشی بود. همچنین براساس نتایج مطالعه ددو و همکاران (Dudu et al., 2014) پایین تر بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار در جمعیت مولدین وحشی فیل ماهی (*Huso huso*) در رودخانه دانوب، در نتیجه کاهش جمعیت مولدین و افزایش درون آمیزی بیان گردید.

در مطالعه حاضر میانگین تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت مولدین مجتمع شهید بهشتی به ترتیب (۱۸/۷۵ و ۰/۶۸) و در جمعیت مولدین بانک ژن این مقادیر به ترتیب (۳۰/۷۵ و ۰/۴۴) بود که در مقایسه با مقادیر گزارش شده برای ماهیان رودکوچ (تعداد آلل ۱۰/۸ و هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۸) (Dewoody and Avise, 2000) می توان نتیجه گرفت؛ مولدین پرورشی جمعیت مرکز شهید بهشتی از غنای آللی و تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردار بودند اما جمعیت مولدین پرورشی فیل ماهی بانک ژن، دارای غنای آللی در حد مطلوب، ولی شاخص هتروزیگوسیتی کاهش یافته بودند. همچنین تعداد آلل خصوصی در جمعیت مولدین فیل ماهی پرورشی بانک ژن بیشتر بود که نشان دهنده خصوصیات ویژه آنها می باشد. بنابراین، پایش مدام ژنتیکی جمعیت های مطالعه شده بر اساس شاخص های گزارش شده در این مطالعه در آینده توصیه می گردد. مطالعه حاضر نشان داد که تنوع ژنتیکی در جمعیت بانک ژن بالا نیست. بنابراین، ادامه مطالعات ژنتیکی و دستیابی به اطلاعات بیشتر در رابطه با شرایط ژنتیکی جمعیت های مطالعه شده و طراحی یک نقشه مناسب و همچنین راهبرد حفاظت ذخایر فیل ماهیان به منظور اهداف آبی پروری و استفاده از آنها در بازسازی ذخایر بسیار مهم می باشد.

از ضریب تمایز F_{ST} به عنوان یکی از شاخص های مهم جهت تفکیک بین جمعیت ها استفاده می شود (Ballox and Moulin, 2002). میزان F_{ST} در دو جمعیت مطالعه شده برابر با ۰/۳۴ ثبت شد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین بین این دو جمعیت بود (Wright, 1978). پایین بودن فاصله ژنتیکی نشان دهنده جزئی بودن جریان ژنی در بین دو جمعیت مورد مطالعه می باشد. چون هر دو جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق از حوضه جنوبی دریای خزر منشأ گرفته بودند، بنابراین وجود مقادیر جزئی جریان ژنی امکان پذیر است. مقادیر مشابه F_{ST} در جمعیت های مطالعه شده تاس ماهی دریاچه ای (*A. fulvescens*) در رودخانه اتاوا (Wozney et al., 2011) و همچنین در تاس ماهی نر آتلانتیک نژادهای بهاره و پاییزه در روخانه جیمز ایالت ویرجینیا به مقدار ۰/۴۸ مشاهده شد که نشان دهنده افتراق ژنتیکی نرهای پاییزه و بهاره بود (Balazik et al., 2017).

باتوجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، به نظر می رسد که نیاز به بهبود خزانه ژنتیکی مولدین موجود در مرکز بانک ژن می باشد که این امر با استفاده از مولدین فیل ماهی در مرکز شهید بهشتی امکان پذیر می باشد. باتوجه به همجواری این دو مرکز، استفاده از مولدین فیل ماهیان پرورشی موجود در مرکز شهید بهشتی می تواند

گزینه مناسبی جهت حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت بانک ژن باشد. در مولدین فیل ماهی پرورشی، حفظ تنوع ژنتیکی این ماهیان با پایش منظم تنوع ژنتیکی در مولدین و نتاج حاصل، اهمیت زیادی دارد و این امر با نشان گذاری همه مولدین و بررسی ژنتیکی میسر می گردد. آگاهی از ژنوتیپ مولدین نشان گذاری شده، کنترل تولیدمثل براساس پروفایل های مولدین، حفظ تنوع ژنتیکی در سطح مطلوب و در نتیجه اجتناب از لقاح خویشاوندی در گله امکان پذیر می شود (Kaczmarczyk and Fopp-Bayat, 2013). مولدین پرورشی گاهی اوقات به دلیل مدیریت ضعیف تکثیر، به عنوان مثال استفاده از تعداد افراد کم جهت تولیدمثل، دچار کاهش تنوع ژنتیکی می شوند (Wedekind, 2002).

باتوجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد که مولدین پرورشی فیل ماهی در بانک ژن، حاصل از تعداد محدودی مولد صید شده از دریا باشند. در صورت رهاسازی ماهیان دارای تنوع ژنتیکی کم حاصل از فعالیت مراکز تکثیر به محیط های طبیعی به منظور بازسازی ذخایر، ممکن است که به دلایل از بین رفتن تنوع ژنتیکی، افزایش رقابت و آلودگی با عوامل بیماری زا و انگل ها، سبب آسیب به جمعیت های وحشی شوند (Aho, 2006). همچنین در صورت استفاده از گله مولدین با تنوع ژنتیکی کم جهت اهداف آبی پروری تاس ماهیان در درازمدت شاهد افزایش هم خونی و تبعات ناشی از آن و در نتیجه کاهش تولید خواهیم بود. چنین مطالعاتی براساس آنالیزهای ژنتیکی این امکان را برای محققین فراهم می سازد که مناسب ترین مولد را برای تشکیل گله مولدین انتخاب نمایند.

اطلاع از تنوع ژنتیکی گله مولدین تازه تشکیل شده، پایش ژنتیکی و پیگیری تغییرات ژنتیکی در جمعیت های طبیعی و آبی پروری را امکان پذیر می سازد. کمبود اطلاعات در مورد ساختار ژنتیکی مولدین پرورشی فیل ماهی در ایران، اهداف در نظر گرفته شده برای توسعه پایدار آبی پروری و بازسازی ذخایر طبیعی دریای خزر را به طور اساسی محدود می سازد. بنابراین، وجود اطلاعات ژنتیکی پایه جهت هدایت برنامه های آینده بازسازی ذخایر و توسعه پایدار آبی پروری، ضروری به نظر می رسد.

بر پایه نتایج این پژوهش، خصوصیات ژنتیکی دو جمعیت فیل ماهیان پرورشی مورد مطالعه، اطلاعات مهمی را در ارتباط با تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از جمعیت ها و پتانسیل های حفظ و افزایش تنوع ژنتیکی در ذخایر پرورشی این گونه، فراهم آورده است. تنوع ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه در این تحقیق، می تواند به عنوان شاخص خزانه ژنتیکی در جمعیت های مولدین فیل ماهی پرورشی تشکیل شده در این دو مرکز باشد.

۵ | تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر انجام گرفت. از کلیه افرادی که در اجرا و تکمیل این پژوهش ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

پست الکترونیک نویسندگان

ماهتاب یارمحمدی: mahtabyarmohammadi@gmail.com
 رضوان‌اله کاظمی: Rezkazemi2000@yahoo.com
 ایوب یوسفی جوردی: ayoub2222002@yahoo.com
 محمد حسن‌زاده صابر: saber.merag@gmail.com

REFERENCES

- interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*, 9: 583-594.
- IUCN. 2017. Red List of Threatened Species. Available: <https://www.iucnredlist.org/Updated on 2021>.
- Ivanova P.P., Kardjeva V., Raykov S.V., Dzhembekova N.S. 2017. Microsatellite and Allozyme variations in starlet sturgeon wild broodstock and hatchery-produced offspring, used for restocking of lower Danube River. *Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 3(4):199-206.
- Kaczmarczyk D., Fopp Bayat D. 2013. Assemblage of spawning pairs based on their individual genetic profiles—as tool for maintaining genetic variation within sturgeon populations. *Aquaculture Research*, 44(4):677-682.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E.A., Salari-Joo H. 2013. A review on aquaculture development in Iran. *Journal of Ecopersia*, 1: 159-179.
- Khoshkholgh M.R., Nazari S., Pourkazemi M. 2013. Population Structure of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) in the southern part of Caspian Sea. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 9(1): 29-39.
- Khoshkholgh M.R., Pourkazemi M., Kamali A., Rezvani S. 2007. Investigation of the genetic structure of the Russian sturgeon population (*Acipenser gueldenstaedtii*) in the North Caspian (Volga River) and South Caspian (Iranian and Turkmen waters) Using the microsatellite method, *Iranian Journal of Fisheries*, 16: 69-80.
- Liu Z., Cordes J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238:1-37.
- May B., Chales C., Krueger C., Kincaid L. 1997. Genetic variation at Microsatellite loci in sturgeon primer sequences homology in *Acipenser* and *Scaphyrhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 1542-1547.
- McQuown E.C., Sloos B.L., Sheehen R.J., May B. 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphyrhynchus* and *Acipenser*. *American Fisheries Society*, 129:1380-1388.
- Mugue N., Barmintseva A. 2018. Genetic Variability in Wild Populations and Farmed Broodstocks of the Siberian Sturgeon in Russia. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869)*, Farming, Springer, Cham, 2: 347-369.
- Norouzi M., Pourkazemi M. 2016. Microsatellite DNA markers for analysis of genetic population structure of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in the North (Volga and Ural Rivers) and South Caspian Sea (Sefidrud and Gorganrud Rivers). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2): 687-700.
- Norris A.T., Bradley D.G., Cunningham E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180(3-4):247-264.
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537- 2539.
- Aho T., Rönn J., Piironen J., Björklund M. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, 253(1-4):244-248.
- Balazik M.T., Farrae D.J., Darden T.L., Garman, G.C. 2017. Genetic differentiation of spring-spawning and fall-spawning male Atlantic sturgeon in the James River, Virginia. *PloS one*, 12(7):1-8.
- Balloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165.
- Billard R., Lecointre G. 2000. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4): 355-392.
- Blum H., Beier H., Gross H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2):93-99.
- Chakmehdouz Ghasemi F. 2005. Comparison of DNA extraction methods in aquatic animals and its practical instructions. B.Sc. Thesis, Mirza Kuchak Khan Center for Higher Education, Science and Technology of Fisheries, Comprehensive University of Applied Sciences. Guilan. 53p. (In Persian).
- Dewoody J.A., Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Fish biology*, 56:461-473.
- Dudu A., Burcea A., Costache M., Florescu I., Georgescu S.E. 2014. Analysis of Genetic Diversity in Beluga Sturgeon, *Huso huso* from the Lower Danube River using DNA Markers. *Animal Science and Biotechnologies*, 47 (1):64-68.
- Farasati S., Khoshkholgh M.R., Yarmohammadi M. 2020. Genetic diversity of cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) brood stocks by using Microsatellite method. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*, 8(8):55-72.
- Fopp-Bayat D., Ciereszko A. 2012. Microsatellite genotyping of cryopreserved spermatozoa for the improvement of whitefish semen cryobanking. *Cryobiology*, 65(3):196-201.
- Fopp-Bayat D., Furgala-Selezniow G. 2010. Application of microsatellite DNA variation in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) cultured in a Polish fish farm. *Polish Journal of Natural Sciences*, 25(2):173-181.
- Fopp-Bayat D., Kuzniar P., Kolman R., Liszewski T., Kucinski M. 2015. Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations—recommendations for the plan of restitution in the Dniester River. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3): 634-645.
- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E., Mensberg K.D. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life history dependent

نحوه استناد به این مقاله:

کاظمی ر.، یارمحمدی م.، یوسفی جوردهی ا.، حسنزاده صابر م. بررسی ژنتیکی مولدین فیل ماهی (*Huso huso*)، توصیه‌هایی برای مدیریت ذخایر و ارزی‌پروری. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبد کاووس. ۱۴۰۰، ۶۴-۵۷ (۱): ۹.

Kazemi R.A., Yarmohammadi M., Yousefi Jordehi A., Hassanzadeh Saber M. Genetic characterization of great sturgeon (*Huso huso*) brood stocks, recommendations for the conservation management and aquaculture. Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous. 2021, 9(1): 57-64.

- Pekárik L., Čiamporová-Zaťovičová Z., Arendt D., Čiampor F. 2019. Current stocking program of the sterlet (*Acipenser ruthenus*, L.) can negatively shape its genetic variability in the Middle Danube. Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems, 19(420): 1-8.
- Pourali Fashtami H., Mohseni M., Alizadeh M. 2006. A comparative study of the growth of *Huso huso* in two breeding environments of brackish water and fresh water. Iranian Journal of Fisheries, 15(1): 43-50.
- Pourkazemi M. 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. Journal of Applied Ichthyology, 22: 12-16.
- Statistical Yearbook of Iran Fisheries Organization 1397-1392. 2019. Iran Fisheries Organization, 64p.
- Wedekind C. 2002. Sexual selection and life-history decisions: implications for supportive breeding and the management of captive populations. Conservation Biology, 16(5): 1204-1211.
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure, Evolution, 38: 1358-1370.
- Welsh A.B., Blumberg M., May B. 2003. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris*. Molecular Ecology Notes, 3(1):47-55.
- Wozney K.M., Haxton T.J., Kjartanson S., Wilson C.C. 2011. Genetic assessment of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) population structure in the Ottawa River. Environmental Biology of Fishes, 90(2):183-195.
- Yarmohammadi M., Kazemi R., Hallajian A., Yousefi Jordehi A., Yazdani Sadati M.A., Hassanzadeh Saber M., Hosseinpour A. 2019. Selection of appropriate sturgeon breeders based on genetic identity. Scientific - Extension Journal of Sturgeon, 2:35-25.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular ecology, 11(1): 1-16.
- Zhu B., Zhou F., Cao H., Shao Z., Zhao N., May B., Chang J. 2002. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. Journal of Applied Ichthyology, 18(4-6): 301-306.

Genetic characterization of great sturgeon (*Huso huso*) brood stocks, recommendations for the conservation management and aquaculture

Yarmohammadi M^{*1}, Kazemi R.A¹, Yousefi Jordehi A¹, Hassanzadeh Saber M¹.

¹ International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Extension and Education Organization (AREEO), Rasht, Iran

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 27-10-2020

Accepted: 20-12- 2020

Corresponding author:

Yarmohammadi M. International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Extension and Education Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Email: mahtabyarmohammadi@gmail.com

Abstract

The great sturgeon, *Huso huso*, is one of the most important cultured sturgeon species in Iran, which effective management of aquaculture production of this species requires knowledge of broodstock structure, mating patterns, and genetic diversity of broodstock. The aim of the present study was the application of microsatellite DNA analysis for genetic diversity assessment in the first generation of cultured great sturgeon farmed at two centers of the live gene bank at the International Sturgeon Research Institute and Shahid Dr. Beheshti center for restoration and conservation of genetic stocks of sturgeon in Guilan province. Fin clips were sampled from 147 spawners and pre-spawners of great sturgeon at the two centers (47 samples from gene bank and 100 samples from Shahid Beheshti) in 1397-1399. Genomic DNA for amplification of microsatellite loci was extracted using ammonium acetate. Four microsatellite loci (LS68, LS57, LS19, and LS39) were amplified for examination of the genetic diversity of the two group studied sturgeons. Within 147 individuals of the great sturgeon, 198 alleles were detected (123 alleles in genebank and 75 alleles in Shahid Beheshti stocks) and all loci were disomic. The genetic diversity in gene bank and Shahid Beheshti populations were 0.44 and 0.68, respectively. Results showed that the Shahid Beheshti Center broodstocks had good allelic richness and genetic diversity and the gene bank broodstocks had good allelic richness but with reduced heterozygosity index. The genetic differentiation index (F_{ST}) between the two populations was 0.34, which indicated a low genetic differentiation between the two populations. Also, the genetic distance and similarity of Nei based on the population matrix were 1.491 and 0.225, respectively, while based on Analysis of Molecular Variance (AMOVA) genetic diversity between the two populations of great sturgeon was 92% and within the population was 8%. Genetic study of fish populations in two important fisheries centers of the country was able to provide basic information on the genetic conditions of the stocks of these valuable fish from the point of view of conservation of stocks as well as commercial aquaculture management programs.

Keywords: great sturgeon, *Huso huso*, microsatellites, genetic diversity, conservation