شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۲۳۵-۲۲۳

ردیابی مولکولی نمونه‌های مشکوک مولدین تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) به هیبرید بودن با دیگر تاسماهیان

شیرین جمشیدی*

استادیار انستیتو بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش وترویج، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

احتمال هیبریداسیون تاسماهیان در طبیعت گزارش شده است اما گاهی اوقات در مراکز تحقیقاتی دولتی و خصوصی، امکان هیبریداسیون گونه‌های مختلف تاسماهیان با هم به‌دلیل کمبود اسپرم یک گونه یا تعداد بیشتر تخمک وجود دارد. اگر تعداد کروموزوم دو گونه یکسان باشد؛ فرزندان هیبرید بارور و بسیار شبیه به والدین هستند اما به‌دلیل اینکه تکثیر معمولاً برای حفاظت گونه‌ای انجام می شود؛ استفاده از مولدین هیبرید برای رسیدن به جمعیت خالص آن گونه مناسب نیست و باید از روش‌های مختلف تشخیصی مانند روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌های دورگه و خالص استفاده کرد. در این تحقیق از هفت بافت بالهٔ مشکوک تاسماهی شیپ نمونه‌برداری DNA انجام شده و بافت‌ها در الکل ۹۶ درصد نگهداری شد و DNA به روش استات آمونیوم استخراج شد. تعیین جنسیت با استفاده از نشانگرهای هسته‌ای لوکوس ماده انجام شده و یک نشانگر ژن میتوکندری و دو نشانگر ژنوم هسته‌ای برای شناسایی گونه‌ها و هیبریدها استفاده شد. شناسایی گونه‌ای تاسماهی مشکوک با نشانگر میتوکندری نشان داد که هر هفت ماهی دارای ژنوم مادری ماهی شیپ هستند و براساس دو نشانگر هسته‌ای با فیل ماهی، هیبرید می‌باشند. این تحقیق به درستی نشان داد که با تلفیق داده‌های مولکولی میتوکندری و هسته‌ای می‌توان گونه‌ها و هیبریدهای تاسماهیان را از هم تشخیص داد.

کلمات کلیدی: تاسماهی شیپ، هیبرید، تشخیص مولکولی، نشانگرهای میتوکندری و هسته‌ای

* نویسنده مسئول: شیرین جمشیدی
Email: jamshidi99@yahoo.com

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 2, Summer 2023
pp. 223-235

Molecular identification of suspected samples of Fringebarbel sturgeon (*Acipenser nudiventris*) breeder hybridizing with other sturgeons

Shirin Jamshidi*

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

Received: 21-Jun-2022 **Accepted: 05-Feb-2023**

Abstract

The possibility of hybridization of sturgeon has been reported in nature, but sometimes in public and private breeding centers and research centers, it is possible different sturgeon species hybridize together artificially due to the lack of sperm of the same species or more eggs. If the chromosome number of the two species is the same, the hybrid offspring are fertile and very similar to the parents, but because reproduction is usually done for conservation; The use of hybrid breeders to reach the pure population of that species is not appropriate and different diagnostic methods such as molecular methods should be used to distinguish pure hybrid species. In this research, seven suspected fin tissue of *Acipenser nudiventris* were sampled and stored in 96% alcohol and DNA was extracted in a molecular laboratory by ammonium acetate method. Sex determination was done by using female locus markers and a mitochondrial gene marker and two nuclear markers were applied for species and hybrid identification. Barcoding of suspected *A. nudiventris* with mitochondrial marker showed all seven fish have maternal genome of *A. nudiventris* and they are hybrid with Beluga according two nuclear markers. This research properly showed it is possible to distinguish sturgeon genome and hybrids with compilation of mitochondrial and nuclear molecular data.

Keywords: *Acipenser nudiventris*, Hybrid, Molecular identification, Mitochondrial and nuclear markers

* Corresponding author: Shirin Jamshidi Email: jamshidi99@yahoo.com

۱. مقدمه

براساس گزارش CITES[1]، تاسماهیان دریای خزر جزء لیست قرمز این کنوانسیون دسته‌بندی شده‌اند و برای سال‌های متمادی می‌باشد که کار تکثیر مصنوعی آن‌ها انجام شده و بچه ماهیان به رودخانه‌های دریای خزر رها سازی می شوند. از طرفی هم به جهت اینکه هر ساله مولد جهت کار تکثیر مصنوعی می‌بایست در دسترس باشد و یا احتمال عدم صید مولدین به‌طور سالانه از دریا و رودخانه؛ مؤسسهٔ بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای خزر اقدام به نگهداری بخشی از بچه ماهیان از هرگونه کرده و کار مولد سازی انجام می شود. در این میان، ممکن است در فصول تکثیر، همزمانی در آماده بودن تخمک و اسپرم یک گونه وجود نداشته باشد و تخمک مازاد یک گونه با اسپرم گونهٔ دیگر تلقیح داده شود و بچه ماهیان تولید شده هیبرید دو گونه باشند. از آنجا که بازسازی ذخایر هر گونه از تاسماهیان دریای خزر و ماهی‌دار کردن رودخانه‌ها با گونه‌های خالص ساکن در دریای خزر اهمیت ویژه‌ای دارد؛ باید از گونه‌های خالص تاسماهیان دریای خزر در کار تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر استفاده شود. از طرفی، برخی از مولدینی که از گونه‌های مختلف در مرکز تکثیر و پرورش تاسماهیان نگهداری می‌شوند به جهت اینکه در زیست‌بوم طبیعی خود نیستند ممکن است از نظر ریختی و ظاهری تفاوت‌هایی با گونهٔ اصلی و مولدینی که از دریا یا رودخانه صید می‌شوند نیز از خود نشان دهند. Ghadirnejad و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از ژن *COI*، ۵ گونهٔ ساکن در دریای خزر را با استفاده از روش‌های مولکولی مورد شناسایی و تفکیک گونه‌ای قرار دادند. آزمون‌های زیادی در طی سالیان متمادی برای تشخیص گونهٔ خالص از هیبرید بکار گرفته شده است (Ludwig, 2008). تعدادی از آنالیزهای با روال معمول از بررسی ناحیهٔ میتوکندریایی سیتوکروم *b* و ناحیهٔ کنترلی ژن D-loop[2] استفاده کرده‌اند (Krieger *et al*., 2008; Mugue *et a*l., 2008; Ludwig, 2008; Johnson and Iyengar, 2015) که مزیت این مناطق سرعت پاسخ‌دهی و ارزان بودن آن‌ها می‌باشد اما برای تشخیص هیبرید بین دو گونه، به‌ویژه گونه‌های نزدیک هم، تشخیص کاملی ندارند زیرا فقط توسط والد مادری به ارث می‌رسند (Ludwig, 2008; Ogden *et al*., 2013).

روش‌های بررسی نشانگرهای هسته‌ای مثل ریز ماهواره و روش AFLP[3] برای تشخیص هیبرید و گونه ها بکار می‌روند مناسب می‌باشند اما محدودیت‌هایی از جمله تکرارپذیری پایین، قیمت بالا، پیچیدگی روش انجام و یا کاربرد متقابل کم نشانگرهای جدا شده را دارا می‌باشند (Congiu *et al*., 2001, 2002; Rozhkovan *et al*., 2008; Yarmohammadi *et al*., 2012; Barmintseva and Mugue, 2013; Boscari *et al*., 2015). در سال‌های اخیر به‌دلیل در دسترس قرار گرفتن اطلاعات ژنومی و ترانسکریپتومی با استفاده از روش NGS، شناسایی خیلی از گونه‌های تاسماهیان با استفاده از ژن‌های متفاوتی صورت می‌گرفت که از جمله این ژن ها می‌توان به ژن RP2S6 (دومین اینترون ژنی که پروتئین S6 را کد می‌کند) اشاره کرد (Boscari *et al*., 2014; Boscari *et al*., 2017, 2013, 2015). همچنین ناحیهٔ ویژه‌ای که توسط Havelka و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از روش Rad-sequencing و پیدا کردن SNP[4] برای تشخیص گونهٔ فیل ماهی از استرلیاد و تشخیص هیبرید بستر معرفی شد که در این تحقیق نیز این نشانگر، برای بررسی احتمال وجود ژنوم فیل ماهی مورد استفاده قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

۱.۲. تهیه ماهی و نشانگرهای مولکولی

در این تحقیق از تلفیق نشانگرهای میتوکندریایی و

[1] Convention on International Trade in Endangered Species
[2] Control region
[3] Amplified fragment length polymorphism
[4] Single nucleotide polymorphism

هسته‌ای برای بررسی احتمال وجود داشتن هیبرید ماهی شیپ با ماهی فیل استفاده شد. تعداد هفت عدد ماهی مشکوک مولد شیپ حاوی تخمک که به‌نظر می‌رسد مولد ماده شیپ برای تکثیر می‌باشند در سایت چابکسر شناسایی شد که از جهت ریختی با تاسماهی شیپ دریا کمی متفاوت بودند. جنسیت ماده توسط آزمون مولکولی لوکوس ماده در تمامی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و در مرحلهٔ بعد با استفاده از نشانگر تعیین گونهٔ تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) و فیل ماهی (*Huso huso*) که براساس تکثیر قسمتی از مواد وراثتی مادری (میتوکندریایی) می‌باشد؛ گونهٔ مادری این هفت نمونه به‌دست آمد و سپس با استفاده از نشانگر مواد وراثتی هسته‌ای که هم در ژنوم مادری و هم پدری وجود دارد احتمال هیبرید بودن با گونه‌هایی مثل فیل ماهی، استرلیاد (*A. ruthenus*) و ازون‌برون (*A. stellatus*) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲.۲. استخراج DNA نمونه‌های مشکوک ماهی شیپ

تعداد هفت عدد ماهی شیپ مشکوک با روش سونوگرافی ماده تشخیص داده شدند که به‌نظر می‌رسید حاوی تخمک باشند. جداسازی بافت بالهٔ تاسماهیان مشکوک و ذخیره‌سازی در الکل برای استخراج DNA، انجام شد. به‌منظور مقایسهٔ مولکولی این نمونه‌ها با تاسماهیانی که از نظر کروموزومی با تاسماهی شیپ یکسان هستند و امکان هیبرید شدن با این گونه‌های در دسترس و زایا بودن نسل حاصل وجود داشته است مثل فیل ماهی، استرلیاد و ازون‌برون؛ تعداد ۵ نمونه از بافت بالهٔ این گونه‌ها از نمونه‌های خالص این سه گونه (استرلیاد، ازون‌برون و فیل ماهی) جداسازی و در الکل ۹۶ درصد برای استخراج DNA ذخیره سازی شد. به‌منظور استخراج DNA حدود صد میلی‌گرم از بافت بالهٔ پشتی با استفاده از نیتروژن مایع به‌صورت پودر درآمد و استخراج DNA نیز با استفاده از روش استات آمونیوم (Aljanabi and Martinez, 1997) با اندکی تغییر انجام شد. اساس این روش رسوب‌دهی DNA با نمک آمونیوم استات می‌باشد. بافت باله با قیچی و اسکالپل استریل تکه‌تکه شده و با استفاده از هاون و نیتروژن مایع همگن شدند سپس نمونه‌ها به میکروتیوب منتقل شدند. ۴۰۰ میکرولیتر از بافراستریل لیز کننده (تریس-ا سیدکلریدریک ۱۰ میلی‌مولار pH= 8 حاوی نمک کلرید سدیم ۰/۴ میلی‌مولار و EDTA[1] ۲ میلی‌مولار) و ۲۰ میکرولیتر SDS[2] ۲۰٪ و ۸ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر به تیوب‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت همراه با تکان ملایم انکوبه شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمک استات آمونیوم ۷/۵ مولار به هر نمونه اضافه شده و بعد از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی DNA می‌باشد به تیوب جدید منتقل گردید. در مرحلهٔ بعد، حجم مایع رویی اتانول مطلق به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به‌منظور شستشو پلت‌ها، اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و بار دیگر نمونه‌ها به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از خشک شدن کامل پلت DNA در آب مقطر استریل دوبار تقطیر حل شدند.

۳.۲. ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده نمونه‌های مشکوک مولد ماهی شیپ

جهت تعیین کمیت DNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر (ND-1000) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، استفاده شد. برای سنجش میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (غلظت DNA) پس از کالیبره کردن دستگاه نانودراپ با بافر رقیق‌کننده مثل آب، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر اندازه‌گیری گردید. جهت بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده بافت باله روی ژل آگارز ۰/۹ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Ethylenediaminetetraacetic acid
[2] Sodium dodecyl sulfate

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تشخیص گونهٔ ماهی مشکوک

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	اندازه باند تکثیر شده
AllWSex2_F AllWSex2_F (Kuhl *et al*., 2021)	TGATCAACCTCTTCAGCAATGTC TGAGAGCCACTGTACTAACACA	110 bp
NudF HusF SteF AHR (Mugue *et al*., 2008)	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG TATCTA GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG TTACCTGCGAGCAGGCTG	329 bp 374 bp 266 bp
RP2S6_huso_F RP2S6_groupA_R (Boscarri *et al*., 2017)	CATAACATTGCACTGAATGTTATA CTTTCGTTGATTTAGGGAAATGGT	194 bp
F Huso positive R Huso positive	GATCTGAACATCAGCCACTGC TACTGTGCCTGTATGTCTCC	153 bp
F Huso negative R Huso negative (Havelka *et al*., 2017)	GATCTGAACATCAGCCACTGG TACTGTGCCTGTATGTCTCC	153 bp
F ruthenus positive R ruthenus positive	TAAGGGTCCATGCATGCAG TTTTAGCTGCACCGTGGC	247 bp
F ruthenus negative R ruthenus negative (Havelka *et al*., 2017)	TAAGGGTCCATGCATGCCT TTTTAGCTGCACCGTGGC	247 bp

۴.۲. تکثیر ناحیهٔ اختصاصی از ژنوم مادهٔ تاسماهیان برای نمونه‌های مشکوک مولد ماهی شیپ

انتخاب این ناحیه برای تکثیر، بر اساس Kuhl و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد که از ناحیهٔ شناخته‌شده اختصاصی در جنس مادهٔ برخی از تاسماهیان در آنالیزهای ترانسکریپتوم و ژنوم به‌دست آمده بود. این جفت آغازگر (جدول ۱) ناحیهٔ کوچکی را در جنس ماده تکثیر می‌کنند (حدود ۱۱۰ جفت باز) که این ناحیه در جنس نر تکثیر نمی‌شود. برای تکثیر ناحیهٔ مورد نظر از بافر ×2 قرمز شرکت Ampliqon استفاده گردید که برای حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر به اندازهٔ ۵ میکرولیتر از بافر قرمز به میکروتیوب‌های مخصوص PCR اضافه شده و آغازگرها (چپ و راست) با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر به این حجم اضافه شده و مقدار DNA ژنومی به میزان ۲۰ نانوگرم به حجم ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. برنامهٔ حرارتی طبق مقاله، مرجع قرار داده شد و در انتها محصول به‌دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

۵.۲. تکثیر ناحیهٔ ژنوم میتوکندری برای تعیین گونهٔ والد مادری و پدری نمونه‌های مشکوک ماهی شیپ

آغازگرهای مختص گونهٔ شیپ، فیل ماهی و ازون‌برون از مطالعهٔ Mugue و همکاران (۲۰۰۸) برای تکثیر ناحیهٔ اختصاصی مربوط به ماهی شیپ و فیل ماهی انتخاب شد (جدول ۱). برنامهٔ حرارتی برای تکثیر، دقیقاً مثل شرایط مطالعهٔ عنوان شده قرار داده شد و طبق محل قرار گرفتن آغازگر مختص ماهی شیپ، اندازش قطعه‌ای که می‌بایست تکثیر شود در پنل مختص تاسماهیان دریای خزر به اندازهٔ ۳۲۹ جفت باز برای شیپ ،۳۷۴ جفت باز برای فیل ماهی و ۲۶۶ جفت باز برای ازون‌برون می‌باشد. شرایط مواد بکار رفته در واکنش تکثیر این قطعات و نوع مواد مصرف‌شده مانند مرحلهٔ تکثیر اختصاصی لوکوس جنسیت بوده است. برنامهٔ حرارتی بکار رفته برای تکثیر قطعاتی از ژنوم میتوکندریایی منطبق با مطالعهٔ Mugue و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد. در پایان، محصول به‌دست آمده روی آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۶.۲. تکثیر ناحیهٔ ژنوم هسته‌ای برای تعیین احتمال هیبرید بودن نمونه‌های مشکوک ماهی شیپ

براســـاس تحقیق Havelka و هم کاران (۲۰۱۷) و NGS[1] داده‌های ژنوم فیل ماهی و ماهی اســـترلیاد یک منطقهٔ ویژه روی ژنوم هسته‌ای در این دو ماهی یافت شد که براســـاس آن واکنش PCR کنترل مثبت و منفی برای شنا سایی هر گونه و هیبرید حا صل از آن ها طراحی شد (جدول ۱). آغازگرهای مورد ا ستفاده برای هر گونه دارای یک آغازگر (آغازگر راســت) مشــترک می‌باشــند و آغازگر دیگر (آغازگر چپ) تنها در یک نقطهٔ نوکلئوتیدی متفاوت می‌با شد که در کنترل مثبت فیل ماهی این ناحیه تنها در فیل ماهی قابل تکثیر می‌باشــد و برای تاســماهیان دیگر قابل تکثیر نیســـت اما در کنترل منفی به‌جز فیل ماهی برای تاسماهیان دیگر قابل تکثیر می‌باشد. همین وضعیت نیز برای ماهی ا سترلیاد طراحی شده ا ست. قطعهٔ تکثیر شـــده برای فیل ماهی اندازهٔ ۱۵۳ نوکلئوتیدی و قطعهٔ تکثیرشده برای استرلیاد ۲۶۴ نوکلئوتیدی می‌باشند. تمام شرایط واکنش حا صل برا ساس مقاله رفرنس می‌با شد و مح صول به‌د ست آمده روی آگارز ۲ در صد مورد برر سی قرار می‌گیرد. علاوه بر ناحیش مذکور روی کل ژنوم، از آ غازگر SNP[2] گزارش شـــده اینترون دوم ژن پروتئین ریبوزومی[3] در تحقیق Boscari و همکاران (۲۰۱۷) که در فیل ماهی متفاوت با گونه‌های دیگر تاسماهیان می‌باشد و محصــول تولید شــده فقط از ژنوم گونهٔ فیل ماهی تکثیر می‌یابد؛ برای تکمیل دقت کار تشـــخیص وجود ژنوم فیل ماهی در نمونه‌های مشکوک ماهی شیپ نیز استفاده شد.

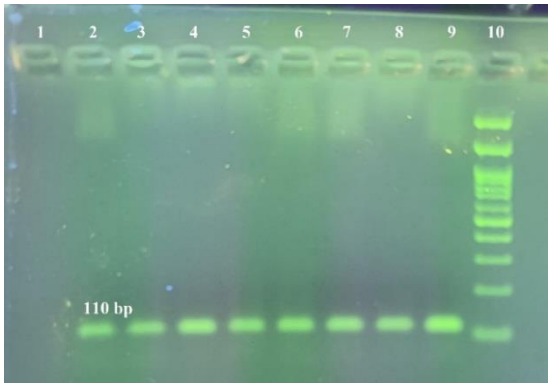
۳. نتایج

براســـاس نتایج کمی غلظت DNA با اســـتفاده از نانو دراپ همگی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر مناسب در دامنهٔ ۲-۱/۸ بودند و غلظت DNA ا ستخراج شده بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود و DNA از کیفیت منا سبی روی ژل برخورداربود (عکس ژل ارائه ن شده). در این تحقیق تکثیر ژنوم نمونه‌های مولدین مشــکوک ماهی شــیپ ماده با آغازگرهای اختصــاصــی مختص ژنوم جنس ماده یک باند واضـــح کمی بزرگتر از ۱۰۰ جفت باز را در روی ژل آگاروز ن شان داد (شکل ۱). همچنین آغازگرهای مربوط به تشـــخیص گونه‌ای تاســـماهیان براســـاس مدل پیشـــن هادی Mugue و هم کاران (۲۰۰۸)، با ند ۳۲۹ نوکلئوتیدی را در مولدین مادهٔ م شکوک تا سماهی شیپ تکثیر کرد که بیانگر این اســـت که والد مادهٔ تاســـماهی م شکوک ماهی شیپ بوده ا ست (شکل ۲) ولی در اکثر مولدین ماده، باندی تو سط آغازگر اخت صا صی فیل ماهی تکثیر نشد یا در برخی بسیار ضعیف تکثیر شد (شکل ۳) اما هیچ تکثیری با اســـتفاده از اغازگرهای اختصـــاصـــی تا سماهی ازون‌برون در تا سماهیان م شکوک شیپ دیده نشد.

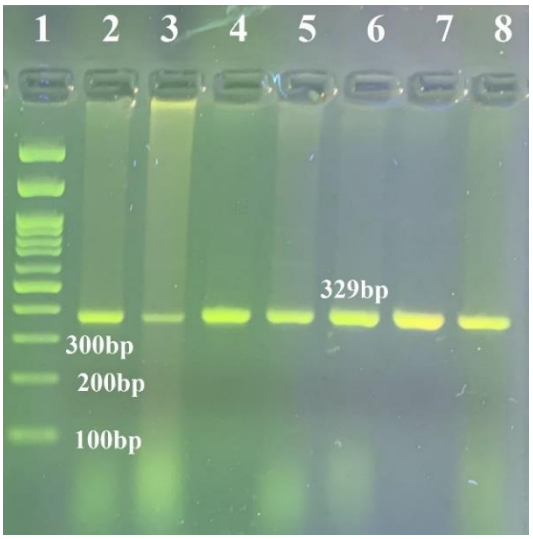
آغازگرهای بکار برده شــده در تکثیر باند اختصــاصــی برای ت شخیص وجود ژنوم تا سماهی ا سترلیاد باند کنترل منفی را در تشـــخیص ژنوم اســـترلیاد در تمامی نمونه‌ها تکثیر کردند (۲۴۷ بازی) و این موضوع نشان داد که هیچ اثری از ژنوم گونهٔ اســـترلیاد در محتوی ژنتیکی نمونه‌های مشـــکوک تاســـماهی شـــیپ وجود ندارد (شـــکل ۴) اما آغازگرهای بکار گرفته شده در تکثیر باند اختصاصی برای تشـــخیص وجود ژنوم فیل ماهی، با ند کنترل مثبت را نمونه‌های م شکوک تا سماهی شیپ تکثیر کردند (شکل ۵) و هیچ باند کنترل منفی تکثیر نشـــد و این نشـــان می‌دهد که اثراتی از ژنوم فیل ماهی در نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ وجود دارد (باند ۱۵۳ بازی) و این نمونه‌ها هیبرید می‌باشــند؛ همچنین به‌منظور تأیید صــحت تکثیر کنترل منفی و مثبت این نشـــانگر در فیل ماهی خالص و شیپ خالص مورد آزمون قرار گرفت (شکل ۶). وجود ژنوم

[1] Next generation sequencing
[2] Single nucleotide polymorphism
[3] Second intron (RP۲) of the nuclear encoded S6 (Ribosomal Protein (RP2S6))

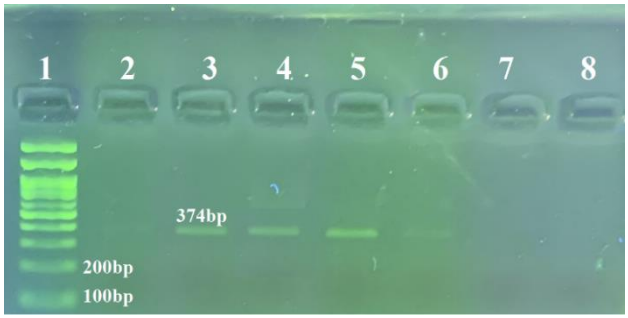
هســـته‌ای فیل ماهی در نمونه های ماهیان مشـــکوک تاسماهی شیپ توسط نشانگر هسته‌ای دیگری هم تأیید شد و نشان داد که نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ، با فیل ماهی هیبرید می‌باشند (شکل ۷).



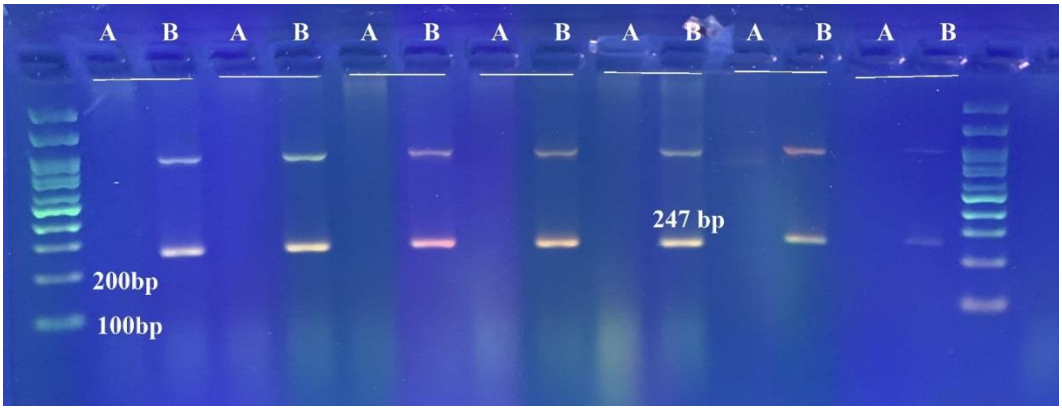
شکل ۱- تکثیر ژن مربوط به تعیین جنسیت در مولدین مادهٔ مشکوک تاسماهی شیپ با استفاده از آغازگرهای AllWSex2 مختص لوکوس ماده (ردیف ۲ تا ۸)؛ ردیف ۱: تاسماهی شیپ نر و ردیف ۹: تاسماهی شیپ ماده و ردیف ۱۰: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون می‌باشد.



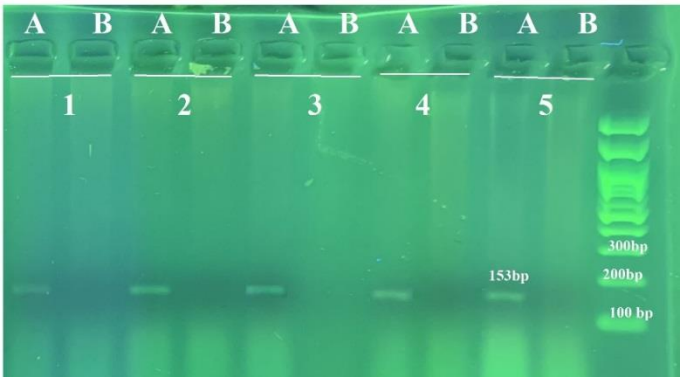
شکل ۲- تکثیر ژن مربوط به تکثیر منطقه D-loop میتوکندری تاسماهی شیپ در نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ؛ همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود این آغازگر که مختص تاسماهی شیپ می‌باشد؛ باند ۳۲۹ بازی را در مولدین مشکوک تکثیر کرده است.



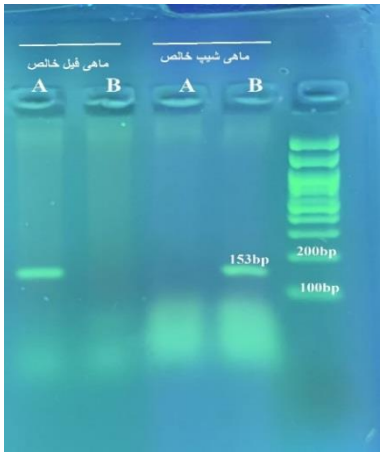
شکل ۳- تکثیر ژن مربوط به منطقه D-loop میتوکندری فیل ماهی در نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ؛ همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود این آغازگر که مختص فیل ماهی می‌باشد؛ باند ۳۷۴ بازی ضعیفی را در برخی از نمونه‌های مولدین مشکوک تکثیر کرده است.



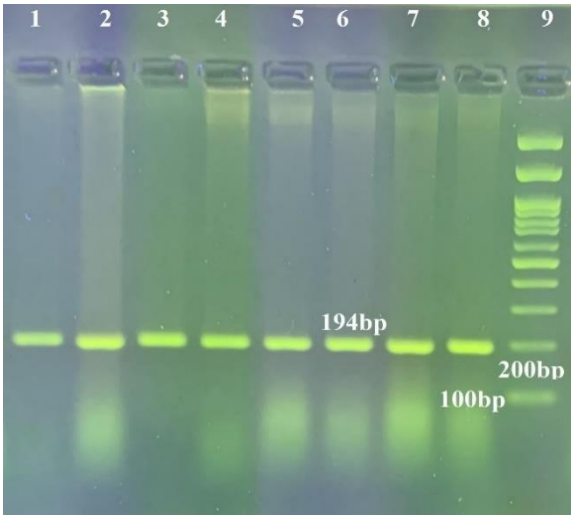
شکل ۴- تکثیر باند کنترل منفی ژن مربوط به نشانگر اختصاصی هسته‌ای استرلیاد در نمونه‌های مشکوک مولدین تاسماهی شیپ؛ ردیف A در صورت تکثیر باند ۲۴۷ بازی دارای قسمتی از ژنوم تاسماهی استرلیاد می‌باشد و در صورت عدم تکثیر در ردیف B کنترل منفی دارای باند خواهد بود که نشان‌دهندهٔ عدم وجود ژنوم تاسماهی استرلیاد در ژنوم مولدین مشکوک تاسماهی شیپ می‌باشد.



شکل ۵- تکثیر باند کنترل مثبت ژن مربوط به نشانگر اختصاصی هسته‌ای فیل ماهی در نمونه‌های مشکوک مولدین تاسماهی شیپ؛ ردیف A در صورت تکثیر باند ۱۵۳ بازی دارای قسمتی از ژنوم فیل ماهی می‌باشد و در ردیف B کنترل منفی دارای باند نمی‌باشد که نشان‌دهندهٔ وجود ژنوم فیل ماهی در تمامی نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ می‌باشد.



شکل۶- تکثیر باند کنترل مثبت ژن نشانگر اختصاصی هسته‌ای فیل ماهی در دو نمونهٔ فیل ماهی خالص و تاسماهی شیپ خالص؛ ردیف A در صورت تکثیر باند ۱۵۳ بازی دارای قسمتی از ژنوم فیل ماهی می‌باشد و در ردیف B کنترل منفی دارای باند نمی‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کنترل مثبت ژن تشخیصی فیل ماهی در نمونهٔ فیل ماهی خالص دارای باند و در کنترل منفی (B) دارای باند نمی‌باشد اما در نمونهٔ تاسماهی شیپ کنترل مثبت ژن اختصاصی هسته‌ای فیل ماهی هیچ باندی تکثیر نشده و به جای آن در کنترل منفی (B) باند دیده می‌شود.



شکل ۷- تکثیر باند نشانگر هسته‌ای مختص فیل ماهی براساس آغازگرهای پیشنهاد شده مطالعهٔ Boscari و همکاران (۲۰۱۷)؛ همان‌طور که مشاهده می‌شود از نمونهٔ ۱ تا ۷ تمامی نمونه‌های مشکوک تاسماهی شیپ دارای باند می‌باشند که نشان‌دهندهٔ وجود ژنوم فیل ماهی در نمونه‌های مشکوک می‌باشد و شمارهٔ ۸ هم باند تکثیر شده در فیل ماهی خالص می‌باشد.

۴. بحث

یکی از چالش‌های موجود در تکثیر و بازسازی ذخایر تاسماهیان دریای خزر استفاده از مولدین کاملاً خالص می‌باشد و به جهت هیبرید شدن برخی گونه‌ها با هم و زایا بودن نسل حاصل، می‌بایست اطلاعات کاملی از وضعیت هیبرید شدن و یا عدم آمیختگی با گونه‌های دیگر به‌دست آید که امروزه توسط بررسی مولکولی در سطح ژنوم تاسماهیان، این مهم امکان‌پذیر شده است و در مراکز تحقیقاتی ایران نیز قابل انجام می‌باشد. سیستم بارکدینگ مولکولی به‌صورت روش مستند برای ارزیابی خاویار و محصولات تاسماهیان مدت‌هاست برای ارزش‌گذاری محصولات خاویار و گوشت تاسماهیان توسط محققین بسیاری مورد استفاده واقع شده است (Waraniak *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2022). همان‌طور که عنوان شد نسل حاصل از هیبریداسیون تاسماهیان به‌علت یکسان بودن عدد کروموزومی برخی از تاسماهیان مثل فیل ماهی، تاسماهی شیپ و ازون‌برون (۱۲۰ کروموزومی) زایا می‌باشند و هیبرید شدن طبیعی بین تاسماهیان در برخی رودخانه‌ها مثل دانوب گزارش شده است (Dudu *et al*., 2011). علاوه بر این، نه تنها بین گونه‌های یک جنس به‌صورت طبیعی بلکه بین گونه‌های جنس‌های متفاوت مثل فیل ماهی و استرلیاد (Birstein *et al*., 1997; Havelka *et al*., 2011) بلکه به‌صورت مصنوعی از جمله بین استرلیاد و تاسماهی سیبری (*A. baerii*) (Ludwig *et al*., 2008) گزارش شده است. هیبریداسیون نه تنها بین تاسماهیان با عدد کروموزومی یکسان بلکه بین تاسماهیان با عدد کروموزومی متفاوت هم دیده شده است (Arefyev, 1998) که از این بین می‌توان به هیبرید بین تاسماهی روسی و فیل ماهی (Bacalbasa-Dobrovici, 1997) در مناطق پایین‌دست رودخانهٔ دانوب؛ هیبریدهای تاسماهی شیپ در رودخانهٔ سفیدرود در آب‌های ایران (Ludwig, 2002) و همچنین گزارش‌های دیگری از هیبریدهایی که بین تاسماهی روسی و ازون‌برون و هیبرید تاسماهی روسی با استرلیاد در آب‌های رودخانهٔ ولگا گزارش شده است که با تحقیقات نشانگرهای جدید روی تاسماهیان از جمله نشانگرهای ریزماهواره‌ها، نشانگرهای میتوکندری و ژنوم هسته‌ای قابل ردیابی می‌باشند.

بارکدینگ DNA به‌طور گسترده برای تعیین گونه‌ها و هیبریدها استفاده می‌شود زیرا واگرایی توالی معمولاً در بین افراد یک گونهٔ خاص بسیار کمتر از گونه‌های نزدیک به هم است (Hebert *et al*., 2003; Hebert *et al*., 2004; Costa *et al*., 2007; Ward *et al*., 2005). با این حال، هیبریداسیون بین گونه‌ها می‌تواند باعث عدم قطعیت طبقه‌بندی شود. از آنجا که mtDNA[1] از طریق مادر به ارث می‌رسد، هر نسل هیبریدی یا نسل بعدی فقط mtDNA مادری خواهد داشت (Ward *et al*., 2005) و این روش برای شناسایی گونه‌ها و هیبرید کاملاً مؤثر نمی‌باشد (Rehbein, 2013). Ghadirnejad و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از ناحیهٔ بارکدینگ *COI* تعداد ۳ گونه از ۵ گونهٔ تاسماهیان دریای خزر را به درستی از هم تفکیک کردند اما باید عنوان کرد که در بسیاری از موارد، ناحیهٔ بارکدینگ *COI* برای برخی از گونه‌های تاسماهیان مثل تاسماهی شیپ و ازون‌برون درBlast بانک ژن مثل هم می‌باشد. در مطالعهٔ حاضر پس از مشخص شدن اینکه مولدین مشکوک تاسماهی شیپ، مولدینی از نظر مولکولی کاملاً ماده و مولد می‌باشند (Kuhl *et al*., 2020)؛ والد مادری تاسماهیان مشکوک با آغاگرهای مختص گونه‌های تاسماهیان براساس مطالعهٔ Mugue و همکاران (۲۰۰۸)، باند قوی ۳۲۹ نوکلئوتیدی را تکثیر کرد که نشان‌دهندهٔ این است که والد مادری این ماهیان مشکوک تاسماهی شیپ می‌باشد اما هیچ باندی با آغازگرهای ازون‌برون تکثیر نشد و تنها باند بسیار ضعیفی با آغازگرهای فیل ماهی تکثیر شد که علت تکثیر ضعیف آغازگر فیل ماهی با ژنوم تاسماهی شیپ شباهت برخی از نوکلوتیدها در برخی محل‌های اتصال آغازگر فیل ماهی با ژنوم تاسماهی شیپ است که با استفاده از Blast ژنی نیز قابل دستیابی می‌باشد. این نتایج در مورد گونه‌های بحث برانگیز در "مجتمع تاسماهی روس"[2] که شامل گونه‌هایی مثل تاسماهی روسی، تاسماهی ایرانی، تاسماهی سیبری و تاسماهی آدریاتیک (*A. naccari*) نیز صدق می‌کند که به‌طور قطع نمی‌توان با استفاده از تنها یک ژن بارکدینگ میتوکندریایی گونهٔ تاسماهی را تشخیص داد و این نتایج توسط تحقیقات Boscari و همکاران در (۲۰۱۴، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۷) نیز تأیید شده است. از طرفی، علت پهلوگیری آغازگرهای فیل ماهی با ژنوم تاسماهی شیپ را هم می‌توان به هتروپلاسمی ژنوم تاسماهیان نسبت داد و هتروپلاسمی خصوصاً در DNA میتوکندری تاسماهیان توسط برخی از محققین گزارش شده است (Ludwig, 2000; Dudu *et al*., 2011). Dudu و همکاران (۲۰۲۲) نیز نشانگرهای میتوکندری مورد استفاده برای شناسایی فیل ماهی و شیپ براساس مطالعهٔ Mugue و همکاران (۲۰۰۸) را نیز که در تحقیق حاضر بکار برده شده است را تأیید کردند. همچنین در این تحقیق، داده‌های حاصل از تکثیر باند کنترل منفی با استفاده از آغازگرهای ژن نشانگر تاسماهی استرلیاد نشان داد که ژنوم تاسماهی مشکوک شیپ، حاوی اثراتی از ژنوم ماهی استرلیاد نمی‌باشد و فقط باند کنترل منفی ۲۴۷ نوکلئوتیدی را تکثیر کرده‌اند ولی از آنجا که کنترل مثبت آغازگرهای فیل ماهی در این تحقیق در تمامی نمونه‌ها باند مورد نظر ۱۵۳ نوکلئوتیدی را تکثیر کردند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژنوم ماهیان مشکوک ماهی شیپ، خالص نبوده و حاوی ژنوم فیل ماهی می‌باشد. تکرارپذیری تکثیر باند کنترل مثبت در این تحقیق گویای این مساله بود که ژنوم تاسماهی مشکوک قطعاً حاوی ژنوم فیل ماهی می‌باشد. این نتایج منطبق با بررسی اثراتی از ژنوم فیل ماهی و استرلیاد و هیبریدهای آن‌ها (Havelka و همکاران ۲۰۱۷) و تشخیص و افتراق با تاسماهیانی مثل تاسماهی سیبری، تاسماهی آمور (*A. gueldenstaedtii*) تاسماهی روسی (*A. persicus*) ، ازون‌برون، تاسماهی ایرانی (*A. transmontanus*) ، تاسماهی سفید (*A. mikadoi*) ، تاسماهی سا خالین (*H. dauricus*) و کالوگا (*H. dauricus*) که انجام شده و فقط یک مورد هیبرید بین استرلیاد و ازون برون در مطالعه

[1] Mitochondrial DNA
[2] Gueldenstaedtii complex

آن‌ها قابل تشـــخیص نبود؛ می‌باشـــد. علاوه بر این تأیید وجود ژنوم فیل ماهی با نشانگر دیگری که کاملاً مخصوص فیل ماهی می‌باشـد (اینترون دوم ژن پروتئین ریبوزومی) نیز در این تحقیق تأیید شـــد که دقیقاً باند برابر با ۱۹۴ نوکلئوتیدی را در تاسماهیان مشکوک ماهی شیپ و ماهی فیل خالص تکثیر کرد که در تاسماهیان دیگر تکثیر نشد و این نتایج منطبق با نتایج Boscari و همکاران (۲۰۱۷) می باشد که با استفاده از نشانگرهای هسته‌ای فیل ماهی، نشـانگر ویژه‌ای برای ردیابی این گونه گزارش کردند. البته باید اشاره نمود که بازدۀ شناسایی و ردیابی هیبریدها به انتقال کروموزوم فیل ماهی که ژن مورد نظر هســـته‌ای روی آن قرار دارد بستگی دارد و معمولاً نسل اول هیبرید به‌راحتی قابل تشخیص هستند ولی نسل‌های دیگر مثل نسل F2 و F3 به جهت مدل توارث مندلی ممکن است به سـختی قابل ردیابی نباشـد و به همین جهت اسـت که از چندین نشانگر یگ گونه مثل فیل ماهی استفاده می شود که اطمینان حاصـــل شـــود که در طول شـــجره‌نامۀ چند نسـلی، یکی از این نشـانگرها با موفقیت انتقال داده شـده است.

۵. نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشـان دادکه با اسـتفاده از اطلاعات ژنوم میتوکندری و چند نشانگر هسته‌ای به صورت مرحله به مرحله می‌توان علاوه بر مشـــخص نمودن والد مادری گونۀ مشـــکوک ماهی شـــیپ، احتمال هیبرید بودن آن و اختلاط ژنوم آن با ژنوم فیل‌ماهی را مشخص کرد. از نتایج این تحقیق می‌توان برای بررسی هیبریداسیون تاسماهیان مختلف با فیل ماهی نیز، استفاده نمود.

۵. منابع

References

Aljanabi, M., Martinez, L., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(222), 4692-4693.

Arefyev, V.A., 1997. Sturgeon hybrids: natural reality and practical prospects. *Aquaculture Magazine* 23(3), 52-58.

Bacalbasa-Dobrovici, N., 1997. Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its delta. Sturgeon Biodiversity and Conservation, pp: 201-207.

Barmintseva, A.E., Mugue, N.S., 2013. The use of microsatellite loci for identification of sturgeon species (Acipenseridae) and hybrid forms. *Russian Journal of Genetics* 49, 950-961.

Birstein, V. J., Hanner, R., DeSalle, R., 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *Sturgeon Biodiversity and Conservation* pp: 127-155.

Boscari, E., Barminsteva, A., Pujolar, J. M., Doukakis, P., Mugue, N., Congiu, L., 2014. Species and hybrid identification of sturgeon caviar: a new molecular approach to detect illegal trade. *Molecular Ecology Resources* 14(3), 489-498.

Boscari, E., Vidotto, M., Martin, D., Papetti, C., Ogden, R., Congiu, L., 2015. Microsatellites from the genome and the transcriptome of the tetraploid Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii* (Bonaparte, 1836) and cross-species applicability to the diploid beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 31(6), 977-983.

Boscari, E., Vitulo, N., Ludwig, A., Caruso, C., Mugue, N.S., Suciu, R., Congiu, L., 2017. Fast genetic identification of the Beluga sturgeon and its sought-after caviar to stem illegal trade. *Food Control* 75, 145-152.

Costa, F.O., DeWaard, J.R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Hajibabaei, M., Hebert, P.D., 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64(2), 272-295.

Dudu, A., Georgescu, S. E., Berrebi, P., Costache, M., 2012. Site heteroplasmy in the mitochondrial cytochrome *b* gene of the sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus. Genetic and molecular Biology* 35(4), 886-891.

Dudu, A., Suciu, R., Paraschiv, M., Georgescu, S. E., Costache, M., Berrebi, P., 2011. Nuclear markers of Danube sturgeons' hybridization. *International journal of molecular Sciences* 12(10), 6796-6809.

Dudu, A.; Samu, M.; Maereanu, M.; Georgescu, S.E. 2022. A Multistep DNA-Based Methodology for Accurate Authentication of Sturgeon Species. *Foods* 11(7), 1007.

Havelka, M, Kašpar, V., Hulák, M., Flajšhans, M., 2011. Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. *Folia Zoologica* 60(2), 93-103.

Havelka, M., Fujimoto, T., Hagihara, S., Adachi, S., Arai, K., 2017. Nuclear DNA markers for identification of Beluga and Sterlet sturgeons and their interspecific Bester hybrid. *Scientific Reports* 7(1), 1-8.

Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270(1512), 313-321.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* 2(10), e312.

Ghadirnejad, H., 2009. Barcoding of Five Sturgeon Species in Iran'Hassan Ghadirnejad, *" MN Siti Azizah," Aliakbar Salehi," Kamran Aghili,"Katialisa Kamaruddin,"A FJ Jamsari and "Lim Hong Chiun" Golestan Fisheries Research Center (GFRC), PO Box 139, Gorgan, Golestan Province, Iran "School of Biological Sciences, University Sains Malaysia, Penang, Malaysia. *Journal of Molecular Genetics l* 2(4), 29-34.

Johnson, T.A., Iyengar, A., 2015. Phylogenetic evidence for a case of misleading rather than mislabeling in caviar in the United Kingdom. *Journal of Forensic Science* 60 (Suppl 1), S248-53.

Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst, P. A., Artyukhin, E., Ludwig, A. 2008. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 36-45.

Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J., Holostenco, D., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 376(1832), 20200089.

Ludwig, A., May, B., Debus, L., Jenneckens, I., 2000. Heteroplasmy in the *mtDNA* Control Region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*), *Genetics*, Volume 156, Issue 4, 1 December 2000, pp: 1933-1947.

Ludwig, A., Debus, L., Jenneckens, I., 2002. IV. Chemical and Biochemical Composition of Sturgeon Products a Molecular Approach to Control the International Trade in Black Caviar. *International Review of Hydrobiology*, 87(5), 661-674.

Ludwig, A. 2008. Identification of Acipenseriformes species in trade. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 2-19.

Mugue, N.S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S., M., Mugue, V.N., Barmintsev V., 2008. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight Sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Russian Journal of Genetics* 44(7), 793-798.

Ogden, R., Gharbi, K., Mugue, N., Martinsohn, J., Senn, H., Davey, J.W., Pourkazemi, M., McEwing, R., Eland, C., Vidotto, M., Sergeev, A. 2013. Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing. *Molecular Ecology* 22(11), 3112-3123.

Rehbein, H., 2013. Difference of fish species by PCR-based DNA analysis of nuclear genes. *European Food Research and Technology* 236, 979-990.

Rozhkovan, K.V., Chelomina, G.N., Rachelek, E.I. 2008. Molecular identification and the features of genetic diversity in interspecific hybrids of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii x A. baerii, A. baerii x A. schrenckii, A. schrenckii x A. ruthenus, and A. ruthenus x A. schrensckii*) based on variability of multilocus RAPD markers. *Genetika* 44, 1453-1460.

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B. H., Last, P.R., Hebert, P.D., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462), 1847-1857.

Waraniak, J.M., Blumstein, D.M., Scribner, K.T., 2018. Barcoding PCR primers detect larval lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in diets of piscine predators. *Conservation Genetics Resources* 10(2), 259-268.

Zhang, X., Tinacci, L., Xie, S., Wang, J., Ying, X., Wen, J., Armani, A., 2022. Caviar products sold on Chinese Business to customer (B2C) online platforms: Labelling assessment supported by molecular identification. *Food Control* 131, 108370.