شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۳۶۲-۳۵۱

تشخیص سریع چهار گونه از تاسماهیان جنس *Acipenser* حوضه دریای خزر و تاسماهی سیبری با استفاده از روش تکثیر ژنوم میتوکندریایی

شیرین جمشیدی[۱*]، مریم منصف شکری[۲]، محمد حسن زاده صابر[۳]

۲،۱. استادیار انستیتو بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج، رشت ایران

۳. مربی انستیتو بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج، رشت ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰ /۰۳/۰۳

چکیده

در این تحقیق تشخیص گونه‌های تاسماهیان براساس تکثیر ژنوم میتوکندری (ناحیه کنترلی D-loop) و بررسی اختلاف اندازه باند روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی تاسماهیان دریای خزر و تاسماهی سیبری ۱۴۰ عدد بود. پس از استخراج DNA برای تکثیر ناحیه کنترلی D-loop از آغازگرهایی استفاده شد که آغازگر راست در تمامی گونه‌ها یکی و آغازگرهای چپ متفاوت بودند و این آغازگرهای چپ طوری انتخاب شدند که اندازه قطعه‌های گونه‌های مختلف، متفاوت باشد. نتایج بیانگر این بود که برای همه گونه‌های تاسماهیان دریای خزر و تاسماهی سیبری، به غیر از فیل ماهی، قطعه مورد نظر تکثیر شده، نشان دهنده گونه برای آن نمونه باشد. این روش به جهت آسان بودن و تشخیص سریع گونه‌ها، می‌تواند برای ردیابی تقلب در محصولات شیلاتی حاصل از تاسماهیان و خاویار آنها به کار گرفته شود. اما به جهت اینکه ژنوم میتوکندری تنها وراثت مادری دارد؛ برای ردیابی تکمیلی بایستی بررسی کل ژنوم تاسماهیان برای هر گونه انجام شود تا نقاط موردنظر برای ردیابی اختلاف گونه‌های تاسماهیان دریای خزر در سطح ژنوم هسته‌ای هم بدست آمده و بتوان از تلفیق اختلاف در سطح ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای گونه‌ها، ارزیابی تشخیصی و بارکدینگ نمونه‌های مورد نظر در محصولات شیلاتی، بهداشتی و آرایشی حاصل از تاسماهیان دریای خزر را مورد استفاده قرار داد.

واژگان کلیدی: ژنوم میتوکندری، D-loop، تاسماهیان دریای خزر، تاسماهی سیبری، تشخیص.

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

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 2, Summer 2021
pp. 351-362

Rapid detection of 4 species of *Acipenser* genus in the Caspian Sea Basin sturgeons and Siberian sturgeon using mitochondrial genome amplification method

Shirin Jamshidi[1*], Maryam Monsef Shokri[2], Mohammad Hassanzade Saber[3]

1,2. Assistant professor, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

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

Received: 18-Feb-2021 **Accepted: 24-May-2021**

Abstract

In this study, sturgeon species were identified based on mitochondrial genome amplification (D-loop control region) and band size differences by agarose gel. For this purpose, a total of 140 Caspian Sea sturgeons and Siberian sturgeons were selected. After DNA extraction, primers were used to amplify the D-loop control region. The right primers were the same in all species but the left primers were different and they were selected such that the size of different species was distinct. Based on the obtained results, the desired bands for all species of Caspian Sea sturgeon and Siberian sturgeon, except Beluga, were amplified which represents the species for that sample. This method is a useful approach for detection of fraudulent mislabeling of the fishery products including sturgeon and caviar due to its ease and rapid execution. However, since the mitochondrial genome has only maternal inheritance, for additional tracking, the whole genome of sturgeon should be studied for each species in order to obtain the desired points for tracking the differences of Caspian Sea sturgeon at the nuclear genome level, thereby a diagnostic evaluation as well as barcoding of samples of fishery, health and cosmetic products from Caspian sturgeon can be done by combining differences at the mitochondrial and nuclear genome levels of the species.

Keywords: Mitochondrial genome, D-loop, Caspian Sea Sturgeons, Siberian sturgeon, detection.

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

۱. مقدمه

بر اساس اطلاعات مجمع بین‌المللی گونه‌های در معرض خطر انقراض (CITES)، تمامی گونه‌های خانواده تاسماهیان حوضه دریای خزر حفاظت شده بوده و بسیاری از آن‌ها در معرض خطر انقراض می‌باشند. بر اساس Pappalardo و همکاران (۲۰۱۵) خاویار سه گونه دیگر غیر از تاسماهیان(*Cyclopterus lumpus*، *Eumicrotremus orbis* و *Mallotus villosus*)؛ ممکن است به جای خاویار تاسماهیان به صورت تقلبی به فروش برسد و مهمترین راه در شناسایی محصول اصل استفاده از روش مولکولی است که در مطالعات تشخیص هویتی برای شناسایی موجودات به کار می‌رود. برای ردیابی مولکولی و شناسایی موجودات از نشانگرهای متفاوتی جهت تشخیص خانواده، جنس و گونه استفاده می‌شود. نشانگرهای گونه و جنس می‌توانند روی DNA هسته‌ای و میتوکندری باشند؛ که در حالت اول مزیت این را دارد که نه تنها در گونه‌های خالص بلکه در هیبریدها به راحتی قابل ردیابی باشد. در حالت دوم نیز سهولت کار به جهت بالا بودن تعداد کپی‌های DNA میتوکندریایی را دارا می‌باشد (Mugue *et al*., 2008). ژن‌های DNA میتوکندریایی به جهت جهش بالاتر برای شناسایی و ردیابی گونه‌ها استفاده می شوند (Tang *et al*., 2006). میزان جهش در ناحیه(control region) از بقیه قسمت‌های میتوکندری به جز چندین مورد استثنا، بیشتر است. معمولاً شناسایی اولیه مولکولی در جانوران با استفاده ازتوالی ژن بارکدینگ انجام می شود که ژن *COI* است (Dawnay *et al*., 2007). Wong و Hanner (۲۰۰۸) با بررسی مولکولی و توالی ژن *COI* گوشت ماهی موجود در فروشگاه های شمال آمریکا و کانادا به این نتیجه دست پیدا کردند که حدود ۲۵ درصد از این محصولات تقلبی بوده و در نهایت به این موضوع رسیدند که روش مولکولی بارکدینگ ژن های میتوکندری روش قدرتمندی برای بررسی است. Briestein و همکاران (۱۹۹۸) و Ludwig و همکاران (۲۰۰۲) از یکی از ژن‌های میتوکندری (سیتوکروم اکسیداز *b*) برای ردیابی و بارکدینگ ماهیان خاویاری استفاده کردند که برای تایید مطالعات آن‌ها نیاز به تعداد بالایی از واکنش زنجیره پلی‌مراز یا هضم آنزیمی بود. همچنین تایید نتایج با استفاده از توالی‌یابی، انجام شد که کار را طولانی تر می‌کرد. Pappalardo و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از خاویار تاسماهیان و روش PCR-RFLP اقدام به شناسایی برخی از گونه‌های تاسماهیان کردند. Jamshidi و همکاران در سال ۲۰۲۰ با استفاده از توالی‌یابی ناحیه بارکدینگ *COI* و سیتوکروم *b* در عصاره و کرم خاویار DNA تاسماهیان را شناسایی و گزارش کردند که ردیابی آن‌ها منجر به شناسایی گونه تاسماهیان مصرف شده در محصول بود. تفاوت گونه‌های تاسماهیان توسط Mugue و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از چند شکلی ژن D-loop در تاسماهیان مختلف گزارش شد که قابل ردیابی روی ژل آگارز بودند. در تحقیق حاضر بر اساس تفاوت‌های مولکولی بین DNA میتوکندری گونه‌های تاسماهیان و بر اساس تحقیق Mugue و همکاران (۲۰۰۸) طرح روش شناسایی تاسماهیان دریای خزر با استفاده از ناحیه CR از ژنوم میتوکندری اجرا شد. بر اساس این روش، گونه‌های تاسماهیان حوضه دریای خزر بر اساس اندازه قطعه‌ای که توسط روش زنجیره پلی‌مراز (PCR) روی ژل آگارز قابل کپی است مورد شناسایی قرار گیرند. این روش به جهت بررسی سریع و کارآمد ارزش فراوانی در ردیابی مولکولی تاسماهیان دریای خزر تاسماهیان دارد. فرضیه تحقیق در این پژوهش بر این اساس بود که آیا قطعه تکثیر شده از DNA ناحیه کنترلی D-loop استخراج شده در بافت جانور می تواند نشان دهنده ویژگی ژنتیکی منحصر به فرد تاسماهیان برای شناسایی در سطح گونه باشد؟ در صورت مثبت بودن، می توان از این روش به عنوان روش تشخیصی سریع و کارآمد برای تشخیص گونه ها استفاده کرد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده‌سازی نمونه‌ها و استخراج DNA از بافت باله تاسماهیان

از پنج گونه تاسماهیان دریای خزر یعنی تاسماهی

ایرانی و رو سی، تا سماهی شیپ، ازون برون، فیل ماهی و همچنین دو گونه تاسماهی رودخانه ولگا (استرلیاد) و تاسماهی سیبری تعداد ۱۴۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف و در سال‌های مختلف نمونه‌برداری در دریای خزر مورد به دست آمد. مشخصات محل‌های جغرافیایی نمونه‌های گونه‌های تاسماهیان دریای خزر در جدول ۱ آورده شده است. برای نمونه‌های تاسماهی سیبری و استرلیاد از نمونه‌های پرورشی موجود در بخش تکثیر و پرورش موسسه تحقیقات تاسماهیان دریای خزر استفاده شد. برای استخراج DNA از گونه‌های خالص تاسماهیان دریای خزر و تاسماهی سیبری و استرلیاد موجود در موسسه تحقیقات تا سماهیان دریای خزر ا ستفاده شد. ا ستخراج DNA توسط کیت DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) با اندکی تغییرات انجام شد. بدین منظور حدود صد میلی گرم از بافت باله یا ع ضله ماهی با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر آمده و بقیه مراحل ا ستخراج DNA در ست به مانند روش ا ستخراج از بافت انجام شد.

جدول ۱- مشخصات و مکان جغرافیایی نمونه‌های ماهی به کار برده شده در این تحقیق

تکثیر موفق در روش PCR	تعداد نمونه‌هایی که با روش PCR ارزش‌گذاری شده‌اند	محل جغرافیایی گرفتن نمونه‌ها	تعدادنمونه‌ها	گونه‌ها
موفق	۳۲ نمونه	نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر، قزاقستان، روسیه، ترکمنستان، آذربایجان، دریاچه آرال و ولگا	۳۶ عدد	*Acipenser gueldenstaedtii*
ناموفق	-	بخش تکثیر وپرورش موسسه تاسماهیان دریای خزر و نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر	۱۲ عدد	*Acipenser persicus*
موفق	۲۰ نمونه	نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر، دریاچه آرال	۲۰ عدد	*Acipenser nudiventris*
موفق	۴۰ نمونه	نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر، دریاچه آرال	۴۰ عدد	*Acipenser stellatus*
موفق	۱۰ نمونه	بخش تکثیر وپرورش موسسه تاسماهیان دریای خزر	۱۰ عدد	*Acipenser ruthenus*
موفق	۱۰ نمونه	بخش تکثیر و پرورش موسسه تاسماهیان دریای خزر	۱۰عدد	*Acipenser baerii*
ناموفق	-	نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر،قزاقستان، روسیه، ترکمنستان، آذربایجان، دریاچه آرال و ولگا	۱۲ عدد	*Huso huso*

۲.۲. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از بافت باله تاسماهیان

جهت تعیین کمیت DNAهای استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری (استفاده از نانودراپ ND2000) 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 رقیق کننده مثل آب یا TE، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب ng/µl اندازه‌گیری گردید. DNAهای ا ستخراج شده بافت باله یا عضله تاسماهیان روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

۲.۳. انتخاب آغازگر برای ناحیه CR ژنوم میتوکندری و واکنش زنجیره پلی‌مراز برای آن

براساس مطالعه Mugue و همکاران (۲۰۰۸) آغازگرهایی با اندازه قطعه‌ای متفاوت؛ در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفت به گونه‌ای که آغازگر راست (reverse) مشترک برای تاسماهیان خزر از منطقه کوچکی انتخاب شدکه در غالب تا سماهیان حفاظت شده بود و تغییر نمی‌کرد (آغازگر AHR) و به جهت این که در برخی گونه‌ها و یا جمعیت‌ها تکرارهای ۸۲ نوکلئوتیدی در

ناحیه '3 مشاهده شده است. علاوه بر آغازگر AHR آغازگر دیگری با نام AHR3 انتخاب شد ولی آغازگرهای چپ (forward) اختصاصی (specific) بود و برای هر گونه طراحی شد تا قادر باشد به شکل ویژه DNA یک گونه خاص تاسماهی را تکثیر کند (جدول۲). چون در دریای خزر ۳۰ در صد از تا سماهیان رو سی دارای ژنوتیپ شبه سیبری در جایگاه ژنوم میتوکندری خود اند (Briestein *et al*., 2000; Jenneckens *et al*., 2000)؛ برای مشخص نمودن نوع ژنوتیپ تاسماهی روسی از روش multiplex PCR استفاده شد تا در صورت وجود هر ژنوتیپ نوع آن در تاسماهی روسی مشخص شود.

برای هر جفت آغازگر ویژه یک گونه از تاسماهیان دریای خزر، کار مناسب سازی دما با استفاده از روش PCR gradient صورت پذیرفت و در آن دما تمامی نمونه‌ها تکثیر شد و روی ژل آگارز ۲ در صد برده شدند. برای تاسماهیان روسی روش multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM و آغازگر AHR استفاده شد. چون تاسماهی ایرانی قرابت ژنتیکی بالایی با تاسماهی روسی دارد روش multiplex PCR برای تاسماهیان ایرانی نیز به کار برده شد. برای تاسماهیان سیبری هم روش single PCR و هم multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای ABF, ABRAM و آغازگر AHR استفاده شد. در تا سماهی سیبری در صورت وجود دو جفت آغازگر دو باند دیده می شود.

جدول ۲- اسامی و توالی آغازگرهای به کارگرفته شده برای گونه‌های تاسماهیان دریای خزر و تاسماهی سیبری

گونه‌ای که مورد شناسایی	اندازه قطعه تکثیر شده برای شناسایی یک گونه	آغازگرهای همراه باهم برای شناسایی یک گونه	توالی نوکلئوتیدی	نام آغازگر
همه گونه‌ها	-	همه آغازگرهای چپ	TATACACCATTATCTCTATGT	AHR
همه گونه‌ها	-	همه آغازگرهای چپ	CATACCATAATGTTTCATCTACC	AH3
تاسماهی روسی	۴۲۰	AHR	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA	AGF
تاسماهی روسی شبه تاسماهی سیبری - تاسماهی سیبری	۲۱۵	AHR	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	ABF
تاسماهی سیبری	۱۳۸	ABF	TGTCTGTCTAGAACATAtG	ABRAM
فیل ماهی	374	AHR,AH3	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	HusF
تاسماهی شیپ	۳۲۹	AHR	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC	NudF
استرلیاد	190	AHR	GGGAATAACCGTTAATTTGG	RutF
ازون برون	266	AHR	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG	SteF

۲.۴. ارزیابی کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

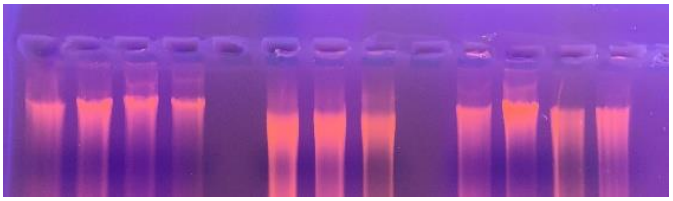
برای تهیه ژل ۲ درصد مقدار ۸۰ میلی لیتر بافر ۰/۵X از TBE تهیه و ۱/۶ گرم از پودر آگارز در ظرفی به آن اضافه شد و روی حرارت قرار داده شد تا آگارز در محلول حل و بی رنگ شود. زمانی که دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، مقدار ۳میکرولیتر از safe stain به آن اضافه و محلول کاملاً به هم زده شد و روی سینی ژل ریخته و شانه داخل ژل قرار داده شد. پس از سرد شدن ژل، شانه از ژل در آورده شده تا چاهک‌ها ایجاد شوند. مقدار ۲میکرولیتر از محصول PCR همراه با دو میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملا مخلوط و با دقت به هریک از چاهک‌های ژل ریخته شد. مخزن الکتروفورژ به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۱۰۰ولت تنظیم گردید. پس از رسیدن بافر سنگین کننده

به انتهای ژل مورد نظر روی دستگاه UV ترانس ایلیو مینیاتور مدل Vilber Lourmat منتقل گردید و کیفیت محصول PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

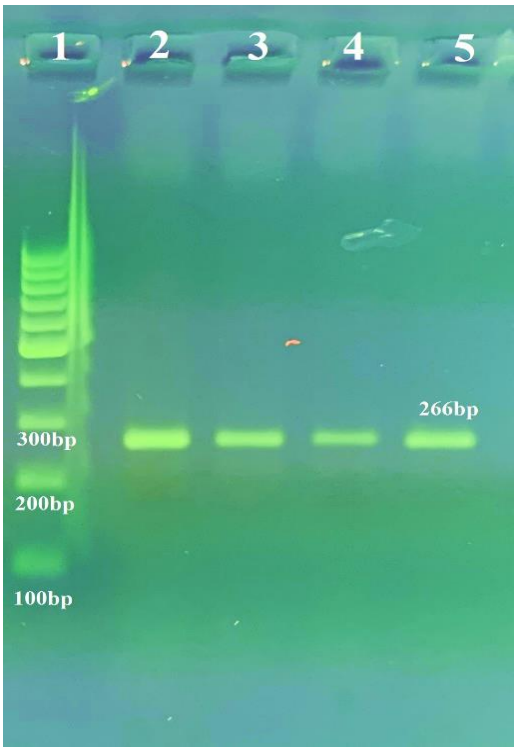
۳. نتایج

براساس نتایج کمی غلظت DNA با استفاده از نانو دراپ همگی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر مناسب در دامنه ۲-۱/۸ بودند و هر کدام بین ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود (شکل ۱).

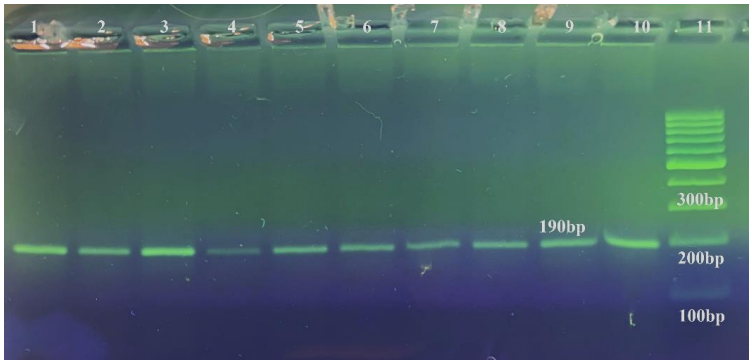
شکل‌های ۲ تا ۷ نتایج واکنش زنجیره پلی‌مراز به ترتیب برای ماهی ازون برون، استرلیاد، تاسماهی ایرانی، تا سماهی رو سی، تا سماهی شیپ، تا سماهی سیبری را نشان می‌دهد. هیچ باندی برای فیل ماهی و تاسماهی ایرانی تکثیر نشد.



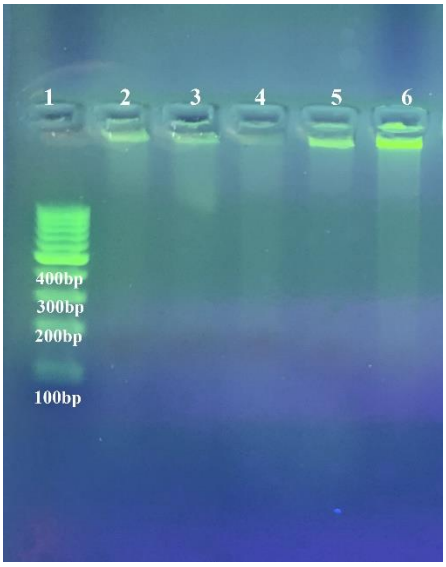
شکل ۱- DNA استخراج شده بافت باله و عضله تاسماهیان دریای خزر برای استفاده در واکنش زنجیره پلی‌مراز با استفاده از کیت Qiagen.



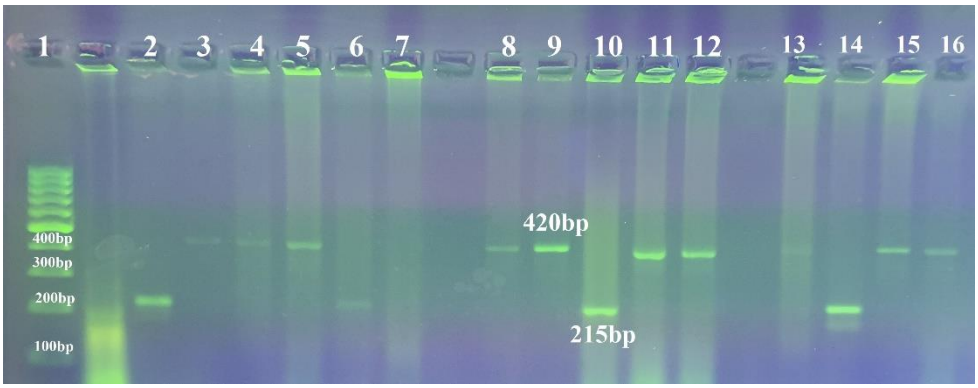
شکل۲- قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای AHR و SteF در اوزون برون(*Acipenser stellatus*).



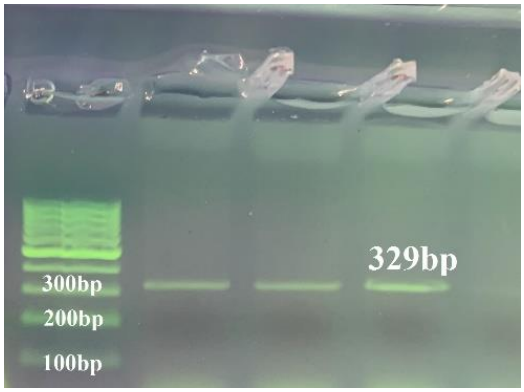
شکل۳- قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای AHR و RutF در استرلیاد (*Acipenser ruthenus*).



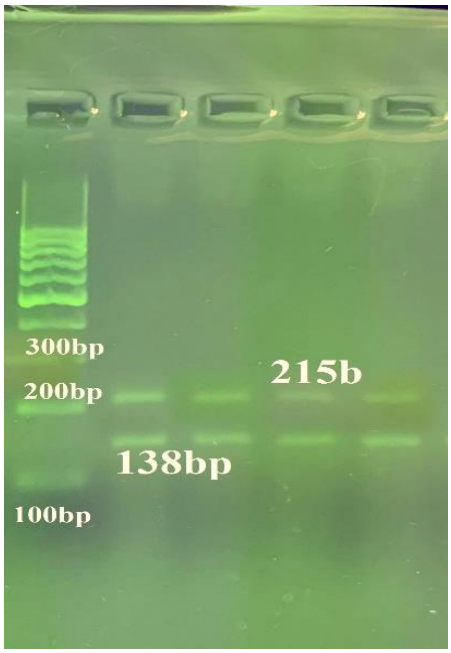
شکل۴- هیچ باندی در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با آغازگرهای تاسماهی روسی و تاسماهی روسی شبه سیبری تکثیر نشده است.



شکل ۵- تکثیر باندهای ۴۲۰ بازی و ۲۱۵ بازی محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز با مخلوط آغازگرهای تاسماهی روسی و تاسماهی سیبری (multipelex PCR) در تاسماهی روسی *Acipenser gueldenstaedtii*؛ برخی از نمونه‌های تاسماهی روسی(نمونه‌های ۶،۱۰،۱۴ و ۲) دارای ژنوتیپ شبه تاسماهی سیبری در جایگاه D-loop خودند.



شکل۶- قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای AHR و NudF در تاسماهی شیپ(*Acipenser nudiventris*)



شکل۷- قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای ABRAM، AHR و ABF در تاسماهی سیبری(*Acipenser baerii*)

۴. بحث

یکی از چالش های موجود در بخش تحقیقات مولکولی آبزیان، ردیابی و شناسایی گونه های تاسماهیان از غیر تاسماهیان و پیدا کردن سیستمی برای تشخیص سریع گونه ها از هم به روش مولکولی است. امروزه با فن آوری جدید زیستی مثل بررسی ژن هایی که در شناسایی گونه (Specific diagnostic) نقش دارند؛ قابل ردیابی اند و امکان تایید محصولات ارزشمندی که از تاسماهیان به دست می آید مثل تشخیص گوشت ماهی و خاویار امکان پذیر شده است. در صورت موجود بودن امکانات بررسی توالی ژنی و توالی یابی از چند روز تا چند هفته وجود دارد و قابلیت جواب دهی به متقاضیان تعیین کیفیت نمونه ها یا محصول ایجاد شده است. با این وجود، به روشی نیاز است که ساده تر و به امکانات کمترنیاز داشته باشد و در مدت زمان کوتاه تر بتوان به نتیجه رسید. در پژوهش حاضر، با توجه به تفاوت اندازه باند مشاهده شده روی ژل آگارز به طور راحت و ساده ای و با ابزارهایی که در همه آزمایشگاه های مولکولی موجود است، در مدت چند ساعت

این کار انجام شد، و گونه هایی مثل تاسماهی شیپ، ازون برون، استرلیاد، سیبری و تاسماهی روسی در مدت زمان بسیار کوتاه شناسایی و از هم جدا شدند.

Pappalardo و همکاران (۲۰۱۹) توانستند با استفاده از بررسی تکثیر ژن *COI* و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های برشی در مدت زمان تقریبا ۷ ساعت تقلبی بودن و نبودن خاویار را مشخص کنند، اما در این میان تشخیص برخی از گونه های نزدیک به هم تاسماهیان بر اساس ژن *Cyt b* (Cytochrome oxidase *b*) امکان پذیر نشد و یا هزینه روش PCR-RFLP بالا بود. کار تشخیصی تاسماهیان حوضه اروپا با استفاده از بررسی ژن D-loop توسط Mugue و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد و نتایج مبین آن بود که این روش قابلیت تشخیص مولکولی تاسماهیان حوضه Ponto-Caspian در مدت زمان کوتاه دو تا سه ساعته امکان دارد. بنابراین، آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه براساس Mugue و همکاران (۲۰۰۸) انتخاب شدند که در آن اصل بر تکثیر قطعه ای حفاظت شده در منطقه ای از ژن D-loop بود که آغازگر راست برای تمام تاسماهیان از این منطقه انتخاب شد و آغازگر چپ برای هرگونه متفاوت بود. در این تحقیق ۱۴۰ نمونه از تاسماهیان حوضه خزر و تاسماهی سیبری مورد بررسی قرار گرفت که از این میان ۱۱۲نمونه مورد تشخیص گونه ای قرار گرفت.

از ۱۲ نمونه فیل ماهی در هیچکدام تکثیر باندی صورت نپذیرفت و از ۳۶ نمونه تاسماهی روسی ۴ نمونه تکثیری نداشتند. با توجه به انتخاب نمونه های مورد بررسی برای تشخیص فیل ماهی از حوضه دریای خزر علت عدم تکثیر باند ممکن است مربوط به تفاوت جمعیتی مربوط شود. در حوضه دریای خزر و به خصوص نواحی شیلاتی جنوب دریای خزر، تفاوت هایی بین جمعیت فیل ماهی ایرانی با جمعیت های اروپایی گزارش شده است(Ludwig et. al., 2000). از آن جایی که آغازگر سمت چپ برای فیل ماهی اختصاصی و از روی توالی های بانک ژنی طراحی شده بود، به نظر می رسد عدم پهلوگیری آغازگر سمت راست به قسمتی از ژن D-loop مربوط باشد که در دیگر تاسماهیان دریای خزر تکثیر شده است؛ یا اینکه این آغازگر دارای بازده مناسبی برای تکثیر قسمتی از ژنوم فیل ماهی نبودند تا باندی روی ژل قابل رویت شود. بر طبق Bristein و همکاران (۱۹۹۷) جنس *Huso* دارای دو گونه و همچنین اصل و نسب چند نیایی(polyphyletic) است. چون هر گونه در clade جداگانه ای قرار می گیرد و شکل ظاهری گونه *Huso huso* کاملاً متمایز ازجنس *Acipenser* است. Vodolazhskii و همکاران (۲۰۰۸) نیز روی ساختار ژن D-loop تاسماهی روسی تحقیق کردند و به این نتیجه رسیدند که این ناحیه در تاسماهی روسی بسیار پرتغییر است و در افراد متفاوت تغییرات طول با تکرار یا حذف نواحی تکرار پذیر ۸۲ تایی (تکرار ۲، ۳و تایی) قابل ثبت است. نتایج نشان داد که در جمعیت های مختلف، گروه ها و نژادهای فصلی، این تغییرات به عنوان نشانگر هایی قابل طرح اند. نتایج مشابه در مورد تاسماهی روسی در نتایج Mugue و همکاران (۲۰۰۸) نیز دیده شد که اعلام شد دو درصد از نمونه ها قابل شناسایی با آغازگرهای مورد استفاده نبودند. بر اساس نتایج Bristein و همکاران (۲۰۰۰) و Jenneckens و همکاران (۲۰۰۰) در تاسماهی روسی، مشخص شد که ۳۰ درصد از تاسماهیان روسی ژنوم میتوکندریایی مشابه با ژنوم تاسماهی سیبری دارند و تحقیق حاضر هم با استفاده از آغازگرهای هر دو ژنوتیپ، این دو نوع ژنوتیپ را در جمعیت تاسماهیان خزر شناسایی کرد. علیرغم این که تا به حال نشانگر واقعی برای تفاوت ژنوم میتوکندری دو گونه نزدیک به هم معرفی نشده است، اما به کار بردن آغازگرهای تاسماهی روسی هیچ باندی را برای تاسماهی ایرانی (قره برون) تکثیر نکرد که همین نتیجه برای تاسماهی ایرانی در تحقیق Mugue و همکاران (۲۰۰۸) نیز به دست آمد. تفاوت تاسماهی روسی و سیبری در جایگزینی یک نوکلئوتید متفاوت در تاسماهی سیبری است که این جایگزینی امکان استفاده آغازگر ABRAM را فراهم می آورد و در تاسماهی سیبری دو باند ۲۱۵ و ۱۳۸ شاخص تعیین این گونه ها شد. در صورت استفاده همراه با آغازگرهای تاسماهی روسی، دو ژنوتیپ برای تاسماهی روسی قابل تشخیص است که حداقل یک ژنوتیپ

برای هر نمونه ها در تحقیق حاضر مشاهده شد. با وجود اینکه تا به حال نشانگر ویژه دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی معرفی نشده است، اما استفاده از آغازگرهای تاسماهی روسی در ۱۲ نمونه از تاسماهی ایرانی هیچکدام از ژنوتیپ های مشاهده شده در تاسماهی روسی را تکثیر نکرد، با این حال Rad-sequencing در تحقیق Rastorguev و همکاران (۲۰۱۴) توانست نشانگرهای SNP ژنوتیپی دو گونه را مشخص کند. به نظر می رسد با بررسی نمونه های بیشتر برای جداسازی دوگونه در سطح میتوکندری، بتوان به نتایج دقیق تری دست یافت. نشانگرهای ژنوم میتوکندری وراثت مادری دارند و علیرغم اینکه می توانند نشان دهنده خوبی برای تفکیک گونه باشند، اما به جهت هیبریداسیون و ایجاد اختلاط گونه ای در تاسماهیان، که در گذشته بین گونه ها رخ داده است، ممکن است تشخیص گونه های خالص از هیبریدها را، به علت وراثت مادری، دچار اختلال کند (Ludwig *et al*.,2003؛ Tranah *et al*., 2004) در بررسی های تشخیصی گونه ها، با بررسی ژنوم میتوکندری، وضعیت ژنتیکی والد نر (گونه والد نر) ، چون میتوکندری وراثت مادری دارد، مشخص نخواهد بود. بنابراین لازم است تا ژنوم کل هم در ارزیابی گونه ها بررسی شود.

نتیجه گیری

نتیجه گیری نهایی مبین آن اســـت که روش ردیابی گونه‌های تاسماهیان بر اساس ژنوم میتوکندریایی (ژن D-loop) و بر مبنای اختلاف طول اندازه قطعه تکثیر شـــده می تواند روش مناســـبی برای تشـــخیص گونه‌های خالص جنس *Acipenser* تاسماهیان دریای خزر باشد. گرچه این روش نتوانست باندی را به عنوان نشانگری برای تشخیص فیل ماهی تکثیر کند. لذا، پیشـــنهاد می شـــود برای تشخیص فیل ماهی، از روش‌های دیگر ی، بر ا ساس ژنوم هسته‌ای، استفاده شود.

۵. منابع

References

Jamshidi, SH., Hassanzadeh Saber, M., 2020. Evaluation of confirmation of sturgeon caviar and its extract in beauty products using barcoding of mitochondrial genes. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* Print Accepted. Birstein, V.J., Doukakis, P., DeSalle, R., 2000., Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Conservation Genetics* 1(1), 81-88.

Dawnay, N.; Ogden, R.; McEwing, R.; Carvalho, G.R.; Thorpe, R.S. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173(1), 1–6.

Ludwig, A., May, B., Debus, L. Jenneckens, I., 2000. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 156(4), 1933-1947.

Ludwig, A., Congiu, L., Pitra, C., Fickel, J., Gessener, J., Fontana, F., Patarnello, T., Zane L., 2003. Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Molecular Ecology* 12(12), 3253-3264.

Jenneckens, I., Meyer, J.-N., Debus, L., Pitra, C., Ludwig, A., 2008. Evidence of Mitochondrial DNA Clones of Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian Sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, Caught in the River Volga. *Ecology Letters* 3 (6), 503–508.

Mugue, N.S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S., M., Mugue, V.N., and Barmintsev V. A., 2008. A.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.

Pappalardo, A.M.; Federico, C.; Sabella, G.; Saccone, S.; Ferrito, V., 2015. A *COI* nonsynonymous mutation as diagnostic tool for intraspecific discrimination in the European Anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus). *PLoS ONE* 10(11): e0143297.

Pappalardo, A.M.; Cuttitta, A.; Sardella, A.; Musco, M.; Maggio, T.; Patti, B.; Mazzola, S.; Ferrito, V. 2015. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lantern fishes larvae. *Hydrobiologia* 749, 155–167.

Rastorguev, M., Nedoluzhko, A. V. Mazur, A. M., Gruzdeva, N. M. Volkov, A.A. Barmintseva, A. E., Mugue, N. S., and Prokhortchou E. B., 2013. High-throughput SNP-genotyping analysis of the relationships among Ponto-Caspian sturgeon species. *Ecology and evolution* 3(8),2612-2618.

Tang Q., Liu H., Mayden R., Xiong B., 2006. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2), 347-357.

Tranah, G., Campton, D.E. and May, B., 2004. Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon. *Journal of Heredity* 95(6), 474-480.

Vodolazhskii, D. L., Komienko I.V., Voinova N. V., 2008. Hypervariability of the D-loop Region in Mitochondrial DNA of Russian Sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes, Acipenseridae), *Journal of Ichthyology* 48, 188–197.

Wong E H.K., Hanner R.H., 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood, *Food Research International* 41, 828–837.