



# درصد تشابه و روابط تبارشناختی گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر براساس توالی‌های ژنوم میتوکندریایی

شیرین جمشیدی<sup>۱</sup>، رامین عبدلی<sup>۲\*</sup>

۱. موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، ایران

۲. مرکز تحقیقات ابریشم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

## چکیده

ژنوم میتوکندریایی یک مدل ایده‌آل برای مطالعه تکامل و روابط تبارشناختی است. در این مطالعه، ژنوم‌های کامل میتوکندریایی شش گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر شامل تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، تاسماهی شیپ، ازون‌برون، استرلیاد و فیل ماهی همراه با توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئین به‌ازای هر ژنوم شامل *ND1*، *ND2*، *ND3*، *ND4*، *ND5*، *ND6*، *ATP6*، *ATP8*، *COX1*، *COX2*، *COX3* و *ND4L* از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج و مقایسه شدند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فاصله توالی‌ها در نرم‌افزار DNASTar براساس ژنوم کامل میتوکندریایی نشان‌دهنده بیشترین شباهت ژنتیکی (۹۹ درصد) بین گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بود. همچنین کمترین شباهت ژنتیکی (۹۵ درصد) بین گونه‌های تاسماهی روسی و فیل ماهی مشاهده شد. در تجزیه و تحلیل تبارشناختی حاصل از نرم‌افزار MEGA7، دو خوشه اصلی با دو زیر خوشه فرعی برای یکی از خوشه‌های اصلی شناسایی شدند. گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی در زیر خوشه اول، تاسماهی شیپ و استرلیاد در زیر خوشه دیگر و گونه‌های ازون‌برون و فیل ماهی خوشه متمایز دیگری تشکیل دادند. نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئین با نتایج حاصل از توالی‌های کامل ژنوم‌های میتوکندریایی مشابه بودند. بیشترین تفاوت در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های *ND2*، *ATP6*، *CYTb*، *ND5* و *ND6* و کمترین تفاوت در ژن *ND4L* مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های آمینواسیدی ۱۳ ژن متفاوت بود، از آنجا که ترتیب گونه‌ها در درخت تبارنما تغییر کرد، شباهت ژنتیکی ۱۰۰ درصدی برای برخی ژن‌ها همچون *COX3* و *ND4L* شناسایی شد. براساس نتایج پژوهش حاضر، توالی‌های ژنوم میتوکندریایی می‌توانند برای مطالعات تبارشناسی و خوشه‌بندی گونه‌های متفاوت ماهیان خاویاری مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه، صحت بررسی‌ها با استفاده از ژنوم‌های کامل میتوکندریایی بالاتر از توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها است و استفاده از توالی‌های آمینواسیدی به دلیل ماهیت کدونی آن‌ها پیشنهاد نمی‌شود.

واژگان کلیدی: میتوژنوم، درخت تبارشناسی، شباهت ژنتیکی، ماهیان خاویاری، دریای خزر



## Percent identity and phylogenetic relationships of Caspian Sea sturgeon species based on mitochondrial genome sequences

Shirin Jamshidi<sup>1</sup>, Ramin Abdoli<sup>2\*</sup>

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

2. Iran Silk Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gilan, Iran

Received: 30-Apr-2023

Accepted: 01-Sep-2023

### Abstract

Mitochondrial genome is an ideal model to study evolution and phylogenetic relationships. In this study, complete mitochondrial genomes of six species of Caspian sea sturgeon including Persian sturgeon, Russian sturgeon, Ship sturgeon, Sterlet sturgeon, Starry sturgeon and Beluga sturgeon along with separate nucleotide and amino acid sequences of 13 PCGs per each genome including *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *ND6*, *ATP6*, *ATP8*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ND4L* and *CYTB* were retrieved from NCBI database and compared. The results obtained from sequence distance analysis by DNASTar software based on complete mitochondrion genome showed high genetic similarity (99 %) between Persian and Russian sturgeon. Also, the lowest similarity (95 %) was observed between Sterlet and Starry sturgeon. In phylogenetic analysis by MEGA7 software, two main clusters with two sub-clusters for one of the main clusters were identified. Persian and Russian sturgeon species were grouped in first sub-cluster, Ship and Sterlet species fall in the other sub-cluster and Starry sturgeon with Beluga formed a different distinct cluster. The results obtained from the comparison of the 13 PCGs sequences were similar to the sequences of the complete mitochondrial genomes. The most difference in nucleotide sequences were observed in *CYTB*, *ATP6*, *ND2*, *ND5* and *ND6* genes and the lowest difference for *ND4L* gene. The results obtained from the comparison of the 13 genes amino acid sequences were different as the order of the species was changed and 100 % genetic similarity were observed for some genes such as *COX3* and *ND4L* genes. Based on the results of the present study, mitochondrial genome sequences could be used for phylogenetic analysis and clustering of different species of sturgeons. However, the accuracy of investigations by complete mitochondrial genomes is higher than the nucleotide sequences of the genes, and using the amino acid sequences is not suggested due to their codon nature.

**Keywords:** Mitogenome, Phylogenetic tree, Genetic similarity, Sturgeons, Caspian Sea

## ۱. مقدمه

روش‌های تبارشناختی کلاسیک براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی موجودات زنده استوار بوده‌اند ولی در رویکردهای نوین، تجزیه و تحلیل فاصله تبارشناختی و روش‌های مقایسه‌ای مرتبط با آن‌ها براساس تنوع ژنتیکی مشاهده شده در توالی‌های ژنتیکی مورد مطالعه، صورت می‌گیرند (Abdoli et al., 2018). توالی‌های ژنتیکی مورد استفاده در مطالعات تبارشناختی می‌توانند شامل DNA کروموزومی یا DNA خارج کروموزومی نظیر ژنوم میتوکندریایی باشند. مشابه با ژنوم هسته‌ای، ژنوم میتوکندریایی از DNA دو رشته‌ای تشکیل شده و ژن‌های متفاوتی را رمزگذاری می‌کند. ژن‌های میتوکندریایی در تجزیه و تحلیل فیلوژنی مولکولی و تشخیص گونه‌ها از سال‌های ابتدایی دهه ۹۰ میلادی استفاده شده‌اند. تعداد کپی بالای میتوکندری در سلول، تکثیر آسان‌تر ژن‌ها و میزان تکامل سریع این ژن‌ها باعث شده تا در مطالعات طبقه‌بندی گونه‌های جانوران به‌عنوان نشانگرهای ارزشمند، به‌صورت گسترده‌ای مورد استفاده قرار گیرند (Harrison 1989; Simon et al., 2006). معایب استفاده از توالی‌های میتوکندریایی این است که وراثت آن‌ها فقط از طرف والد ماده است و به ارث بردن آن‌ها به‌صورت پیوسته به‌عنوان یک نشانگر واحد در نظر گرفته می‌شود. از طرفی، تکامل سریع این ژن‌ها با آنکه ممکن است دارای مزیت‌هایی باشد اما فیلوژنی موجودات در سطح گسترده را محدود می‌کند (Townsend et al., 2008).

تکامل ماهیان خاویاری از این جهت جالب است که این ماهیان از جمله ماهیان قدیمی و اولیه مربوط به ۲۰۰ میلیون سال پیش محسوب می‌شوند و در تکامل ماهیان و یا حتی کل مهره‌داران نقش عمده‌ای ایفا می‌کنند (Bemis et al., 1997). علاوه بر این، وجود ظاهر خاص، داشتن گونه‌های منحصر به فرد، سن تکاملی زیاد و سرعت تکامل نسبتاً آهسته همراه با وضعیت در خطر انقراض، این گروه را به نمونه جالبی برای مطالعات تکاملی مولکولی تبدیل کرده است (Bemis et al., 1997; Choudhury and Dick, 1998; Krieger and Fuerst,

2002). با این حال، چون این گروه ماهیان پلی‌پلوئید هستند و هیچ داده‌ای به‌طور منسجم از ژنوم هسته‌ای بزرگ ماهیان خاویاری وجود ندارد، تجزیه و تحلیل DNA میتوکندریایی کمکی در جهت حل روابط فیلوژنی بین گونه‌ها خواهد کرد.

نتایج تحقیقات تبارشناختی (فیلوژنتیکی) روی یک ژن یا چندین ژن نشان داده است که ماهیان خاویاری به دو خانواده *Acipenseridae* و *Polyodontidae* تقسیم می‌شوند (Fontana et al., 2001; Artyukhin, 2010). علاوه بر این، نتایج بررسی‌های سیتوژنتیک نشان داده است که این ماهیان دارای سطح پلوئیدی متفاوت‌اند (Soltis and Soltis, 1999; Comber and Smith, 2004). گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر شامل فیل‌ماهی (*Huso huso*)، بزرگترین گونه موجود در آب شیرین، تاسماهی شیپ (*Acipenser nudipectus*)، تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) هستند که به دو دسته دیپلوئیدی و تتراپلوئیدی تقسیم‌بندی می‌شوند (Peng et al., 2007). فیل‌ماهی، تاسماهی شیپ و ازون‌برون در دسته دیپلوئیدها و بقیه در تتراپلوئیدها تقسیم‌بندی می‌شوند، که براساس مطالعات مختلف، زمان وقوع وقایع پلوئیدی براساس تجزیه و تحلیل‌های انجام شده روی ژن سیتوکروم *b* به حدود چند صد میلیون سال پیش برمی‌گردد (Peng et al., 2007). این گونه‌ها بر اساس طبقه‌بندی‌های مولکولی در کلاد A (ماهیان خاویاری اقیانوس آرام) قرار گرفته و همگی چندنیایی هستند (Shen et al., 2020). علی‌رغم اینکه مطالعات فراوانی برای درک جایگاه تبارشناختی ماهیان خاویاری براساس تک ژن‌های میتوکندریایی و DNA هسته‌ای و مطالعات تلفیقی روی ترانسکریپتوم به‌دست آمده از گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری انجام شده است (Luo et al., 2019; Shen et al., 2020)، انجام تجزیه و تحلیل‌های جدید براساس ژنوم کامل میتوکندریایی همراه با بررسی جداگانه

نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی کامل ۱۳ ژن رمزگر پروتئین (CDS) به تفکیک برای هر ژنوم به دست آمد. این توالی‌ها شامل ژن‌های *NADH* یوبیکوئینون اکسیدوردوکتاز ۱ تا ۶ (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5* و *ND6*)، سیتوکروم *c* اکسیداز ۱ تا ۳ (*COX1*, *COX2* و *COX3*)، *ATP* سنتاز ۶ و ۸ (*ATP6* و *ATP8*)، *NADH* دهیدروژناز ۴ *L* (*ND4L*) و سیتوکروم *b* (*CYTB*) بودند.

## ۲.۲. هم‌ردیفی ژنوم‌ها و توالی‌های نوکلئوتیدی

### و آمینواسیدی

هم‌ردیفی چندگانه ژنوم‌ها و توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئین به تفکیک برای هر ژنوم با استفاده از بخش MegAlign نرم‌افزار DNASTAR (DNASTAR 7.1 Lasergene Inc., Madison, WI, USA) و توسط ابزار *Clustal W* انجام شد. همچنین با استفاده از بخش Sequence Distances در نرم‌افزار DNASTAR، واگرایی (Divergence) و درصد شباهت ژنتیکی (Percent identity) ژنوم‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی محاسبه شدند.

ژن‌های میتوکندریایی رمزگر پروتئینی که بتوانند اطلاعات تکمیلی در مورد این گروه از ماهیان در اختیار قرار دهند، بسیار جذاب خواهد بود.

هدف از مطالعه حاضر بررسی واگرایی و درصد شباهت ژنتیکی همراه با تجزیه و تحلیل تبارشناختی شش گونه از ماهیان خاویاری دریای خزر براساس توالی کامل ژنوم میتوکندریایی و توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئین به ازای هر ژنوم بود.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. توالی‌های ژنومی، ژنتیکی و آمینواسیدی

در ابتدا توالی‌های کامل ژنوم میتوکندریایی شش گونه از ماهیان خاویاری موجود در دریای خزر با اسامی تاسماهی ایرانی (قره‌برون)، تاسماهی روسی، تاسماهی شیپ، استرلیاد، ازون‌برون و فیل ماهی از پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) استخراج شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). اسامی عمومی و علمی، شماره دسترسی ژنوم‌های مزبور همراه با اندازه ژنوم در جدول ۱ ارائه شده‌اند. در ادامه، توالی‌های

جدول ۱- نام عمومی و علمی گونه‌های مورد بررسی و شماره دسترسی توالی‌های ژنوم میتوکندریایی آن‌ها در پایگاه NCBI همراه با طول ژنوم‌های مزبور (bp)

طول ژنوم (جفت باز)	شماره دسترسی	نام علمی	نام عمومی
۱۶۵۸۸	MW713795.1	<i>Acipenser persicus</i>	تاسماهی ایرانی
۱۶۵۹۶	KJ789859.1	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	تاسماهی روسی
۱۶۵۴۳	NC_030344.1	<i>Acipenser nudiventris</i>	تاسماهی شیپ
۱۶۷۹۰	NC_022453.1	<i>Acipenser ruthenus</i>	تاسماهی استرلیاد
۱۶۵۳۷	NC_005795.1	<i>Acipenser stellatus</i>	ازون برون
۱۶۸۳۶	MK213068.2	<i>Huso huso</i>	فیل ماهی

MEGA7 (Tamura et al., 2016) هم‌ردیف شده و درخت‌های تبارشناسی با بکارگیری روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) با درصد پشتیبانی (bootstrap) براساس ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شدند.

### ۲.۳. درخت تبارشناسی

به‌منظور تجزیه و تحلیل تبارشناختی، ژنوم‌های کامل میتوکندریایی همراه با توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های رمزگر با استفاده از نرم‌افزار

## ۳. نتایج

## ۳.۱. همردیفی و شباهت ژنتیکی ژنوم‌های کامل

## میتوکندریایی

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل همردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم کامل میتوکندریایی گونه‌های ماهیان خاویاری مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین شباهت (۹۹ درصد) بین گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی وجود داشت. همچنین بر مبنای همین نتایج، کمترین شباهت ژنتیکی (۹۵ درصد) بین گونه *استرلیاد* و گونه *ازون‌برون* مشاهده شد. نتایج حاصل از معیار واگرایی (Divergence) در مقایسه ژنوم‌های کامل میتوکندریایی گونه‌های مورد مطالعه نیز یافته‌های فوق را تأیید می‌نمایند (جدول ۲).

## ۳.۲. تجزیه و تحلیل تبارشناختی ژنوم‌های کامل

## میتوکندریایی

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تبارشناختی، دو خوشه اصلی را در ابتدای درخت تبارنما نشان داد که یکی از آن‌ها به دو زیر خوشه دیگر تقسیم شده است (شکل ۱). در نخستین خوشه جدا شده، ابتدا گونه‌های قره‌برون و تاسماهی روسی در یک زیر خوشه قرار گرفتند و گونه‌های تاسماهی شیپ و استرلیاد زیر خوشه دیگری را تشکیل

دادند. گونه‌های ازون‌برون و فیل ماهی نیز خوشه متمایز دیگری تشکیل دادند (شکل ۱). اعداد درج شده روی گره‌ها (۴ گره با مقادیر ۷، ۸، ۹ و ۱۰) نشان‌دهنده درصد‌های پشتیبانی برای شاخه‌های داخلی بعد از ۱۰۰۰ تکرار است. طول شاخه‌ها نیز نشان‌دهنده تغییرات ژنتیکی است، یا به عبارت دیگر، هر قدر شاخه‌ای بلندتر باشد، تغییرات ژنتیکی (یا واگرایی) رخ داده در آن بیشتر است.

## ۳.۳. همردیفی و شباهت ژنتیکی توالی‌های

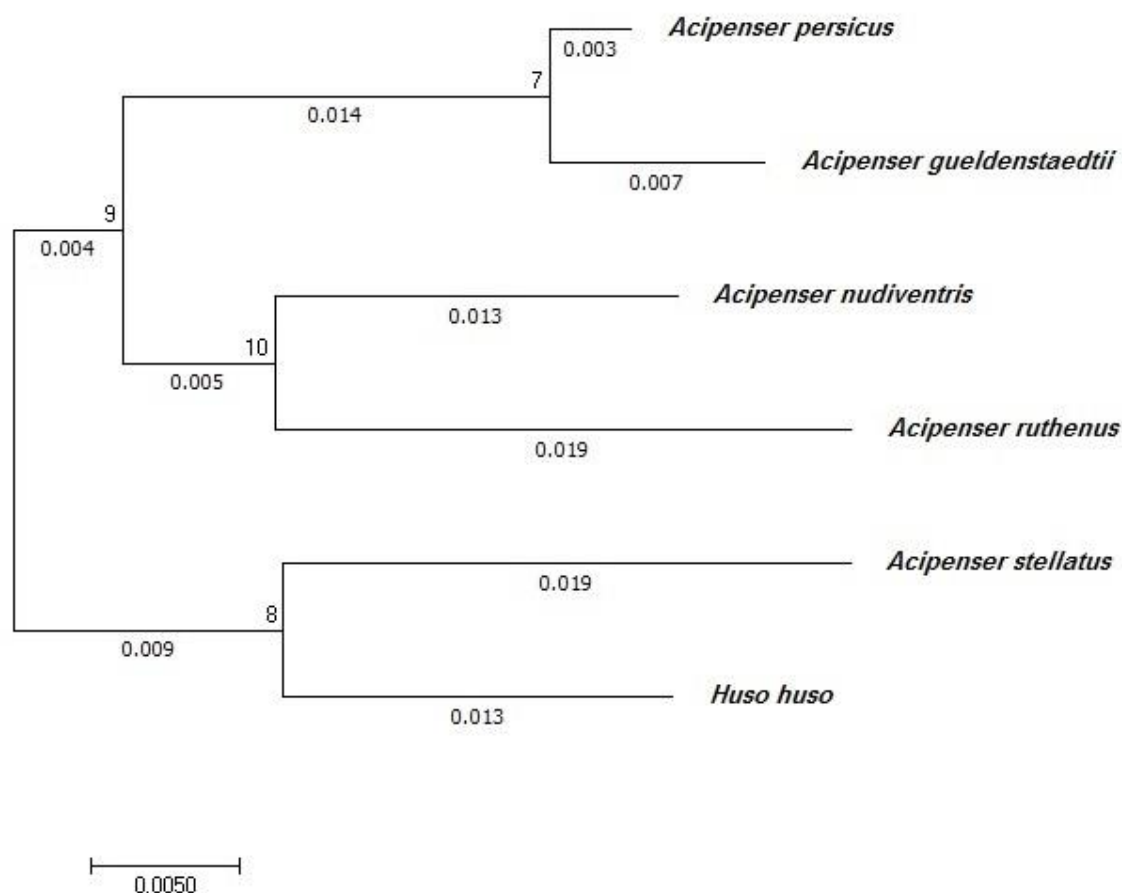
## نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های رمزگر پروتئین‌ها

علی‌رغم وجود واگرایی بین توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های رمزگر پروتئینی در گونه‌های مورد مطالعه، نتایج حاصل برای تمامی ژن‌ها مشابه با نتایج حاصل از مقایسه ژنوم‌های کامل میتوکندریایی بود و شباهت ژنتیکی بیش از ۹۰ درصد برای آن‌ها شناسایی شد (شکل ۲). اگرچه، بیشترین تفاوت در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های *CYTb*، *ATP6*، *ND2*، *ND5* و *ND6* و کمترین تفاوت در ژن *ND4L* مشاهده شد. با این وجود، نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های آمینواسیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئینی با مقایسات ژنوم‌های کامل و توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها متفاوت بود و شباهت‌های ژنتیکی ۱۰۰ درصدی بین برخی گونه‌ها برای ژن‌های *COX3* و *ND4L* شناسایی شد.

جدول ۲- درصد شباهت و واگرایی ژنوم‌های کامل میتوکندریایی گونه‌های مورد مطالعه.

		درصد تشابه							
		۱	۲	۳	۴	۵	۶		
۱			۹۵/۵	۹۵/۹	۹۵/۹	۹۵/۴	۹۶/۷	۱	<i>Huso huso</i>
۲		۴/۶		۹۶/۳	۹۹/۰	۹۵/۸	۹۵/۱	۲	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
۳		۴/۲	۳/۸		۹۶/۸	۹۶/۷	۹۵/۵	۳	<i>Acipenser nudiventris</i>
۴	واگرایی	۴/۲	۱/۰	۳/۳		۹۶/۲	۹۵/۴	۴	<i>Acipenser persicus</i>
۵		۴/۸	۴/۴	۳/۴	۳/۹		۹۵/۲	۵	<i>Acipenser ruthenus</i>
۶		۳/۳	۵/۱	۴/۶	۴/۷	۵/۰		۶	<i>Acipenser stellatus</i>
		۱	۲	۳	۴	۵	۶		

ژنوم کامل میتوکندریایی



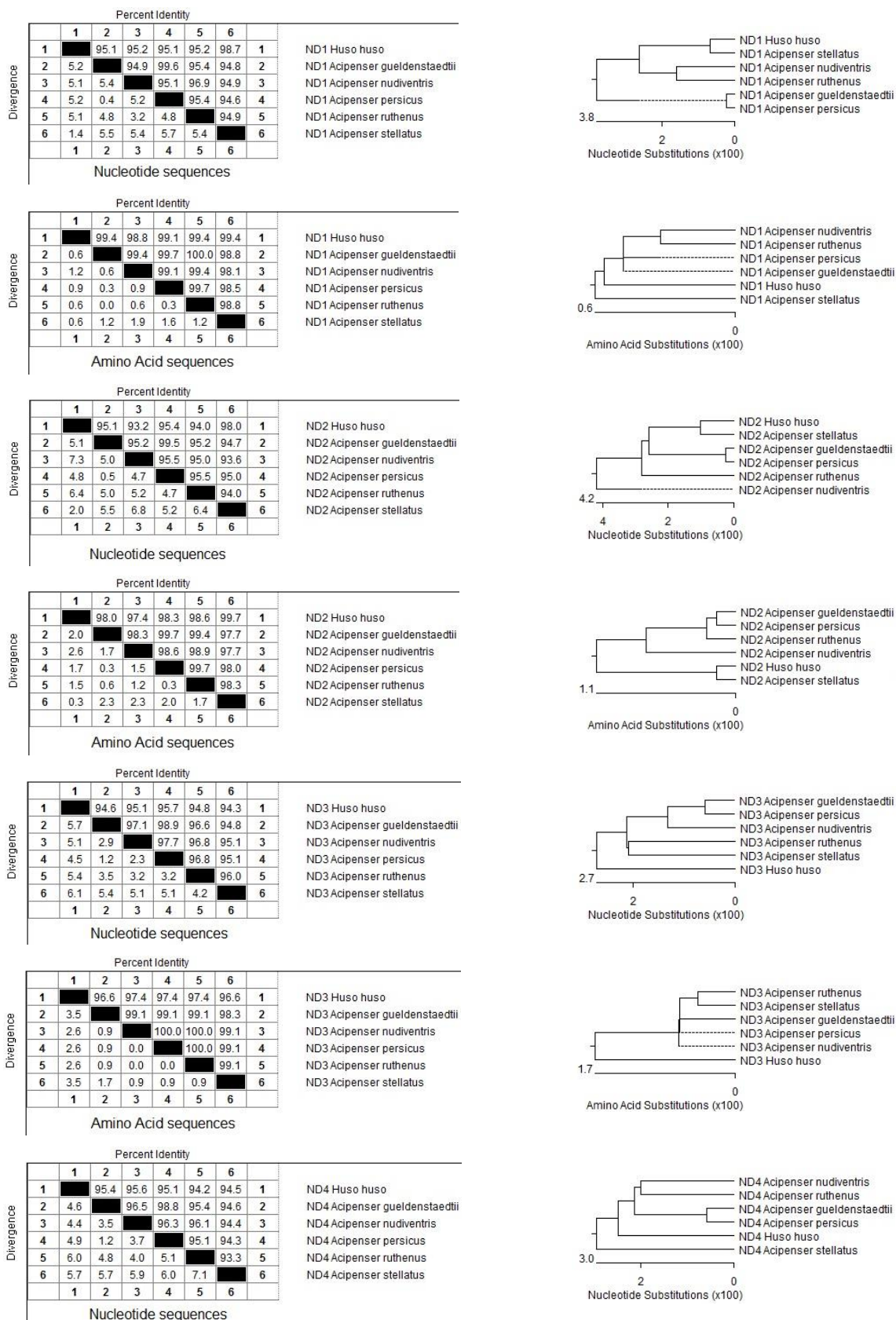
شکل ۱- درخت تبارشناسی ژنوم‌ها کامل میتوکندریایی گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی.

#### ۳.۴. تجزیه و تحلیل تبارشناختی توالی‌های

#### نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های رمزگر پروتئین‌ها

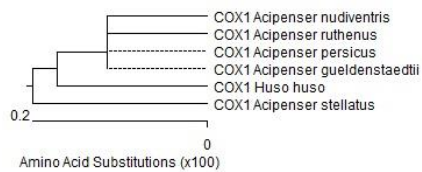
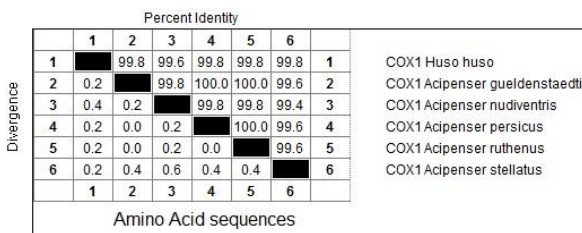
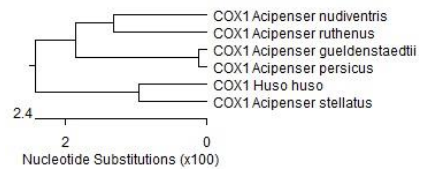
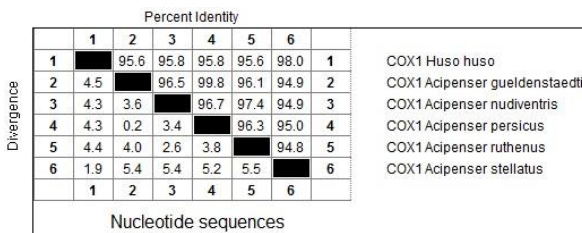
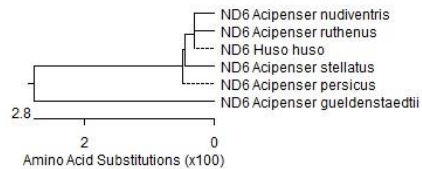
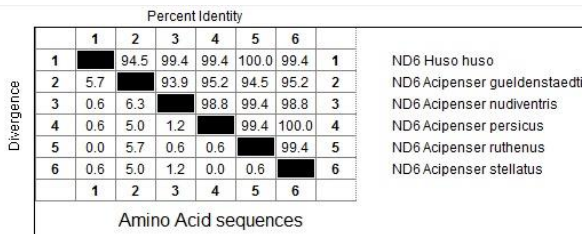
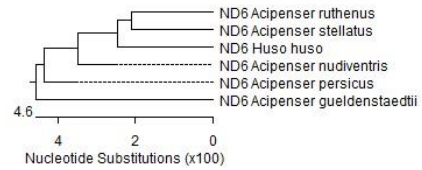
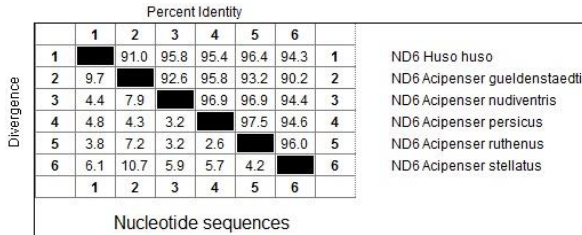
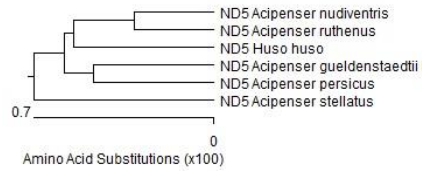
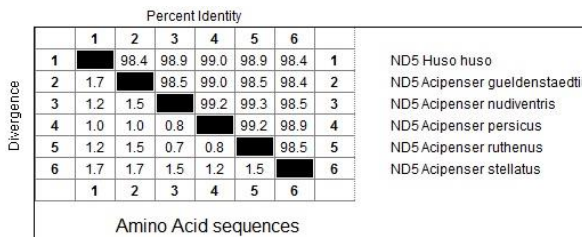
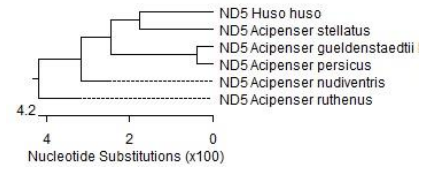
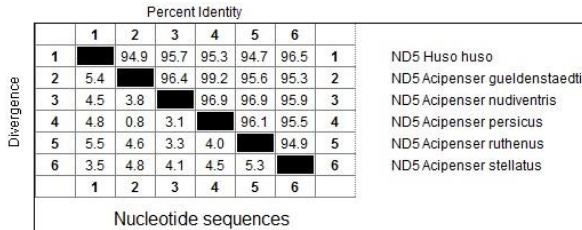
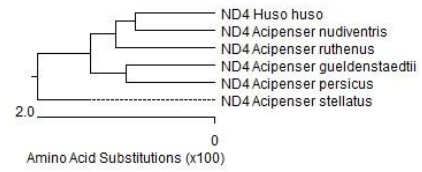
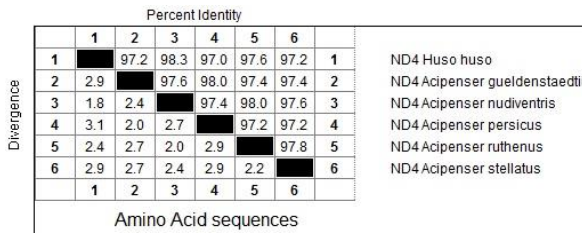
نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی برای توالی‌های نوکلئوتیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئینی مشابه با نتایج حاصل از ژنوم‌های کامل میتوکندریایی بود و تغییرات محسوسی در خوشه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه شناسایی نشد (شکل ۲). با این حال، نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی برای توالی‌های آمینواسیدی

۱۳ ژن رمزگر پروتئینی در مقایسه با ژنوم‌های کامل و توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها متفاوت بود، از آنجا که ترتیب و خوشه‌بندی گونه‌ها در درخت تبارشناختی تغییراتی نشان داد (شکل ۲). با توجه به ماهیت کدونی هر آمینواسید (تشکیل شده از ۳ نوکلئوتید) و عدم تغییر در نوع برخی از آن‌ها علی‌رغم وجود تفاوت نوکلئوتیدی در توالی بازها (به خصوص در نوکلئوتید سوم هر کدون)، اصولاً درصد تشابه ژنتیکی بالاتر از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی خواهد بود.



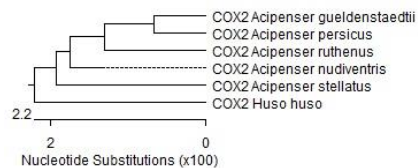
شکل ۲- درصد شباهت، واگرایی و درخت تبارشناسی براساس توالی‌های نوکلئوتیدی و توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های *ND1*، *ND2*، *ND3*.

*ND4*، *ND5*، *ND6*، *ND1*، *COX1*، *COX2*، *COX3*، *ATP6*، *ATP8*، *ND4L* و *CYTB*.

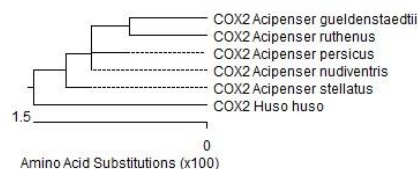




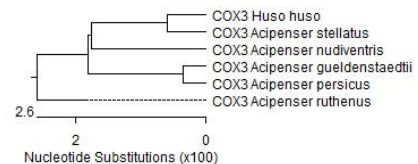
		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	95.5	96.1	95.9	95.4	96.2	1	COX2 <i>Huso huso</i>
	2	4.7	█	97.4	98.7	97.3	96.2	2	COX2 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	4.0	2.7	█	97.8	98.1	97.4	3	COX2 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	4.2	1.3	2.2	█	97.7	96.4	4	COX2 <i>Acipenser persicus</i>
	5	4.8	2.8	1.9	2.4	█	96.7	5	COX2 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	3.9	3.9	2.7	3.8	3.4	█	6	COX2 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		



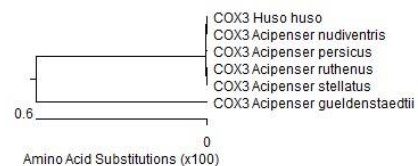
		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	96.5	97.8	97.4	97.8	98.3	1	COX2 <i>Huso huso</i>
	2	3.6	█	98.7	98.3	99.1	98.3	2	COX2 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	2.2	1.3	█	99.6	100.0	99.6	3	COX2 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	2.7	1.8	0.4	█	99.6	99.1	4	COX2 <i>Acipenser persicus</i>
	5	2.2	0.9	0.0	0.4	█	99.6	5	COX2 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	1.8	1.8	0.4	0.9	0.4	█	6	COX2 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		



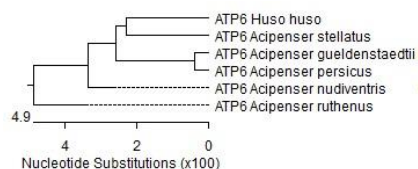
		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	96.3	96.9	96.9	96.7	98.9	1	COX3 <i>Huso huso</i>
	2	3.8	█	96.4	99.4	96.4	95.7	2	COX3 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	3.2	3.7	█	97.1	96.9	96.3	3	COX3 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	3.2	0.6	3.0	█	97.1	96.3	4	COX3 <i>Acipenser persicus</i>
	5	3.4	3.7	3.2	3.0	█	96.3	5	COX3 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	1.2	4.5	3.8	3.8	3.8	█	6	COX3 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		



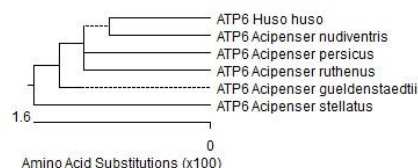
		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	1	COX3 <i>Huso huso</i>
	2	1.2	█	98.9	98.9	98.9	98.9	2	COX3 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	0.0	1.2	█	100.0	100.0	100.0	3	COX3 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	0.0	1.2	0.0	█	100.0	100.0	4	COX3 <i>Acipenser persicus</i>
	5	0.0	1.2	0.0	0.0	█	100.0	5	COX3 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	█	6	COX3 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		



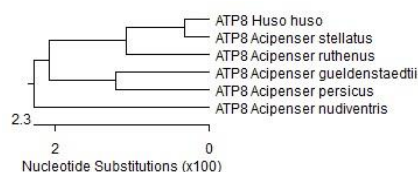
		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	95.6	96.1	95.3	94.6	95.6	1	ATP6 <i>Huso huso</i>
	2	4.6	█	96.8	99.3	94.9	94.7	2	ATP6 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	4.1	3.3	█	96.6	95.8	94.6	3	ATP6 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	4.9	0.7	3.5	█	94.7	94.4	4	ATP6 <i>Acipenser persicus</i>
	5	5.7	5.4	4.4	5.5	█	93.4	5	ATP6 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	4.6	5.5	5.7	5.8	7.0	█	6	ATP6 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		

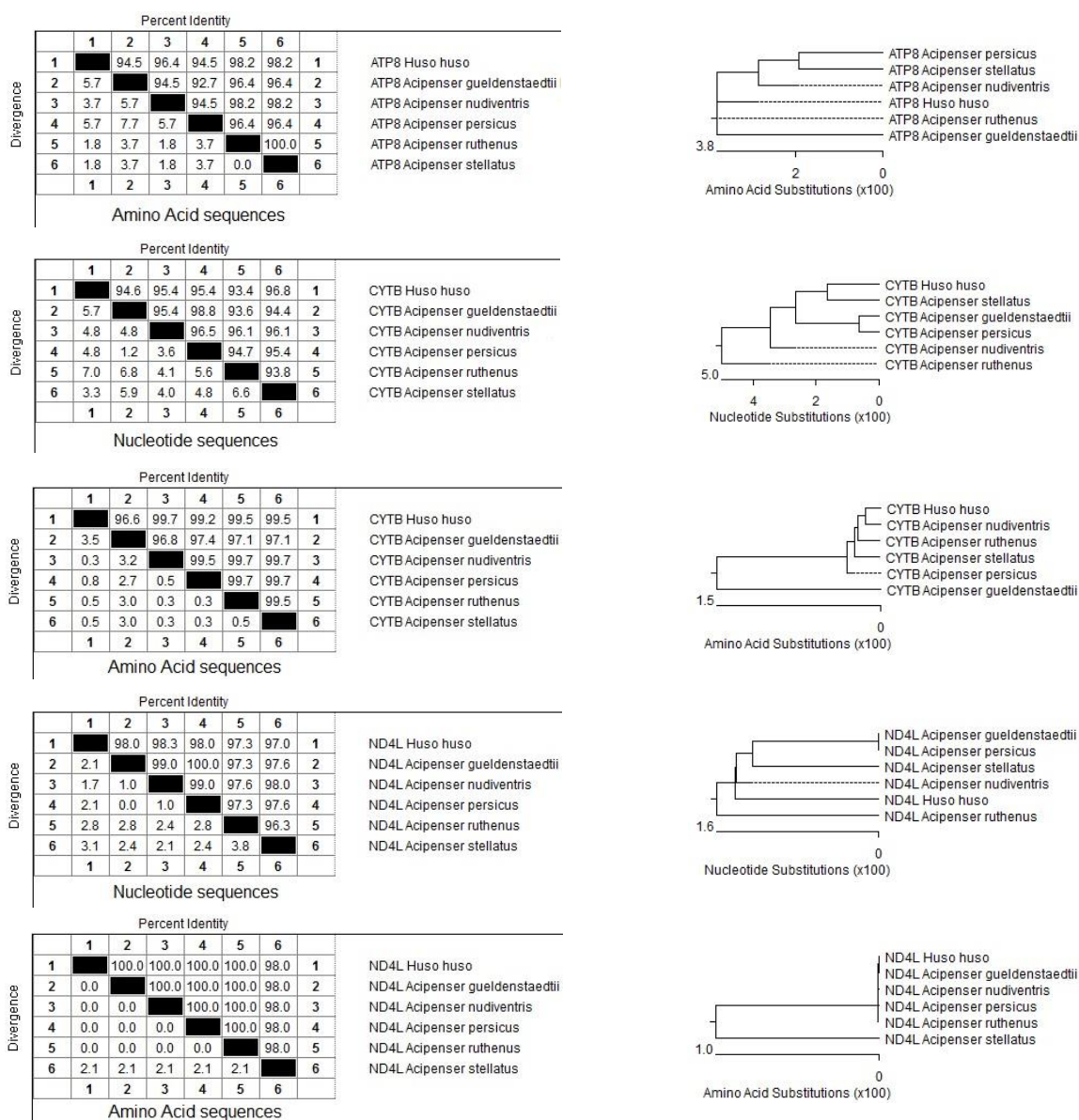


		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	98.2	98.2	97.8	97.4	96.9	1	ATP6 <i>Huso huso</i>
	2	1.8	█	99.1	98.7	98.2	97.8	2	ATP6 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	1.8	0.9	█	98.7	98.2	97.8	3	ATP6 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	2.2	1.3	1.3	█	97.8	97.4	4	ATP6 <i>Acipenser persicus</i>
	5	2.7	1.8	1.8	2.2	█	96.9	5	ATP6 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	3.2	2.2	2.2	2.7	3.2	█	6	ATP6 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		



		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	█	95.8	95.8	95.8	97.6	99.4	1	ATP8 <i>Huso huso</i>
	2	4.3	█	95.2	97.6	95.8	96.4	2	ATP8 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	3	4.4	5.0	█	95.2	95.8	96.4	3	ATP8 <i>Acipenser nudiventris</i>
	4	4.3	2.4	5.0	█	95.8	96.4	4	ATP8 <i>Acipenser persicus</i>
	5	2.4	4.3	4.4	4.3	█	98.2	5	ATP8 <i>Acipenser ruthenus</i>
	6	0.6	3.7	3.7	3.7	1.8	█	6	ATP8 <i>Acipenser stellatus</i>
		1	2	3	4	5	6		





ادامه شکل ۲

#### ۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

توان بالا، تجزیه و تحلیل تبارشناختی را در قالبی جدید تحت عنوان فیلوژنومیکس مطرح کرده است. فیلوژنومیکس، از ادغام تبارشناسی با داده‌های ژنومی ایجاد شده و به رویکردی قدرتمند برای مطالعه سیستماتیک و تکامل گونه‌ها تبدیل شده است (Behura, 2015). ژنوم میتوکندریایی در بیشتر موجودات پرسلولی یک مولکول DNA دو رشته‌ای کوچک است که معمولاً بین ۱۵ تا ۲۰ کیلو باز طول داشته و شامل ۳۷

روش‌های تجزیه و تحلیل تبارشناختی می‌توانند به‌عنوان یک ابزار زیست‌داده‌ورزی بسیار قابل اعتماد و مهم برای پرداختن به این فرآیندهای زیستی متفاوت در نظر گرفته شوند. اهمیت تجزیه و تحلیل تبارشناختی در بکارگیری ساده و مدیریت آسان داده‌ها نهفته است. در همین راستا، پیشرفت‌های کنونی فناوری‌های توالی‌یابی با

زیر واحد عملکردی است که ۱۳ واحد از آن‌ها ژن رمزگر پروتئین‌ها (PCGs) بوده و ۲۲ واحد آن RNA ناقل (tRNA) و دو واحد دیگر RNA ریبوزومی (rRNA 12S و rRNA 16S) اند (da Silva et al., 2020). با در نظر گرفتن مواردی نظیر عدم وجود فرآیندهای نو ترکیبی و سرعت بالاتر تکامل و تجمع جهش‌های مربوط به ژنوم میتوکندریایی، میتوژنوم به‌عنوان یکی از ابزارهای اصلی در انجام مطالعات تکاملی و رده‌بندی مهره‌داران و بی‌مهرگان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Boore, 1999; Brown et al., 1979). تاکنون از ژنوم میتوکندریایی و توالی‌های نوکلئوتیدی زیر واحدهای عملکردی آن به‌طور گسترده برای بررسی‌های تبارشناختی مرتبط با منشاء نژادی و مطالعه جمعیت‌ها در گونه‌های مختلفی از حیوانات اهلی و حشرات (Cieslak et al., 2010; Pramod et al., 2018; Rabiei et al., 2022; Abdoli et al., 2022) استفاده شده است.

در ماهیان خاویاری ژنوم مرجع کاملی در بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی ثبت نشده و به‌تبع آن اطلاعات کمی از ژنوم کامل هسته‌ای وجود دارد. از طرفی، براساس مطالعات انجام شده، در ژنوم هسته‌ای ماهیان خاویاری پلی‌پلوئیدی‌هایی رخ داده است که یافتن نشانگر مرتبط برای ردیابی و مطالعات فیلوژنی را با مشکل روبه‌رو می‌کند، که از این نظر DNA میتوکندریایی در تشخیص گونه، مطالعات جمعیت‌شناسی و فیلوژنتیکی تاسماهیان اهمیت دارد (Rothfels et al., 2013; Zeng et al., 2017).

تاکنون پژوهش‌های متعددی به بررسی رولبط تبارشناختی گونه‌های متفاوت از ماهی‌ها براساس توالی‌های ژنوم میتوکندریایی پرداخته‌اند، اما هیچ‌کدام از این پژوهش‌ها ژنوم کامل را مورد بررسی قرار نداده و نتایج بیشتر آن‌ها تنها براساس توالی‌های ژنتیکی برخی ژن‌های رمزگر پروتئین‌ها مانند ژن سیتوکروم b (Rahmani et al., 2012)، ژن سیتوکروم c اکسیداز ۱ (Zhang et al., 2013)، و توالی‌های غیر کد کننده شامل ناحیه کنترلی (Miuge et al., 2008; Khoshkholgh et al., 2011) یا ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندریایی (Tagliavini et al., 1999) بوده است که در نوع گونه‌های مورد بررسی نیز تفاوت‌هایی وجود دارد. در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هم‌ردیفی ژنوم‌های کامل میتوکندریایی گونه‌های ماهیان خاویاری مورد مطالعه، بیشترین شباهت ژنتیکی را بین گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (۹۹ درصد) و کمترین شباهت ژنتیکی (۹۵ درصد) را بین گونه‌های استرلیاد و گونه‌های ازون‌برون نشان داد. نتایج حاصل از بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های رمزگر پروتئینی برای تمامی ژن‌ها در گونه‌های مورد مطالعه نیز مشابه نتایج حاصل از مقایسه ژنوم کامل میتوکندریایی بود. با این وجود، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های *ND6* و *ND5*، *ND2*، *ATP6*، *CYTB*، *COX1*، *COX2*، *ND1*، *ND2*، *ND3* و *ND4L* بهترین شاخص‌ها و جمعیت‌های ماهیان خاویاری هستند، چون بیشترین اختلاف توالی‌ها در این ژن‌ها به‌دست آمده است. از سوی دیگر، برای ژن *ND4L* کمترین اختلاف توالی بین گونه‌های تاسماهیان دریای خزر ثبت شده است که نشان‌دهنده بیشترین شباهت این ژن بین این گونه‌ها است. در همین راستا، برخی پژوهش‌ها تنوع ژنتیکی گونه‌های تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*) را براساس توالی ژنتیکی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندریایی مورد بررسی قرار داده‌اند، که نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود جمعیت مستقل (Nazari et al., 2020) و تنوع ژنتیکی قابل توجه برای این گونه بوده است (Khoshkholgh et al., 2011). علاوه بر این، مطابق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، دو مطالعه پیشین نشان داده‌اند که ژن‌های *ND5* و *ND6* نشانگرهای بسیار مفیدی برای ساختار ژنتیک جمعیتی گونه‌های استرلیاد (*Acipenser stellatus*) و تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) هستند (Pourkazemi, Rastorguev, 1997; Rezvani-Gilkolaei, 1996). همکاران (۲۰۰۸) براساس آزمون فیلوژنتیکی چندین گونه از ماهیان خاویاری، طبقه‌بندی زیر را برای ژن‌های میتوکندریایی پیشنهاد کرده‌اند: خیلی خوب (*ND5*) و خوب (*CYTB*)، خوب (*COX1*، *COX2*، *ND1*، *ND2*، *ND3*، *ND4* و *ATP6*)، متوسط (*ATP8*) و ضعیف (*ND4L* و *ND3*) و ضعیف

زیر واحد عملکردی است که ۱۳ واحد از آن‌ها ژن رمزگر پروتئین‌ها (PCGs) بوده و ۲۲ واحد آن RNA ناقل (tRNA) و دو واحد دیگر RNA ریبوزومی (rRNA 12S و rRNA 16S) اند (da Silva et al., 2020). با در نظر گرفتن مواردی نظیر عدم وجود فرآیندهای نو ترکیبی و سرعت بالاتر تکامل و تجمع جهش‌های مربوط به ژنوم میتوکندریایی، میتوژنوم به‌عنوان یکی از ابزارهای اصلی در انجام مطالعات تکاملی و رده‌بندی مهره‌داران و بی‌مهرگان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Boore, 1999; Brown et al., 1979). تاکنون از ژنوم میتوکندریایی و توالی‌های نوکلئوتیدی زیر واحدهای عملکردی آن به‌طور گسترده برای بررسی‌های تبارشناختی مرتبط با منشاء نژادی و مطالعه جمعیت‌ها در گونه‌های مختلفی از حیوانات اهلی و حشرات (Cieslak et al., 2010; Pramod et al., 2018; Rabiei et al., 2022; Abdoli et al., 2022) استفاده شده است.

در ماهیان خاویاری ژنوم مرجع کاملی در بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی ثبت نشده و به‌تبع آن اطلاعات کمی از ژنوم کامل هسته‌ای وجود دارد. از طرفی، براساس مطالعات انجام شده، در ژنوم هسته‌ای ماهیان خاویاری پلی‌پلوئیدی‌هایی رخ داده است که یافتن نشانگر مرتبط برای ردیابی و مطالعات فیلوژنی را با مشکل روبه‌رو می‌کند، که از این نظر DNA میتوکندریایی در تشخیص گونه، مطالعات جمعیت‌شناسی و فیلوژنتیکی تاسماهیان اهمیت دارد (Rothfels et al., 2013; Zeng et al., 2017).

تاکنون پژوهش‌های متعددی به بررسی رولبط تبارشناختی گونه‌های متفاوت از ماهی‌ها براساس توالی‌های ژنوم میتوکندریایی پرداخته‌اند، اما هیچ‌کدام از این پژوهش‌ها ژنوم کامل را مورد بررسی قرار نداده و نتایج بیشتر آن‌ها تنها براساس توالی‌های ژنتیکی برخی ژن‌های رمزگر پروتئین‌ها مانند ژن سیتوکروم b (Rahmani et al., 2012)، ژن سیتوکروم c اکسیداز ۱ (Zhang et al., 2013)، و توالی‌های غیر کد کننده شامل ناحیه کنترلی (Miuge et al., 2008; Khoshkholgh et al., 2011) یا ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندریایی (Tagliavini et al., 1999) بوده است که در نوع گونه‌های مورد بررسی نیز تفاوت‌هایی وجود دارد. در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل هم‌ردیفی ژنوم‌های کامل میتوکندریایی گونه‌های ماهیان خاویاری مورد مطالعه، بیشترین شباهت ژنتیکی را بین گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی (۹۹ درصد) و کمترین شباهت ژنتیکی (۹۵ درصد) را بین گونه‌های استرلیاد و گونه‌های ازون‌برون نشان داد. نتایج حاصل از بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های رمزگر پروتئینی برای تمامی ژن‌ها در گونه‌های مورد مطالعه نیز مشابه نتایج حاصل از مقایسه ژنوم کامل میتوکندریایی بود. با این وجود، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های *ND6* و *ND5*، *ND2*، *ATP6*، *CYTB*، *COX1*، *COX2*، *ND1*، *ND2*، *ND3* و *ND4L* بهترین شاخص‌ها و جمعیت‌های ماهیان خاویاری هستند، چون بیشترین اختلاف توالی‌ها در این ژن‌ها به‌دست آمده است. از سوی دیگر، برای ژن *ND4L* کمترین اختلاف توالی بین گونه‌های تاسماهیان دریای خزر ثبت شده است که نشان‌دهنده بیشترین شباهت این ژن بین این گونه‌ها است. در همین راستا، برخی پژوهش‌ها تنوع ژنتیکی گونه‌های تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*) را براساس توالی ژنتیکی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندریایی مورد بررسی قرار داده‌اند، که نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود جمعیت مستقل (Nazari et al., 2020) و تنوع ژنتیکی قابل توجه برای این گونه بوده است (Khoshkholgh et al., 2011). علاوه بر این، مطابق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، دو مطالعه پیشین نشان داده‌اند که ژن‌های *ND5* و *ND6* نشانگرهای بسیار مفیدی برای ساختار ژنتیک جمعیتی گونه‌های استرلیاد (*Acipenser stellatus*) و تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) هستند (Pourkazemi, Rastorguev, 1997; Rezvani-Gilkolaei, 1996). همکاران (۲۰۰۸) براساس آزمون فیلوژنتیکی چندین گونه از ماهیان خاویاری، طبقه‌بندی زیر را برای ژن‌های میتوکندریایی پیشنهاد کرده‌اند: خیلی خوب (*ND5*) و خوب (*CYTB*)، خوب (*COX1*، *COX2*، *ND1*، *ND2*، *ND3*، *ND4* و *ATP6*)، متوسط (*ATP8*) و ضعیف (*ND4L* و *ND3*) و ضعیف

ژن‌های کد کننده پروتئینی مشابه با نتایج ارائه شده در مطالعه Shen و همکاران (۲۰۲۰) بود. در پژوهش حاضر، براساس درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای کل ژن‌های کد کننده پروتئین ماهیان خاویاری دریای خزر مشخص شد که دو گونه تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی بیشترین شباهت را با یکدیگر دارند، اما گونه ازون برون و استرلیاد کمترین شباهت را با هم دارا هستند. Tagliavini و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقات خود که براساس داده‌های سیتوژنتیک بود، به این نتیجه رسیدند که گونه‌های فیل ماهی، استرلیاد و کالوگا (*Huso kaluga*) که همگی ۱۲۰ کروموزومی‌اند، در پایه تمایز گونه‌های دیگر قرار گرفته‌اند و حداقل دو رویداد پلی‌پلوئیدی رخ داده است. علت پایین بودن نرخ تکامل در تاسماهیان نسبت به پستانداران مرتبط با این موضوع است که تاریخچه زندگی این گروه از ماهیان مثل کوسه‌ها و لاک‌پشت بوده، و تجدید نسل زمان‌بر، اندازه بدن بزرگ، خون سرد و میزان متابولیسم پایینی دارند (Avisé et al., 1992; Martin et al., 1992; Martin and Palumbi 1993; Luo, 1999). Luo و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از برخی از جایگاه‌های ژنی هسته‌ای شناسایی شده از طریق داده‌های ترانسکریپتومی قرار گرفته در پایگاه داده‌های ژنتیکی، اقدام به بررسی فیلوژنی تاسماهیان کردند و زمان واگرایی ماهیان خاویاری را همزمان با ماهیان پاروپوزه حدود ۲۰۴ میلیون سال تخمین زدند که این زمان حدود ۱۰ درصد دیرتر از برآوردهای قبلی بر اساس اطلاعات ژنوم میتوکندریایی و ژن سیتوکروم *b* بود. نتایج آن‌ها هم‌راستا با نتایج اخیر در تحلیل توالی‌های میتوکندریایی بود که جایگاه کل تاسماهیان دریای خزر را در کلاد A قرار داد.

### نتیجه‌گیری نهایی

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که توالی‌های ژنوم میتوکندریایی می‌توانند برای مطالعات تبارشناسی و خوشه‌بندی گونه‌های متفاوت ماهیان

(*ND6*) که شباهت زیادی با نتایج پژوهش حاضر دارد. در این تحقیق نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی برای توالی‌های آمینواسیدی ۱۳ ژن رمزگر پروتئینی در مقایسه با ژنوم کامل و توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها متفاوت بود، با توجه به ماهیت کدونی هر آمینو اسید (تشکیل شده از ۳ نوکلئوتید) و عدم تغییر در نوع برخی از آن‌ها علی‌رغم وجود تفاوت نوکلئوتیدی در توالی بازها (جهش خاموش یا *silent mutation*)، درصد تشابه ژنتیکی، بالاتر از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی خواهد بود. همچنین، دانشمندان مشاهده کردند که تفاوت به‌وجود آمده در توالی اسیدهای آمینه مهم در گونه‌های متفاوت بدین دلیل است که این گونه‌ها در زمان‌های مختلفی از هم مشتق شده‌اند و مصداق آن هم وجود سوابق فسیلی است (Dos Reis et al., 2016). از این‌رو، تغییرات آمینواسیدی که بین گونه‌ها تجمع می‌یابند عمدتاً آن‌هایی هستند که تأثیر کمی بر ساختار و عملکرد پروتئین دارند (Dos Reis et al., 2016). در همین راستا، Ariaeenejad و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نرخ جایگزینی نوکلئوتیدی نسبت به جایگزینی اسید آمینه‌ای در ژن  $\alpha$ -globin در تاسماهیان بیشتر است، ولی در درخت فیلوژنتیکی جایگزینی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای این ژن که از ژن‌های هسته‌ای است، جایگاه گونه‌های تاسماهیان دریای خزر کاملاً مشابه یکدیگرند. در بررسی که Shen و همکاران (۲۰۲۰) روی کل ژن‌های میتوکندریایی مسئول ساخت پروتئین‌های ریبوزومی و غیرریبوزومی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که نرخ تکامل ماهیان خاویاری کند است. براساس تقسیم‌بندی فیلوژنتیکی که این پژوهشگران روی تاسماهیان دنیا انجام دادند، کل تاسماهیان به سه کلاد A، B و C تقسیم‌بندی شدند که تاسماهیان دریای خزر جزء کلاد A قرار گرفتند و نتایج آن‌ها نشان داد که نرخ تکامل از کلاد A به C کاهش می‌یابد و این به‌طور کامل به خصوصیات شکل گرفتن منطقه جغرافیایی که در آن زیست می‌کنند مربوط است. در نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم جایگاه قرارگیری گونه‌های مورد بررسی نسبت به هم براساس

نشان دادند و کمترین تفاوت بین این گونه‌ها در ژن *ND4L* مشاهده شد. همچنین، براساس تجزیه و تحلیل ژن‌های میتوکندریایی کد کننده پروتئین در ماهیان خاویاری دریای خزر، محل قرارگیری این گونه‌ها در کلاذ A بود.

خاویاری مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه، صحت بررسی‌ها با استفاده از ژنوم‌های کامل میتوکندریایی بالاتر از توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها است و استفاده از توالی‌های آمینواسیدی به دلیل ماهیت کدونی آن‌ها پیشنهاد نمی‌شود. براین اساس، ژن‌های *ND2*، *ATP6*، *ND5* و *ND6* بیشترین تفاوت را در بین گونه‌های ماهیان خاویاری

## References

## ۵. منابع

- Abdoli, R., Mazumder, T.H., Nematollahian, S., Sourati Zanjani, R., Abdolahi Mesbah, R., Uddin, A., 2022. Gaining insights into the compositional constraints and molecular phylogeny of five silkworms mitochondrial genome. *International Journal of Biological Macromolecules* 206, 543-552. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.135
- Abdoli, R., Zamani, P., Ghasemi, M., 2018. Genetic similarities and phylogenetic analysis of human and farm animal species based on mitogenomic nucleotide sequences. *Meta Gene* 15, 23-26. DOI: 10.1016/j.mgene.2017.10.004
- Ariaeenejad, S., Kavousi, K., Elahi, E., Banaei-Moghaddam, A.M., Moosavi-Movahedi, A.A., 2022. Sturgeons: An Evolutionary Insight to The  $\alpha$ -globin Protein Speciation and Diversification. *bioRxiv* 2022-06. DOI: 10.1101/2022.06.11.495750
- Artyukhin, E.N., 2010. Morphological phylogeny of the order Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology* 22(1), 66-69. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.00930.x
- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B., Bermingham, E. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9(3), 457-473. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040735
- Behura, S.K., 2015. Insect phylogenomics. *Insect Molecular Biology* 24(4), 403-411. DOI: 10.1111/imb.12174
- Bemis, W.E., Kynard, B., 1997. Sturgeon rivers: An introduction to Acipenseriformes biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes* 48, 167-183. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1007312524792
- Boore, J.L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8), 1767-1780. DOI: 10.1093/nar/27.8.1767
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(4), 1967-1971. DOI: 10.1073/pnas.76.4.1967
- Choudhury, A., Dick, T.A., 1998: The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. *Journal of Biogeography* 25(4), 623-640. DOI: 10.1046/j.1365-2699.1998.2540623.x
- Cieslak, M., Pruvost, M., Benecke, N., Hofreiter, M., Morales, A., Reissmann, M., Ludwig, A., 2010. Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS One* 5(12), e15311. DOI: 10.1371/journal.pone.0015311
- Comber, S.C.L., Smith, C., 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society* 82(4), 431-442. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2004.00330.x

- da Silva, F.S., Cruz, A.C.R., de Almeida Medeiros, D.B., 2020. Mitochondrial genome sequencing and phylogeny of *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus spegazzinii*, and *Haemagogus tropicalis* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports* 10(1), 16948. DOI: 10.1038/s41598-020-73790-x
- Dos Reis, M., Donoghue, P.C.J., Yang, Z., 2015. Bayesian molecular clock dating of species divergences in 529 the genomics era. *Nature Reviews Genetics* 17(2), 71-80. DOI: 10.1038/nrg.2015.8
- Fontana, F., Tagliavini, J., Congiu, L., 2001. Sturgeon genetics and cytogenetics: Recent advancements and perspectives. *Genetica* 111, 359-373. DOI: 10.1023/A:1013711919443
- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4(1), 6-11. DOI: 10.1016/0169-5347(89)90006-2
- Khoshkholgh, M., Pourkazemi, M., Nazari, S., Azizzadeh Pormehr, L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 9(1), 17-25.
- Krieger, J., Fuerst, P.A., 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order *Acipenseriformes*. *Molecular Biology Evolution* 19(6), 891-897. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004146
- Luo, D., Li, Y., Zhao, Q., Zhao, L., Ludwig, A., Peng, Z., 2019. Highly resolved phylogenetic relationships within order *Acipenseriformes* according to novel nuclear markers. *Genes* 10(1), 38. DOI: 10.3390/genes10010038
- Martin, A.P., 1999. Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Molecular Biology Evolution* 16(7), 996-1002. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026189
- Martin, A.P., Naylor, G.J., Palumbi, S.R., 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357(6374), 153-155. DOI: <https://doi.org/10.1038/357153a0>
- Martin, A.P., Palumbi, S.R., 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(9), 4087-4091. DOI: 10.1073/pnas.90.9.4087
- Miuge, N.S., Barmintseva, A.E., Rastorguev, S.M., Miuge, V.N., Barmintsev, V.A., 2008. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Genetika* 44(7), 913-919. DOI: 10.1134/S1022795408070065
- Nazari, S., Pourkazemi, M., Khoshkholgh, M., 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.
- Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wei, Q., He, S. 2007. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: *Acipenseriformes*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42(3), 854-862. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.09.008
- Pourkazemi, M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. thesis. University of Wales, Swansea, UK.
- Pramod, R.K., Velayutham, D., Sajesh, P.K., Beena, P.S., Zachariah, A., Zachariah, A., Chandramohan, B., Sujith, S.S., Santhosh, S., Iype, S., Ganapathi, P., Kumar, B.D., Gupta, R., Thomas, G., 2018. The complete mitochondrial genome of Indian cattle (*Bos indicus*). *Mitochondrial DNA B* 3(1), 207-208. DOI: 10.1080/23802359.2018.1437836
- Rabiei, F., Abdoli, R., Rafiee, F., Ghavi Hossein-Zadeh, N., 2022. Genetic similarities and phylogenetic analysis of wild and domesticated species of sheep based on mitochondrial genome. *Animal Production Research* 11(3), 1-13. DOI: 10.22124/ar.2022.22429.1709
- Rahmani, H., Kazemi, B., Pourkazemi, M., 2012. Comparison of genetic diversity of cytochrome B gene of Shemaya (*Alburnus Chalcoides*) In Haraz, Shirud and Gazafrud rivers by PCR-RFLP method. *Modern Genetics Journal* 7(3), 227-232. (in Persian)

- Rastorguev, S., Mugue, N., Volkov, A., Barmintsev, V., 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(1), 46- 49. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2008.01089.x
- Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph.D. thesis. University of Wales, Swansea, UK.
- Rothfels, C.J., Larsson, A., Li, F.W., Sigel, E.M., Huiet, L., Burge, D.O., Ruhsam, M., Graham, S.W., Stevenson, D.W., Wong, G.K., Korall, P., Pryer, K.M., 2013. Transcriptome-mining for single-copy nuclear markers in ferns. *PLoS ONE* 8(10), e76957. DOI: 10.1371/journal.pone.0076957
- Shen, Y., Yang, N., Liu, Z., Chen, Q., Li, Y., 2020. Phylogenetic perspective on the relationships and evolutionary history of the Acipenseriformes. *Genomics* 112(5), 3511-3517. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.02.017
- Simon, C., Frati, B.F., Stewart, J.B., Beckenbach, A.T., 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 545-579. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 14(9), 348-352. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01638-9
- Tagliavini, J., Conterio, F., Gandolf, G., Fontana, F., 1999. Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae. *Journal of Applied Ichthyology* 15(4-5), 17-22. DOI: 10.1111/j.1439-0426.1999.tb00198.x
- Tamura, k., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2016. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30(12), 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Townsend, T., Alegre, R., Kelley, S., Wiens, J., Reeder, T.W., 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47(1), 129-142. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.01.008
- Zeng, L., Zhang, N., Zhang, Q., Endress, P.K., Huang, J., Ma, H., 2017. Resolution of deep eudicot phylogeny and their temporal diversification using nuclear genes from transcriptomic and genomic datasets. *New Phytologist* 214(3), 1338-1354. DOI: 10.1111/nph.14503
- Zhang, X., Wu, W., Li, L., Ma, X., Chen, J., 2013. Genetic variation and relationships of seven sturgeon species and ten interspecific hybrids. *Genetics Selection Evolution* 45(1), 21. DOI: 10.1186/1297-9686-45-21

