دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۱
http://japu.gau.ac.ir

معرفی ژن سیتوکروم b به‌عنوان ژن مناسب جهت تشخیص هویت خاویار و ماهیان خاویاری دریای خزر

*حامد کلنگی‌میاندره[۱]، حمید فرحمند[۲]، سیدمصطفی عقیلی‌نژاد[۳] و آرش اکبرزاده[۴]

[۱] استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه تهران، [۳]مدیریت امور ماهیان خاویاری استان گلستان، [۴]استادیار گروه شیلات، دانشگاه هرمزگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۱

چکیده

هدف از این پژوهش معرفی یک تکنیک ساده مولکولی برای شناسایی انوع خاویار در گونه‌های موجود در دریای خزر بود. به همین منظور نمونه‌های خاویار از هر یک از گونه‌های تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، قره‌برون (*A.percicus*)، شیپ (*A.nudiventris*)، ازون‌برون (*A.stellatus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*) به‌صورت جداگانه از صیدگاه‌های ترکمن، خواجه نفس، چالاشت و مرکز تکثیر و پرورش شهید رجایی ماهیان خاویاری استان گلستان تهیه گردید. DNA استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از سه عدد پرایمر (R_1، F_{1a} و F_{2a})، طراحی شده بر اساس ژن سیتوکروم b، طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) تکثیر شدند. پرایمرهای R1 و F1a به‌عنوان پرایمر اختصاصی برای تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری معرفی شدند. هم‌چنین در این پژوهش پرایمرهای R1 و F2a به‌عنوان یک پرایمر اختصاصی برای گونه ازون‌برون معرفی شدند. علاوه بر آن، نتایج توالی‌یابی به‌دست آمده از قطعه مورد مطالعه ژن cytb نیز به‌خوبی نشان داد که ناحیه مورد هدف و پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش می‌تواند برای تفکیک سه گونه فیل‌ماهی، شیپ و ازون‌برون به‌کار رود. مطالعه‌های فیلوژنیک و تعیین میزان همولوژی در بین توالی‌های به‌دست آمده مشخص نمود که دو گونه تاس‌ماهی ایرانی و روسی در ناحیه مورد مطالعه به‌طور کامل با هم مشابه می‌باشند. نتایج این پژوهش می‌تواند در شناسایی خاویار در موارد دادگاهی (قاچاق)، صادرات و واردات مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ژن سیتوکروم b، خاویار، PCR، پرایمر، ماهیان خاویاری

* مسئول مکاتبه: hkolangi@gmail.com

مقدمه

ماهیان خاویاری به‌دلیل ارزش اقتصادی بالای فرآورده‌های به‌دست آمده از آنها مانند خاویار، همواره مورد سوءاستفاده‌های متعددی همانند صید بی‌رویه یا خارج از فصل و قاچاق قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین معضلات در این خصوص جایگزینی خاویار با قیمت پایین‌تر به جای خاویار با قیمت بالاتر توسط افراد سودجو به بازار مصرف می‌باشد. به‌عنوان مثال فروش خاویار گونه‌هایی هم‌چون *Acipenser stellatus, Acipenser gueldenstaedtii* به‌عنوان خاویار *Huso huso* در بازارهای امریکا (بیرستین و همکاران، ۱۹۹۹). برای درک اهمیت این مطلب لازم است یاد شود که هر اونس (۲۸/۳۵ گرم) خاویار تاس‌ماهی و فیل‌ماهی به‌ترتیب با قیمت بیش از ۲۵ و ۵۰ دلار در بازارهای آمریکا معامله می‌شود (لودویگ و همکاران، ۲۰۰۲). تخلف در خصوص خاویار به گونه‌ای است که حتی افرادی خاویار فاسد گونه‌های ازرشمند را به جای گونه‌های با ارزش اقتصادی کمتر به بازارهای مصرف عرضه می‌کنند (بیرستین و همکاران، ۱۹۹۹). در یک مطالعه موردی مشخص گردید که ۱۷ درصد از خاویار عرضه شده به بازار آمریکا در آوریل ۱۹۹۶ و بیش از ۳۲ درصد در دسامبر ۱۹۹۶ از لحاظ درستی گونه معرفی شده در برچسب محصول هم‌خوانی نداشتند (ولف و همکاران، ۱۹۹۹). تشخیص تخلف‌های یاد شده در صورتی‌که ماهی سالم در دسترس باشد به‌راحتی از طریق روش‌های مورفومیرستیک مانند شکل بدن، رنگ، تعداد شعاع باله‌ها و تعداد پلاک‌های روی بدن امکان‌پذیر است. اما استفاده از این خصوصیات ظاهری برای شناسایی ماهیانی که به‌صورت غیر قانونی صید شده‌اند همیشه جوابگو نسیت. برای مثال تشخیص هویت ماهیان از طریق فیله و یا خاویار روش‌های پیشرفته‌تری مانند تکنیک‌های رایج مولکولی را می‌طلبد (لودویگ و همکاران، ۲۰۰۱،۲۰۰۲).

mtDNA و به‌خصوص ژن سیتوکروم b به‌دلیل وراثت سیتوپلاسمی و عدم نوترکیبی مدت زمانی است که به‌عنوان نشانگر ژنتیکی[1] مناسبی برای بررسی‌های سیستماتیک مولکولی به‌خصوص تفکیک گونه‌ای، ژنتیک جمعیت و بررسی روابط شجره‌ای (مایر، ۱۹۹۳) در پژوهش‌های داخل (پورکاظمی، ۱۳۷۸) و خارج از کشور (بیرستین، ۱۹۹۷) مطرح است. به‌نظر می‌رسد یکی دیگر از دلایل انتخاب ژن سیتوکروم b در این قبیل مطالعه‌ها پایداری و محافظت این ژن در طول تکامل نسبت به سایر نقاط mtDNA نظیر D-loop باشد. این عمل شاید به‌دلیل اهمیت حیاتی ژن یاد شده در فعالیت‌های حیاتی

1- Genetic Markers

سلول در چرخه کرپس باشد (کوچر و همکاران، ۱۹۸۹). در هر صورت به‌دلیل تغییرات اندک ژن سیتوکروم b در بین گونه‌ها یکی از مشکلات، تعیین پرایمرهای اختصاصی برای گونه مختلف ماهیان می‌باشد. چرا که در بسیاری از موارد پرایمرهای طراحی شده برای این ژن در گونه‌های نزدیک به هم جواب یکسانی را می‌دهند. در این مطالعه سعی شده است تا با بررسی دقیق ژن‌های سیتوکروم b که تا به حال کشف شده اقدام به طراحی پرایمرهای اختصاصی فقط برای ماهیان خاویاری شود تا بتوان راه‌حلی مطمئن و کم‌هزینه جهت تشخیص هویت مولکولی این ماهیان پیدا نمود تا در موارد اختلافات دادگاهی، حفاظت و کشف جرم قاچاق خاویار مورد استفاده قرار گیرد. این موضوع به‌خصوص با توجه به قوانین جدید CITES[1] در مورد گونه‌های ماهیان خاویاری از اولویت بالایی در صادرات خاویار برخوردار است (ری مارکر، ۲۰۰۲).

مواد و روش‌ها

این پروژهش بر روی ۵ گونه از ماهیان خاویاری تاس‌ماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*)، تاس‌ماهی روسی یا چالباش (*Acipenser gueldenstaedti*)، تاس‌ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*)، ازون‌برون یا دراکول (*Acipenser Stellatus*) و فیل‌ماهی یا بلوگا (*Huso huso*) که جزو باارزش‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری دنیا می‌باشند، صورت گرفت. نمونه‌ها از صیدگاه‌های چالاشت، ترکمن، خواجه‌نفس و مرکز تکثیر ماهیان خاویاری واقع در شهرستان آق‌قلا استان گلستان به‌صورت تازه تهیه گردید. برای هر گونه در هر صیدگاه ۳ عدد ماهی انتخاب شده و به‌میزان تقریبی ۵-۳ گرم خاویار از آنها استحصال گردید. جهت جلوگیری از خطای محاسباتی ناشی از تنوع ژنتیکی در بین افراد، خاویار به‌دست آمده در ایستگاه‌های مختلف در هر گونه به‌طور مجزا با هم مخلوط شده و سپس در ازت مایع و فریزر ۸۰- تا زمان استخراج DNA نگهداری شده‌اند. جهت استخراج DNA، تعداد ۱۰ عدد تخم برای هر گونه مورد استفاده قرار گرفت. کل DNA (ژنومی و میتوکندریایی) بر اساس پروتکول دسال و همکاران (۱۹۹۳) به روش فنل-کلروفرم با کمی تغییرات جزئی استخراج گردید. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی ژل اگاروز ۱ درصد و

1- Convention on International Trade in Endangered Species

هم‌چنین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر انجام گردید. سپس منطقه مورد بررسی ژن سیتوکروم b با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) بوسیله دستگاه ترموسایکر تکثیر شدند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده از توالی ژن سیتوکروم b

اسم پرایمر	توالی	تعداد نوکلئوتید	دمای ذوب
F_1a	GCC TAC GCC ATT CTC CG	۱۷	۵۴
F_2a	GGA GTC CTA GCC CTC CTG	۱۸	۵۴
R_1	CCT CCA ATT CAT GTG AGT ACT	۲۱	۵۲

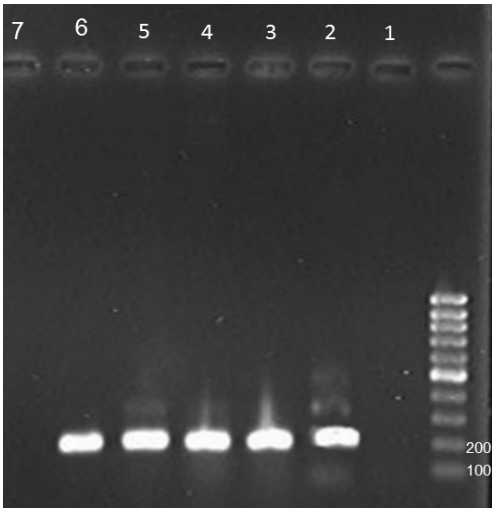
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در تیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Amersham Pharamacia (مدل TC341-UK) انجام گرفت. برنامه تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر برای مرحله واسرشته‌سازی (Denaturation) به‌مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس برای مرحله دوم برای اتصال یا (Annealing) در درجه حرارت ۵۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و برای مرحله بسط (Extention) در درجه حرارت ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و برای بسط نهایی دما در ۷۲ درجه برای مدت ۱۰ دقیقه تنظیم می‌گردد. برای هر واکنش PCR، ۱۰۰ نانوگرم DNA،۲,۵ واحد آنزیم تک‌پلی‌مراز (سینا ژن)، ۱۰ میلی‌مولار dNTPs (سینا ژن)، ۵۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ (سینا ژن)، ۵ میکرولیتر PCR Buffer ۱۰X (سینا ژن) و ۲۰ پیکومول برای هر جفت پرایمر با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. محصول PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد. باندهای به‌دست آمده سپس توسط کیت خالص‌سازی PCR (کیت Purify از شرکت Roche آلمان تهیه شده بود) خالص شده و توالی‌یابی گردید (ABI PRISM). ۳۷۷ توالی‌های به‌دست آمده برای هر گونه در فضای نرم‌افزاری BLAST (NCBI) و ClustalV تجزیه و تحلیل شده و مورد تائید قرار گرفت. مطالعات فیلوژنتیک و تحلیل‌های آماری توسط روش UPGMA ارزیابی شدند.

نتایج

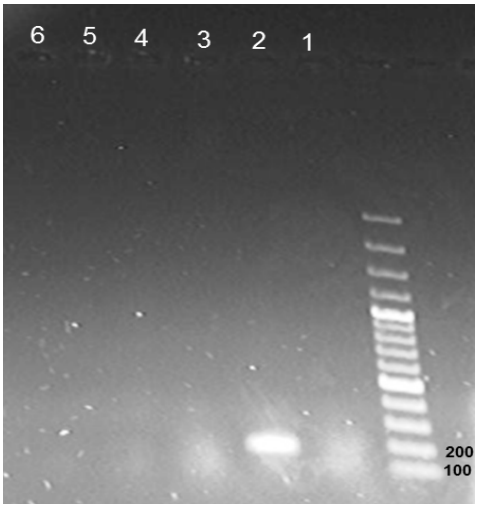
ارزیابی کیفی DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتوفتومتری نشان‌دهنده نبود آلودگی DNA مورد مطالعه به پروتئین بود (۱/۸=۲۶۰/۲۸۰). پرایمرهای F1a و R1 باندهای واضح را با اندازه تقریبی ۲۰۰ جفت باز در تمامی ۵ گونه ماهیان خاویاری نشان داد (شکل ۱). در حالی‌که DNA

به‌دست آمده از ماهی کپور هیچ‌گونه باندی را با استفاده از پرایمرهای یاد شده ظاهر نکرد که بیانگر اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش برای ماهیان خاویاری بوده و می‌تواند به‌خوبی جهت شناسایی خاویار گونه‌های تقلبی به‌کار رود.

پرایمرهای R1 و F2a تنها در ماهی ازون‌برون باند واضحی با اندازه تقریبی ۲۰۰ جفت باز ایجاد نمود اما در سایر گونه‌های ماهیان خاویاری و کپور معمولی محصولی ایجاد نکرد. این پرایمر (F2a) به‌عنوان یک پرایمر اختصاصی برای گونه یاد شده معرفی شد (شکل ۲).



شکل ۱- منطقه مورد مطالعه ژن سیتوکروم b که با استفاده از دو پرایمرهای F1a و R1 تکثیر شدند، چاهک ۲: فیل‌ماهی، چاهک ۳: ازون‌برون، چاهک ۴: تاس‌ماهی ایرانی، چاهک ۵: تاس‌ماهی شیپ، چاهک ۶: تاس‌ماهی روسی). چاهک ۱: محصول به‌دست آمده از DNA کپور که به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار رفت، چاهک ۷: ترکیبات PCR بدون DNA (کنترل منفی).



شکل ۲- منطقه مورد مطالعه ژن سیتوکروم b که با استفاده از دو پرایمر اختصاصی F2a,R1 در گونه ازون‌برون طراحی شده بود (چاهک ۱: فیل‌ماهی، چاهک ۲: ازون‌برون، چاهک ۳: تاس‌ماهی ایرانی، چاهک ۴: تاس‌ماهی شیپ، چاهک ۵: تاس‌ماهی روسی)- چاهک ۶: DNA به‌دست آمده از کپور معمولی به‌عنوان کنترل مثبت.

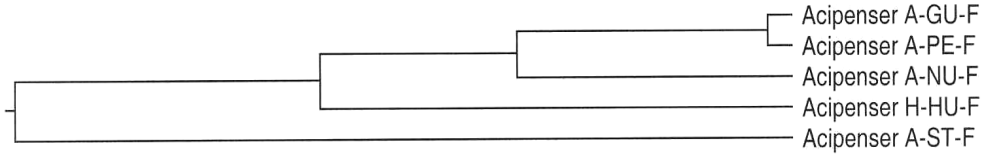
نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی محصولات PCR و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده در فضای نرم‌افزار BLAST مشخص نمود که پرایمرهای به‌کار رفته به درستی ژن سیتوکروم b را تکثیر نموده و

بنابراین می‌توانند در تفکیک سه گونه *Acipenser stellatus, Acipenser nudiventris, Huso huso* مورد استفاده قرار گیرند. دو گونه *Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser persicus* به‌دلیل شباهت ۱۰۰ درصد در توالی‌های مورد بررسی قابل تفکیک نبودند. نتایج به‌دست آمده از مقایسه و ترتیب توالی گونه‌های مورد بررسی و هم‌چنین درصد شباهت و تفاوت توالی‌های به‌دست آمده در این پژوهش به‌ترتیب در شکل ۳ و جدول ۲ مشخص شده است.

جدول ۲- درصد یکسانی و میزان تفاوت توالی در بین گونه‌های مورد آزمایش

		۱	۲	۳	۴	۵	
فیل ماهی	۱	-------	۸۹٫۸	۹۱٫۴	۸۷٫۳	۸۲٫۶	۱
چالباش	۲	۱۰٫۱	-------	۹۱٫۸	۱۰۰	۸۰٫۲	۲
شیپ	۳	۸٫۶	۸٫۲	-------	۹۳٫۶	۸۱٫۳	۳
قره برون	۴	۱۲٫۷	۰٫۰	۶٫۴	-------	۸۰٫۲	۴
ازون برون	۵	۱۷٫۴	۱۹٫۸	۱۸٫۷	۱۹٫۸	-------	۵
		۱	۲	۳	۴	۵	

نتایج مطالعه فیلوژنتیک نیز نشان داد که دو گونه تاس‌ماهی ایرانی و روسی دارای بیشترین شباهت در منطقه مورد مطالعه بوده و گونه ازون‌برون و شیپ نسبت به آنها به‌ترتیب در فاصله دورتر و نزدیک‌تری قرار گرفته‌اند (شکل ۳).



شکل ۳- دندوگرام به‌دست آمده از روش Neighbor joining در بین ۵ گونه از ماهیان خاویاری، (H.HU: فیل‌ماهی، A.ST: ازون‌برون، A.PER: تاس‌ماهی ایرانی، A.NU: تاس‌ماهی شیپ، A.GU: تاس‌ماهی روسی).

```
     C A G G G G G G - T T C T - G C C C T T C T - A T T C T C T   Majority
                       10                          20                          30
1    C A G G C G G G - G T N T A G C C C T T C T - A T T C T C T   h-kuso
1    C A G G G G G A G T T C T - G C C C T T C T - A T T C T C T   a-gul
1    C A G G G G G G - G T C T - G C C C T T C N - A T T C T C T   a-rudi
1    C A N G G G G N - T T C T - G C C C T T C T - A T T C T C T   a-pers
1    G C G G A G - - - C C T A - G C C C T C C T G G T T C T C T   a-stel

     A T C C T A G T C C T A A T A T T A G T G C C A A T A C T C   Majority
                       40                          50                          60
29   A T T C T A G T C C T A A T A T T A G T G C C A G T G C T C   h-kuso
29   A T C C T A G T C C T A A T A T T A G T A C C A A T A C T C   a-gul
28   A T C C T A G T C C T A A T A T T A G T G C C A A T A C T C   a-rudi
28   A T C C T A G T C C T A A T A T T A G T A C C A A T A C T C   a-pers
27   A T C C T A G T G C T A A T A T T A G T G C C A A T G C T T   a-stel

     C A C A C C T C T A A A C A A C G A G G A A A C A C A T T C   Majority
                       70                          80                          90
59   C A C A C C T C T A A A C A A C G G G G A A A C A C A T T C   h-kuso
59   C A C A C C T C T A A A C A A C G A G G A A A C A C G T T C   a-gul
58   C A C A C C T C T A A A C A A C G A G G A A A C A C A T T C   a-rudi
58   C A C A C C T C T A A A C A A C G A G G A A A C A C G T T C   a-pers
57   C A C A C C T C T A A G C A A C G A G G A A A C A C A T T T   a-stel

     C G A C C C C T T T C T C A A A T T C T A T T C T G G G C C   Majority
                      100                         110                         120
89   C G A C C C C T T T C T C A A A T T C T A T T C T G G A C C   h-kuso
89   C G A C C C C T T T C T C A A A T T C T A T T C T G A G C C   a-gul
88   C G A C C C C T T T C T C A A A T T C T A T T C T G G A C C   a-rudi
88   C G A C C C C T T T C T C A A A T T C T A T T C T G A G C C   a-pers
87   C G G C C C C T T T C C C A A A T T C T A T T C T G G G C C   a-stel

     C T A G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G G   Majority
                      130                         140                         150
119  C T A G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G G   h-kuso
119  C T G G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G N   a-gul
118  C T A G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G G   a-rudi
118  C T G G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G N   a-pers
117  C T A G T G G C C G A C A T A C T A G T A C T C A C A T G -   a-stel

     A A T T G G A G G A X X X X X                                 Majority
                      160
149  A A T T G G A G G A A G G G G                                 h-kuso
149  A A T T G G A G G A                                           a-gul
148  A A T T G G A G G A A G G G G                                 a-rudi
148  A A T T G G A G G A                                           a-pers
146  A A T T G G A G G A                                           a-stel
```

شکل ۴- مقایسه توالی هر یک از گونه ها رانشان می‌دهد، (H.HU: فیل‌ماهی، A.ST: ازون‌برون، A.PER: تاس‌ماهی ایرانی، A.NU: تاس‌ماهی شیپ، A.GU: تاس‌ماهی روسی.

بحث

در این پژوهش امکان تفکیک خاویار از انواع گروه‌های مختلف با استفاده از نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن سعی شد تا با استفاده از مارکرهای یاد شده بتوان انواع خاویار را از هم جدا نمود. سابقه استفاده از تکنیک‌های مولکولی مانند RFLP و RAPD در جداسازی هویت ماهیان خاویاری در دنیا به‌طور عمده به دو دهه قبل برمی‌گردد. بیشتر محققان از تکنیک‌های یاد شده جهت تعیین فراوانی اللی و مطالعات جمعیتی گونه‌های مختلف بهره جستند (بیرستین و همکاران، ۲۰۰۰؛ ولف و همکاران، ۱۹۹۹). در ایران نیز اخیراً از تکنیک‌های مولکولی به‌خصوص PCR-RFLP جهت مطالعه‌های جمعیتی گونه‌های متفاوت آبزیان استفاده شده است. از پژوهش‌های صورت گرفته می‌توان به بررسی جمعیت تاس‌ماهی روسی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP توسط پورکاظمی (۱۹۹۹) اشاره نمود. به‌نظر می‌رسد هدف اصلی این قبیل مطالعه‌ها اندازه‌گیری میزان فراوانی اللی و در نهایت تفکیک جمعیت ماهیان یاد شده بوده و نگرش تشخیص هویت فردی[1] مدنظر نبوده است.

این پژوهش در راستای روش بریستین و همکاران (۱۹۹۸) با تغییرات جزئی جهت تشخیص هویت خاویار صورت گرفته است. به این منظور پس از تجزیه و تحلیل ۱۲۴ توالی ثبت شده ژن سیتوکروم b در بانک‌های اطلاعاتی موجود، طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت تفکیک خاویار با موفقیت صورت گرفت. علاوه‌بر آن در این مطالعه مشخص شد که منطقه مورد بررسی ژن یاد شده به‌خوبی می‌تواند خاویار ۳ گونه تجاری تاس‌ماهی شیپ، فیل‌ماهی و ازون‌برون را با یک PCR و توالی‌یابی ساده تفکیک نماید. دیگر دستاورد این پژوهش معرفی یک جفت پرایمر تخصصی برای گونه ازون‌برون می‌باشد. که می‌تواند خاویار یاد شده را از سایر خاویارهای موجود در بازار جداسازی نماید. مقایسه نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با مطالعه بیرستین و همکاران (۱۹۹۸) که بر روی خاویارهای موجود در بازار نیویورک انجام شده بود در یک راستا قرار داشت.

یکی دیگر از روش‌های مولکولی به‌کار رفته جهت تشخیص هویت خاویار در دنیا و شاید ایران استفاده از تکنیک PCR-RFLP می‌باشد. بر اساس منابع مورد بررسی مشخص گردید که تکنیک یاد شده نیز قادر به جداسازی خاویارهای موجود در بازار جهانی است. به‌عنوان مثال ولف و همکاران

1- Molecular forensic

(۱۹۹۹) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP موفق به جداسازی ۱۰ گونه از ۲۱ نمونه خاویار موجود در بازار سوئیس شده‌اند. لودویگ و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از تکنیک مشابه‌ای قادر به جداسازی ۱۷ گونه از ۲۲ نمونه ماهیان خاویاری در آلمان شده‌اند. با توجه به این‌که در مطالعه‌های بالا تفکیک گونه‌ای به‌طور ۱۰۰ درصد در نمونه‌های آزمایشی صورت نپذیرفته به‌نظر می‌رسد در مطالعه‌ها مبتنی بر PCR-RFLP جهت جداسازی تمامی گونه‌ها نیازمند بررسی منطقه بزرگ‌تری از ژن هدف و به دنبال آن استفاده از آنزیمی‌های برشی متعدد می‌باشد. بنابراین شاید استفاده از پرایمر اختصاصی (به‌عنوان مثال روش معرفی شده در این پژوهش) و یا حتی تکنیک توالی‌یابی (با توجه به سیر نزولی هزینه توالی‌یابی در دنیا) بتواند به‌عنوان روش مکمل و یا جایگزینی RFLP مطرح گردد. در هر صورت هدف از این پژوهش معرفی روشی ارجح نسبت به تکنیک PCR-RFLP نمی‌باشد.

رابطه‌های فیلوژنتیک بین گونه‌های خاویاری مورد مطالعه نیز با دانسته‌های مورفولوژیک هماهنگ بوده به‌طوری‌که قره‌برون و چالباش در یک کلاستر قرار گرفته و دارای کمترین فاصله ژنتیکی می‌باشند در حالی‌که ازون‌برون بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت به سایر خاویارهای مورد مطالعه از خود نشان داده است (جدول ۱). این نتایج با بررسی میزان همبستگی و مقایسه توالی‌های بدست آمده بین گونه‌ها نیز تائید گردیده است که خود بیانگر اختصاصی بودن پرایمر آزمایش شده در تشخیص هویت خاویار ازون‌برون است. یافته به‌دست آمده با نتایج بررسی فیلوژنتیک دسال و همکاران (۱۹۹۸) که بر روی ۲۵ گونه از ماهیان خاویاری صورت گرفته بود و هم‌چنین بیرستین و همکاران (۱۹۹۹الف، ۱۹۹۸) مشابهت داشته است.

در انتها یاد آور می‌شود که هنوز کاندیدهای دیگری نظیر (mtDNA)12S,D-loop,16S و 28S (DNA ژنومی) نیز می‌تواند جهت تشخیص هویت خاویار ماهیان دریای خزر مطرح گردد. مطالعه‌های اولیه توسط گروه حاضر نیز در این خصوص در حال اجرا است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران آزمایشگاه دام و آبزیان مرکز ملی ژنتیک و زیست فناوری و آزمایشگاه اصلاح و نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران به‌دلیل فراهم نمودن امکانات و مواد آزمایشگاهی و کلیه همکاران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Birstein, V.J., Bemis, W. and Waldman, J.R. 1997. The threatened status of acipenseriform fishes: a summary. In: *Sturgeon Biodiversity and Conservation* (eds. Birstein VJ, Waldman JR, Bemis WE). Kluwer. Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Pp: 423-431.
2. Birstein, V.J., Bemis, W.E. and Waldman, J.R. 1997a. The threatened status of acipenseriform fishes: A summary. *In*: BIRSTEIN, V.J., J.R. WALDMAN and W.E. BEMIS (eds.): Sturgeon Biodiversity and Conservation, Kluwer. Academic. Publishing. Dordrecht. Pp: 437-444.
3. Birstein, V.J., Hanner, R. and Desalle, R. 1997b. Phylogeny of acipenseriformes cytogenetic and molecular approaches. *In*: BIRSTEIN, V.J., J.R. WALDMAN and W.E. BEMIS (eds.): Sturgeon Biodiversity and Conservation, Kluwer. Academic. Publishing. Dordrecht. Pp: 127-155.
4. Birstein, V.J. and DeSalle, R. 1998. Molecular phylogeny of acipenserinae Molec. Phylogen. Evol. 9: 141-155.
5. Birstein, V.J., Doukakis, P., Sorkin, B. and DeSalle, R. 1998. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar. Conserv. Biol. 12: 766-775.
6. Birstein, V.J., Doukakis, P. and DeSalle, R. 1999 Molecular phylogeny of acipenserinae and black caviar species identification. Apply Ichthyology. 15: 12-16.
7. Birstein, V.J., Doukakis, P. and Desalle, R. 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*: forensic and evolutionary implications. Cons. Gen. 1: 81-88.
8. Desalle, R. and Birstein, V.J. 1996. PCR identification of black caviar. Nature. 381: 197-198.
9. Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6196-6200.
10. Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky, V. and Jenneckens, I. 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). Genetics. 158: 1203-1215.
11. Ludwig, A., Debus, L. and Jenneckens, I. 2002. A molecular approach to control the international caviar trade in black caviar. International Review of Hydrobiology. 87: 661-674.
12. Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *In*: HOCHACHKA, P.W. and T.P. MOMMSEN(eds.): The biochemistry and molecular biology of fishes (Vol. 2). Elsevier, Amsterdam. 1- 38.

13.Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A. 1999. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. J. Appli. Ichthyol. 15: 23-28.
14.Raymakers, C. 2001: International trade in sturgeon and paddlefish species - the effect of CITES listing. International Review of Hydrobiology. 87: 525-537.
15.Wolf, C., Hubner, P. and Luthy, J. 1999. Differentiation of sturgeon species by PCR-RFLP. Food. Res. Int. 32: 699-705.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Utilization and Cultivation of Aquatics, Vol. 1(2), 2012
http://japu.gau.ac.ir

Introdution of Cyt b Gene as usfuel gene for identification of caspian Sturgeon Caviar

***H. Kolangi Miandare[1], H. Farahmand[2], S.M. Aghilinejhad[3] and A. Akbarzadeh[4]**

[1]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Fisheries, University of Tehran, [3]Sturgeon Managmnet of Golestan Fisheries Office, [4] Assistant Prof., Dept. of Fisheries, University of Hormozgan

Received: 2012-2-18 ; Accepted: 2012-5-10

Abstract

The objective of this study was to introduce a simple method for identification of caviar species in caspian sea sturgeons. For this purpose, caviar samples of *Acipenser gueldenstaedtii, A. percicus, A. stellatus, A. ndiventeri* and *Huso huso* were collected from fishery stations, Khajenaphas, Torkaman and Chalasht in Golestan province and propagation center of sturgeons in Aghalla city. The extracted DNA from caviars were amplified using three primers termed R1, F2a and F1a, which were designed for cytb gene in the mtDNA. The primers of R1 and F1a were universlly introduced for all corresponding species in this study whereas R1 and F2a were spesific for *A. stellatus*. In addition, the results of sequencing obtained in cytb gene showed that the region studied here can be successfully utilized for identification of *A. stellatus, A. ndiventeri* and *Huso huso* species. phylogenetical study and the sequential corrolation among species studied verified the results obtained in this investigation. The results of this study can be perfectly used for identification of caviar in forensic,import and export issues.

Keyword: Primer; *Sturgeon*; PCR; Caviar; Cytocromb Gene

* Corresponding Author; Email: hkolangi@gmail.com