E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/

Vol. 36, No. 3 (2023), 40-48.

Paper Type: Original Article

Molecular Tracing of Caviar Obtained from Sturgeon Species to Identify the Original and Species of Sturgeon

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

*[1] Assistant Professor, Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran;(**Corresponding author**: jamshidi99@yahoo.com).*

[1] Instructor, Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran; saber.merag@gmail.com.

[2] Assistant Professor, Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran; onsef_shokri@yahoo.com.

Citation:

Jamshidi, Sh., & Hasanzadeh Saber, M., & Monsef Shokri, M. (2023). Molecular tracing of caviar obtained from sturgeon species to identify the original and species of sturgeon. *The quarterly scientific journal of applied biology, 36*(3), 40-48.

Received: 13/04/2022 Accepted: 12/06/2023

Abstract

Introduction: Identifying the species of sturgeon, preventing the mixing of caviar from several sturgeon species in their made product is one of the most important challenges in the legal and international trade of this product. One of the ways to identify the original caviar and correctly label caviar products is to apply barcodes and especially molecular barcode tracking.

Methods: In this research, fin tissue samples of Russian and Persian sturgeon, Ship, Sterlet, stellate, Siberian and beluga, as well as their caviar samples, were used to investigate species identification markers of Caspian Sea sturgeon. DNA extraction was performed from three caviar eggs of each species and pure sturgeons fin tissue, and two types of primers were selected based on mitochondrial genes.

Results: The COI gene amplified by PCR using the ACoI F/R primer set showed the presence of a 138 nucleotide fragment in the sturgeon species only, but the species-specific marker amplified different sized fragments based on D-loop gene. These fragments were reproduced in both caviar and fin tissue of sturgeons. The overall results showed that the amplified fragment of the sturgeon marker and the species-specific marker in pure sturgeons can indicate the pure fish species.

Conclusion: The low diversity and abundance of food items in the cave habitat implies a more intense competition for food in the cave's unique environment with low energy resources. The presence of various-sized prey among the food items indicates an opportunistic feeding habit in this toad, as well.

Keywords: Molecular barcoding, Caviar, Mitochondrial gene, COI, D-loop,

Corresponding Author: jamshidi99@yahoo.com

https://doi.org/10.22051/jab.2023.42758.1545

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۶، شماره (۳)، (۱۴۰۲)، ۴۸ - ۴۰
https://jab.alzahra.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

ردیابی مولکولی خاویار استحصال شده از گونه‌های تاسماهیان برای تشخیص اصل و نوع خاویار

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

[۱]استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

[۱]مربی، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

[۲]استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

نویسنده مسئول: ***jamshidi99@yahoo.com***

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲

چکیده

مقدمه: تشخیص گونه تاسماهیان، جلوگیری از آمیختگی خاویار چندگونه در محصولات تهیه شده از آن‌ها از چالش‌های بسیار مهم در تجارت قانونی و بین‌المللی این محصولات می‌باشد. یکی از روش‌های شناسایی خاویار اصل و برچسب‌گذاری صحیح محصولات خاویار، استفاده از بارکدها و به‌ویژه ردیابی با بارکد مولکولی می‌باشد.

روش‌ها: در این تحقیق برای بررسی نشانگرهای تشخیص گونه‌ای تاسماهیان دریای کاسپین از نمونه‌های بافت باله تاسماهی روسی، ایرانی، شیپ، استرلیاد، ازون‌برون و فیل‌ماهی خالص دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری و هم‌چنین نمونه خاویار آن‌ها استفاده شد. استخراج DNA از سه دانه خاویار از هرگونه و بافت باله تاسماهی خالص انجام شد و دو نوع آغازگر بر اساس ژن‌های میتوکندریایی انتخاب شد.

یافته‌ها: تکثیر ژن COI با استفاده از روش PCR با جفت پرایمر ACOI یک قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی را تنها در تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری نشان داد؛ اما نشانگر گونه‌ای قطعاتی با اندازه‌های متفاوت بر اساس ژن D-loop را تکثیر کرد. این قطعات هم در خاویار و هم بافت باله تاسماهیان تکثیر شد.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی نشان داد که تکثیر قطعات نشانگر تاسماهیان و نشانگر گونه‌ای در تاسماهیان خالص می‌تواند نشان‌دهنده خالص بودن گونه باشد.

کلیدواژه‌ها: بارکد مولکولی، خاویار، ژن میتوکندریایی، COI، D-loop.

۱- مقدمه

یکی از ارزشمندترین مواد غذایی خاویار است که به تخمک‌های بارور نشده استحصالی از جنس ماده گونه‌های مختلف تاسماهیان (Sturgeons) اطلاق می‌شود. خاویار ایران دهه‌ها به دلیل شرایط اکولوژیکی سواحل جنوبی دریای کاسپین و هم‌چنین رعایت دقیق استانداردهای بهداشتی GMP[1] و HACCP[2] در کلیه مراحل صید، عمل‌آوری، جابجایی و حمل‌ونقل، بسته‌بندی و نگهداری از بالاترین کیفیت در سطح جهان برخوردار بوده است. رعایت استانداردهای رقم‌بندی خاویار بر اساس اندازه، رنگ، سالم بودن دانه‌ها و یکپارچگی آن‌ها، توجه و اجرای دقیق مقررات بین‌المللی و به‌طورکلی کیفیت خاویار ایران توجه تجار و توزیع‌کنندگان خاویار در سطح جهان جلب نموده و تقاضای بیشتری در مقایسه با میزان عرضه برای آن وجود داشته است [1].

خاویار یک ماده غذایی لذیذ و پراهمیت می‌باشد که ضریب هضمی و جذبی بالایی دارد و درصد بالایی از پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب غیراشباع در آن موجود می‌باشد که ازجمله مواد مغذی موردنیاز بدن انسان برای رشد و ترمیم و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌باشد. سه نوع خاویار بلوگا، آسترا و سوروگا به ترتیب حاصل از تخمک فیل‌ماهی (*Huso huso*)، تاسماهی ایرانی یا روسی (*Acipenser persicus*، *A. gueldenstadti*) و ازون برون (*A. stellatus*) در بازار جهانی به فروش می‌رسد که خاویار بلوگا بهترین کیفیت را از جهت اندازه دان (دان درشت)، رنگ و استحکام دارا می‌باشد. گونه، مرغوبیت و عدم آمیختگی خاویار چندگونه در محصولات تهیه شده از خاویار تاسماهیان از چالش‌های بسیار مهم در تجارت قانونی و بین‌المللی این محصولات می‌باشد.

امروزه، برای جلوگیری از تجارت غیرقانونی خاویار ماهیان وحشی دو مرکز اروپایی (شرکت خصوصی Geneus biotech و مرکز تحقیقاتی IGB آلمان) متولی ردیابی در ماهیان خاویاری می‌باشند. این شرکت‌ها یک الگوی ژنومی منحصربه‌فرد را برای هر ماهی مادر با خاویار آن شناسایی می‌کنند. آزمایش آن‌ها می‌تواند منشاء والدین را تا سطح یک تخمک خاویار شناسایی کند. این شناسه مبتنی بر DNA با فناوری مرسوم فرستنده غیرفعال نسل بعدی (Next-generation passive transponder technology) که بر روی بسته‌بندی محصول اعمال می‌شود، همراه می‌باشد و درنتیجه یک زنجیره‌تامین محصول کاملا قابل ردیابی، ایجاد می‌شود. از طرفی، در داخل کشور، در بسیاری از رستوران‌ها و مراکزی که مدعی استفاده از گوشت و خاویار تاسماهیان می‌باشند، هم احتمال تقلب و جایگزینی با گوشت دیگری از آبزیان هم وجود دارد. بر اساس اطلاعات مجمع بین‌المللی گونه‌های در معرض خطر انقراض (CITES) تمامی گونه‌های خانواده تاسماهیان جزء گونه‌های حفاظت شده می‌باشند و بسیاری از گونه‌ها در معرض خطر انقراض می‌باشند. برای ردیابی خاویار و محصولات تاسماهیان، ژن‌های DNA موجود در mtDNA به جهت جهش بالاتر برای شناسایی و ردیابی گونه‌ها استفاده می‌شوند [2].

اولین بار بریستن و همکاران [3] با استفاده از توالی یابی ژن‌های میتوکندری و همین‌طور لودویج و همکاران [4] از یکی از ژن‌های میتوکندری (سیتوکروم اکسید از *b*) برای ردیابی و تشخیص ماهیان خاویاری استفاده کردند که برای تایید مطالعات آن‌ها نیاز به تعداد بالایی از واکنش زنجیره پلی مراز یا هضم آنزیمی بود. در سال ۲۰۰۸ تفاوت گونه‌های تاسماهیان توسط میوگ و همکاران [5] با استفاده از چند شکلی ژن D-loop در تاسماهیان مختلف گزارش شد که قابل ردیابی روی ژل آگارز بودند. پاپالاردو و همکاران [6] با استفاده از خاویار تاسماهیان و روش PCR-RFLP اقدام به شناسایی برخی از گونه‌های تاسماهیان کردند. جمشیدی و حسن زاده صابر [7] با استفاده از توالی یابی ناحیه بارکدینگ *COI* و سیتوکروم *b* در عصاره و کرم خاویار DNA تاسماهیان را شناسایی و گزارش کردند که آنالیز آن‌ها قادر به شناسایی گونه تاسماهیان در محصولات تهیه شده از آن‌ها می‌باشد.

هدف این تحقیق شناسایی بافت تخمک فرآوری شده تاسماهیان که همان خاویار به آن اطلاق می‌شود، با استفاده از روش‌های مرسوم بارکدینگ مولکولی در سطح ژنوم میتوکندری که نشانگر گونه باشد، می‌باشد که در صورت مثبت بودن، راه دستیابی به اطلاعات گونه جانور با در اختیار گرفتن تنها چند عدد خاویار سهل و آسان خواهد بود.

---

[1] Good Manufacturing Practice (GMP)
[2] Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج DNA از خاویار و بافت باله تاسماهیان

به‌منظور استخراج DNA، سه عدد خاویار از ۵ گونه خالص از تاسماهیان دریای کاسپین شامل تاسماهی روسی، تاسماهی ایرانی، شیپ و ازون برون، استرلیاد و تاسماهی سیبری خالص با استفاده از نیتروژن مایع به‌صورت پودر در آمده و استخراج DNA با استفاده از کیت DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) با اندکی تغییرات انجام شد. در مرحله انتهایی استخراج DNA، نمونه‌ها در آب مقطر استریل دوبار تقطیر حل شدند. برای نمونه‌های موجود در بازار (۲۱ عدد) نیز پس از باز کردن درب محصول، تعداد ۳ خاویار از هر محصول مورد آزمون قرار گرفت. هم‌چنین، روش استفاده از کیت کیاژن برای استخراج DNA از بافت باله پنج گونه از تاسماهیان دریای کاسپین و دو گونه استرلیاد و تاسماهی سیبری نیز مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از خاویار و باله تاسماهیان

جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری (استفاده از نانودراپ ND1000) 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 یا TE، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر برحسب نانوگرم بر میکروگرم اندازه‌گیری گردید. بررسی کیفیت DNA استخراج شده بافت باله و خاویار تاسماهیان روی ژل آگارز ۱% موردبررسی قرار گرفت.

۲-۳- انتخاب آغازگر برای تشخیص خاویار تاسماهیان

در تحقیق حاضر از ژن بارکدینگ ناحیه *COI* ماهیان خاویاری قطعه‌ای کوتاه تکثیر شد که آغازگرهای آن توسط وارانیاک و همکاران [8] طراحی شده است (**جدول ۱**). این آغازگرها تنها در ماهیان خاویاری قطعه مذکور را تکثیر می‌کنند و برای گونه‌های دیگر مثل سخت‌پوستان و ماهیان استخوانی دیگر عملکردی ندارد. بر اساس تفاوت‌های مولکولی بین DNA میتوکندری ناحیه D-loop گونه‌های تاسماهیان از خاویار تمام تاسماهیان موجود در دریای کاسپین و خاویار تاسماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) و تاسماهی سیبری (*A. baerii*) برای شناسایی گونه‌ای استفاده شد و پروفایل ایجاد شده با پروفایل مولکولی ایجاد شده بافت باله همان گونه‌ها روی ژل آگارز بررسی شد که می‌بایست قطعه تکثیر شده گونه‌های مختلف در محل‌های متفاوتی نسبت به هم قرار بگیرند.

آغازگر اختصاصی تاسماهیان با نام *ACoI1* برای تکثیر ژن *CoI* از تحقیقات وارانیاک و همکاران [8] انتخاب شد. این جفت آغازگر ناهماهنگی بسیار کمی با دیگر گونه‌های Acipenseridae دارند و قادر به تکثیر DNA گونه‌های دیگر ماهیان خاویاری هستند. پنج گونه از تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری برای تکثیر توسط پرایمرهای *CoI* مورد آزمون قرار گرفتند. کنترل منفی شامل DNA ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای این قطعه دقیقا به مانند مطالعه وارانیاک و همکاران [8] شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه قرار داده شد و در انتها به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۲-۴- انتخاب آغازگر برای تشخیص گونه خاویار تاسماهیان

بر اساس تحقیقات میوگ و همکاران [5]، آغازگرهایی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند که بتوانند اندازه قطعه متفاوتی را تکثیر کنند (**جدول ۱**). به‌گونه‌ای که آغازگر راست (Reverse) به‌طور مشترک برای تاسماهیان دریای کاسپین، از منطقه کوچکی که در غالب تاسماهیان حفاظت شده است، انتخاب شد (پرایمر AHR) ولی آغازگرهای چپ (Forward) اختصاصی (Specific) برای هر گونه طراحی شد که فقط قادر است به شکل ویژه، DNA یک گونه خاص تاسماهی را تکثیر کند.

برای هر جفت آغازگر ویژه یک گونه از تاسماهیان دریای کاسپین کار مناسب‌سازی درجه حرارت با استفاده از روش PCR gradient در دستگاه Eppendrof ساخت کشور آلمان صورت پذیرفت و در همان دمای مناسب تمامی نمونه‌ها تکثیر شده و روی ژل آگارز ۲% بررسی شد. برنامه حرارتی به‌دست‌آمده برای این آغازگرها بر اساس تحقیقات میوگ و همکاران [5] با اندکی تغییرات انجام شد.

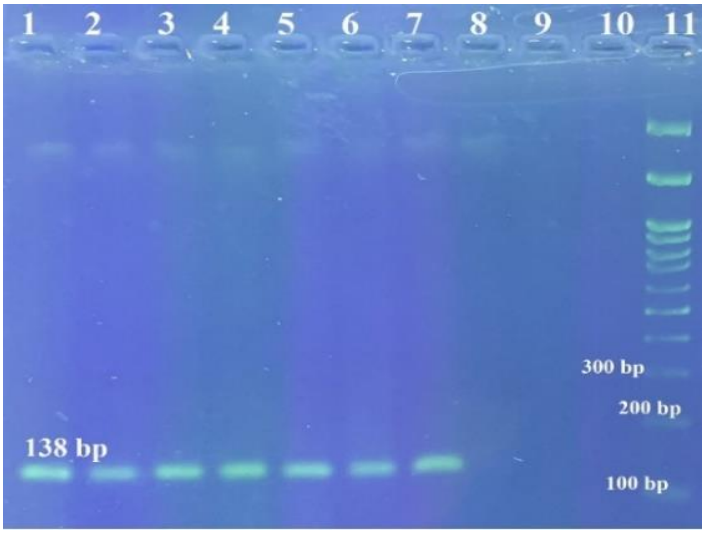
جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص خاویار تاسماهیان.

Table 1- Nucleotide sequence related to the primers used in the detection of sturgeons' caviar.

Primer	Nucleotide Sequence
ACoI1F	CCATCATAATTG GCG GAT TCGG
ACoI1R	CCC CAGAGGAGG CTA AAAGG
Waraniak et al. [8]	
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG
NudF	TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC
SteF	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG
AGF	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA
ABRAM	TGTCTGTCTAGAACATATG
AHR	TATACACCATTATCTCTATGT
Mugue et al. [5]	

۳- نتایج

بر اساس نتایج کمی غلظت DNA با استفاده از نانو دراپ همگی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر مناسب در دامنه ۲-۱/۸ بودند و غلظت DNA استخراج شده بین ۱۵۰ تا ۶۵۰ نانوگرم در میکرو لیتر بود و DNA از کیفیت مناسبی روی ژل برخوردار بود. در این تحقیق، تکثیر قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی مختص تاسماهیان با آغازگر اختصاصی این خانواده روی ژل آگارز نشان داده شده است (**شکل‌های ۱** و **۲**). این باند برای تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین و تاسماهی سیبری و استرلیاد باند یک اندازه‌ای را تکثیر کردند. این آغازگر اختصاصی باندی را برای دیگر خانواده‌های بی‌مهرگان آبزی و ماهیان استخوانی تکثیر نمی‌کند [8]. در این تحقیق باندی برای ماهی قزل‌آلا و ماهی کپور به عنوان کنترل منفی تکثیر نشد.

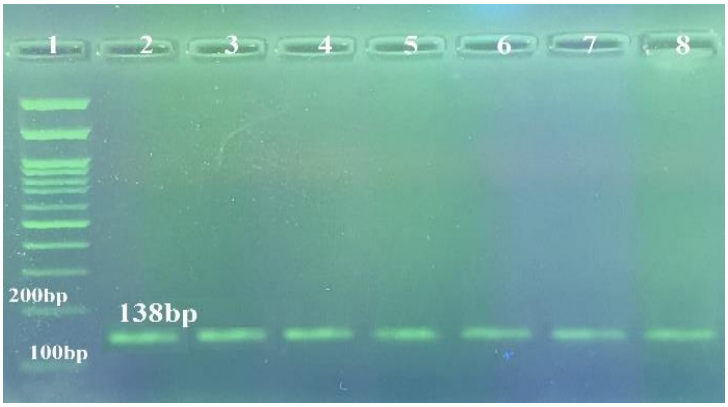


شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵% از باند تکثیر شده ۱۳۸ نوکلئوتیدی از تکثیر نمونه DNA باله تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری؛ ستون ۱: فیل‌ماهی، ستون۲: تاسماهی شیپ، ستون ۳:

ازون‌برون، ستون ۴: تاسماهی سیبری، ستون ۵: استرلیاد، ستون ۶ و ستون ۷: تاسماهی روسی و ایرانی، ستون ۸: قزل‌آلا، ستون ۹: کپور، ستون ۱۰: DNA انسانی، ستون ۱۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون.

Figure 1- Agarose gel electrophoresis of 2.5% of the amplified band of 138 nucleotides from the amplification of fin DNA samples of all species of Caspian Sea Sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon; Column 1: Beluga, Column 2: Ship sturgeon, Column 3: Sevruga, Column 4: Siberian sturgeon, Column 5: Sterlet, Columns 6 and 7: Russian and Persian sturgeon, Column 8: Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Column 9: Carp (*Cyprinus carpio*), Column 10: Human DNA (*Homo sapians*), Column 11: 100 bp ladder from Sina Clone Corporation.

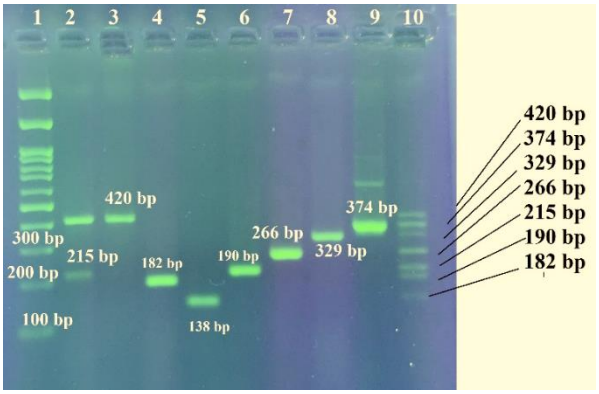
همین‌طور آغازگرهای مربوط به تشخیص گونه‌ای تاسماهیان بر اساس پنل پیشنهادی میوگ و همکاران [5]، باند ۳۷۴ نوکلئوتیدی در فیل‌ماهی، باند



۳۲۹ نوکلئوتیدی در تاسماهی شیپ، باند ۲۶۶ نوکلئوتیدی در ازون‌برون، باند ۱۳۸ و ۱۸۲ نوکلئوتیدی در تاسماهی سیبری، باند ۱۹۰ نوکلئوتیدی در استرلیاد، باند ۴۲۰ نوکلئوتیدی در تاسماهی روسی و پروفایل ۴۲۰ نوکلئوتیدی و ۲۱۵ نوکلئوتیدی در تاسماهی روسی-شبه سیبری تکثیر کردند (**شکل‌های ۳** و ٤) که نشان‌دهنده گونه تاسماهی می‌باشد که خاویار از آن گرفته شده است.

شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵% از باند تکثیر شده ۱۳۸ نوکلئوتیدی از تکثیر نمونه DNA خاویار تمامی گونه‌های تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری؛ ستون۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سیناکلون، ستون۲: تاسماهی شیپ، ستون ۳: ازون برون، ستون ۴: تاسماهی سیبری، ستون ۵: استرلیاد، ستون‌های ۶ و ۷: تاسماهی روسی و ایرانی، ستون ۸: فیل‌ماهی.

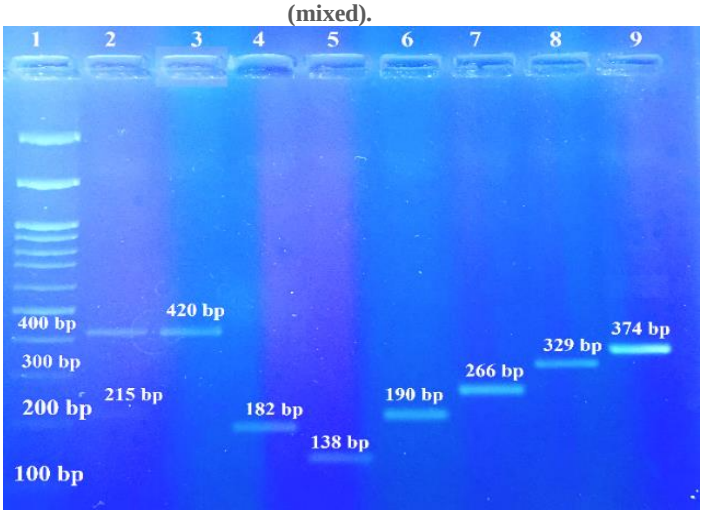
Figure 2- Agarose gel electrophoresis of 2.5% of the amplified band of 138 nucleotides from the amplification of caviar DNA samples of all species of Caspian Sea sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon; Column 1: Beluga, Column 2: Ship sturgeon, Column 3: Sevruga, Column 4: Siberian sturgeon, Column 5: Sterlet, Columns 6 and 7: Russian and Persian sturgeon, Column 8: 100 bp ladder related to Sina clone corporation.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز ۲% برای نشان دادن باند اختصاصی گونه‌های مختلف تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری حاصل از تکثیر آغازگرهای اختصاصی هرگونه به روی DNA استخراج شده بافت باله؛ ستون۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون، ستون ۲: تاسماهی روسی میتو تایپ شبه سیبری قطعات ۴۲۰ و ۲۱۵ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون۳: تاسماهی روسی قطعه ۴۲۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۴: تاسماهی سیبری قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF,

AHR)، ستون۵: تاسماهی سیبری قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, ABRAM)، ستون ۶: استرلیاد قطعه ۱۹۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای RutF, AHR)، ستون ۷: ازون برون قطعه ۲۶۶ نوکلئوتیدی (آغازگرهای SteF, AHR)، ستون ۸: تاسماهی شیپ (آغازگرهای NudF, AHR)، ستون ۹: فیل‌ماهی، ستون ۱۰: نشانگر وزن مولکولی محصولات PCR ماهیان خاویاری (مخلوط شده باهم).

Figure 3- 2% agarose gel electrophoresis to show the specific band of different species of Caspian Sea sturgeons, Sterlet and Siberian sturgeon resulting from the amplification of specific primers of each species on the DNA extracted from the fin tissue. Column 1: 100 bp ladder related to Sina clone cooperation; Column 2: Russian sturgeon pseudo-Siberian mitotype fragments 420 and 215 nucleotides (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), column 3: Russian sturgeon 420 nucleotide fragment (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), column 4: Siberian sturgeon fragment 182 Nucleotide (ABF, AHR primers), column 5: Siberian sturgeon, 138 nucleotide fragment (ABRAM, ABRAM primers), column 6: Sterlet, 190 nucleotide fragment (RutF, AHR primers), column 7: Sevruga, 266 nucleotide fragment (SteF, AHR primers), column 8: Ship sturgeon (NudF, AHR primers), column 9: Beluga, column 10: molecular weight indicator of sturgeon PCR products (mixed).



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز ۲% برای نشان دادن باند اختصاصی گونه‌های مختلف تاسماهیان دریای کاسپین، استرلیاد و تاسماهی سیبری حاصل از تکثیر آغازگرهای اختصاصی هرگونه به روی DNA استخراج شده خاویار؛ ستون ۱: 100 bp ladder مربوط به شرکت سینا کلون، ستون ۲: تاسماهی روسی میتو تایپ شبه سیبری قطعات ۴۲۰ و ۲۱۵ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون۳: تاسماهی روسی قطعه ۴۲۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای AGF, ABF, ABRAM, AHA)، ستون ۴: تاسماهی سیبری قطعه ۱۸۲ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, AHR)، ستون ۵: تاسماهی سیبری قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی (آغازگرهای ABF, ABRAM)، ستون ۶: استرلیاد قطعه ۱۹۰ نوکلئوتیدی (آغازگرهای RutF, AHR)، ستون ۷: ازون برون قطعه ۲۶۶ نوکلئوتیدی (آغازگرهای SteF, AHR)، ستون ۸: تاسماهی شیپ (آغازگرهای NudF, AHR)، ستون ۹: فیل‌ماهی.

Figure 4- 2% agarose gel electrophoresis to show the specific band of different species of Caspian Sea, Sterlet and Siberian sturgeon resulting from the amplification of the specific primers of each species on the extracted caviar DNA; Column 1: 100 bp ladder related to Sina clone corporation, Column 2: Russian sturgeon pseudo-Siberian mitotype fragments 420 and 215 nucleotides (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), Column 3: Russian sturgeon 420 nucleotide fragment (primers AGF, ABF, ABRAM, AHA), Column 4: Siberian sturgeon fragment 182 Nucleotide (ABF, AHR primers), Column 5: Siberian sturgeon, 138 nucleotide fragment (ABRAM, ABRAM primers), Column 6: Sterlet, 190 nucleotide fragment (RutF, AHR primers), Column 7: Sevruga, 266 nucleotide fragment (SteF, AHR primers), Column 8: Ship sturgeon (primers NudF, AHR), Column 9: Beluga.

۴- بحث

هدف از این تحقیق، بررسی نشانگر تشخیص خاویار تاسماهیان (نشانگر عمومی) و بررسی نشانگر تشخیص گونه خاویار (نشانگر تشخیص گونه) بود و به همین جهت از نمونه‌های خالص بافت باله تاسماهیان و خاویار آن‌ها استفاده شد و هیچ نمونه هیبریدی استفاده نشد. قطعه کوتاهی که آغازگر ژن میتوکندریایی *COI* در این تحقیق، تکثیر کرده است، باند اختصاصی تاسماهیان می‌باشد که اولین بار توسط وارانیاک و همکاران [8] برای تشخیص و جداسازی محتویات غذای مصرف شده شکارچیان لارو تاسماهی دریاچه‌ای (*A. fulvescens*) در ایالت میشیگان امریکا طراحی و

مورد استفاده قرار دادند. در تحقیق حاضر نیز، برای کنترل منفی‌های استفاده شده (DNA قزل‌آلا و ماهی کپور معمولی) هیچ باندی تکثیر نشد، ولی برای تمامی تاسماهیان دریای کاسپین و تاسماهی سیبری و استرلیاد باند مورد نظر، تکثیر شد. این آغازگرها به همراه DNA استخراج شده از تنها سه عدد خاویار توانست قطعه‌ای مختص به تاسماهیان را تکثیر کند (قطعه ۱۳۸ نوکلئوتیدی) که نشان‌دهنده خاویار تاسماهیان می‌باشد که به‌عنوان نشانگر مولکولی عمومی برای ردیابی و تشخیص خاویار تاسماهیان می‌تواند مورد استفاده واقع شود. بارکدینگ DNA به‌طور گسترده‌ای برای تعیین گونه‌ها استفاده می‌شود، زیرا واگرایی توالی معمولا در بین افراد یک گونه خاص بسیار کمتر از گونه‌های نزدیک به هم است [12]–[9]. سیستم بارکدینگ مولکولی به‌صورت روش مستند برای ارزیابی خاویار به‌منظور صحه‌گذاری و ارزش‌گذاری محصولات خاویار و گوشت تاسماهیان توسط محققین بسیاری برای سال‌های زیادی می‌باشد که مورد استفاده واقع شده است [13]. دلیما و همکاران [14] با استفاده از روش بارکدینگ مولکولی، حدود ۲۵ گونه را که متعلق به ۱۱ خانواده و راسته بودند، با استفاده از تخمک‌های ریخته شده ماهی‌ها در رودخانه پاراناپانما شناسایی کردند. تحقیقات آن‌ها نیز نشان داد که برخی از گونه‌های در معرض خطر انقراض در این رودخانه‌ها تخم‌ریزی می‌کنند. هان و همکاران [15] با استفاده از بارکدینگ مولکولی ژن سیتوکروم اکسیدار I اقدام به ردیابی برچسب‌گذاری اشتباه[1] در محصولات غذایی حاوی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در فروشگاه‌های آنلاین و سوشی بارهای چین انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که این میزان تفاوت در برچسب‌گذاری اشتباه ممکن است تا به میزان ۵۰% هم برسد. دسال و بریستن [16] در سال ۱۹۹۶ با تکنیک بررسی ژن‌های میتوکندری توانستند خاویار سیاه گونه‌های ماهیان خاویاری را از هم تشخیص دهند. محققی به نام لودویج و همکاران [4] با استفاده از بررسی ژن سیتوکروم *b* و تکنیک برش آنزیمی، با استفاده از ۷ آنزیم برشی موفق به شناسایی هفده گونه از راسته تاسماهی شکلان شدند؛ اما شناسایی گونه‌های جنس *Scaphirhynchus* و همین‌طور تفاوت دو گونه تاسماهی ایرانی و روسی با استفاده از روش آن‌ها امکان‌پذیر نشد. رضوانی گیلکلایی [17] با استفاده از تکنیک SCAR[2] موفق شدند خاویار گونه تاسماهی شیپ، آسترا (خاویار تاسماهی روسی و ایرانی) را از خاویار بقیه گونه‌های تاسماهیان ایران تشخیص دهند. محققی به نام فوت-بیات [18] توانست با بررسی دو لوکوس *Afu-39* و *Afu-68* میکروستلایت که هر کدام دارای الل‌های متفاوتی در گونه‌های ماهیان خاویاری بودند، خاویار گونه‌های متفاوت تاسماهیان را از هم تشخیص دهد. غدیرنژاد و همکاران [19] با استفاده از ناحیه بارکدینگ *COI* تعداد ۳ گونه از ۵ گونه تاسماهیان دریای کاسپین را به‌درستی از هم تفکیک کردند؛ اما تشخیص نهایی با بررسی توالی‌یابی امکان‌پذیر بود که تاسماهیان دریای کاسپین از این طریق شناسایی شدند ولی تشخیص دو گونه تاسماهی روسی و ایرانی با توالی‌یابی از هم امکان‌پذیر نبود. هم‌چنین تعدادی از نمونه‌های تاسماهی ایرانی هیچ باندی را تکثیر نکردند که این نتایج عدم تکثیر باند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تاسماهی روسی، در مطالعه میوگ و همکاران [5] هم دیده شده است. در پنل تشخیص گونه تاسماهیان با استفاده از تکثیر قطعه‌ای از ژن D-loop که در تحقیق حاضر نیز به کار برده شده، هرگونه از تاسماهیان اندازه قطعه‌ای مختص به خود روی ژل آگارز ایجاد می‌کنند که به‌راحتی در عرض چند ساعت قابل انجام می‌باشد و نیاز به توالی‌یابی ندارد. کلنگی میاندره و همکاران [20] با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم *b* اقدام به شناسایی خاویار سه گونه فیل‌ماهی، شیپ و ازون‌برون کردند. پوپا و همکاران [21] با استفاده از تکنیک qPCR توانستند محصولات بازاری ماهیان خاویاری را با مقدار بسیار جزیی DNA در محصول مورد شناسایی قرار دهند. تحقیقی توسط پاپالاردو و همکاران [6]، برای شناسایی گونه تاسماهیان از روی آنالیز مولکولی خاویار انجام شد و با استفاده از هضم آنزیمی قطعه تکثیرشده در روش زنجیره پلی مراز با آنزیم‌های برشی متفاوت، تنها یک هضم آنزیمی، الگوی متفاوتی برای تشخیص گونه‌های تاسماهیان و همین‌طور خاویار تقلبی را نشان دادند که درنتیجه ردیابی خاویار اصل از تقلبی در مدت‌زمان هفت ساعت قابل انجام می‌باشد. ژانگ و همکاران [13] با آنالیز مولکولی محصولات خاویار نشان دادند که همه محصولات به‌عنوان گونه ماهیان خاویاری تایید شده است. بااین‌حال، ۴۲/۵% از محصولات به‌طور کامل با اطلاعات برچسب مطابقت نداشتند. نتایج مطالعه آن‌ها شکاف بین حقیقت اعلام شده روی محصولات و لزوم استفاده از برچسب CITES مبنی بر اطمینان از تجارت عادلانه و پایداری محصولات را تایید کرد. دودو و همکاران [22] نشانگرهای به کار برده شده میتوکندری را برای شناسایی فیل‌ماهی و ماهی شیپ بر اساس پنل تاسماهیان و بر اساس تحقیق میوگ و همکاران [5] تایید کردند. در این تحقیق نیز تشخیص گونه تاسماهی با استفاده از به کاری گیری پنل ذکر شده و اندازه باندهای متفاوت ایجاد شده قابل ارزیابی بود که این ردیابی و تشخیص گونه هم برای نمونه‌های بافت تاسماهیان و هم نمونه خاویار آن‌ها قابل انجام بود. این روش که مبتنی بر بررسی محتوی ژنوم میتوکندریایی می‌باشد، در جهت تشخیص سریع و کارآمد ارزش بالایی دارد؛ اما می‌بایست توجه شود که اساس این روش بر ارزیابی ژنوم مادری می‌باشد و امروزه به جهت هیبریداسیون‌های هدف‌دار برخی گونه‌ها برای پرورش گونه‌های زود بازده و تولید گوشت، امکان ردیابی نسل هیبرید زایایی که تولید تخمک می‌کنند و تشخیص خاویار هیبرید تنها از طریق بررسی ژنوم

[1] Mislabeling
[2] Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

مادری غیرممکن می‌باشد. برای ردیابی محصولات خاویار هم داخل و هم بحث صادرات محصولات خاویار، مثل ردیابی تقلب (Fraud detection) و جلوگیری از برحسب زدن اشتباه (Mislabeling) نیاز به سیستم جامع برای حفظ کیفیت محصول و جلوگیری از صید غیرقانونی و تقلب می‌باشد و در ردیابی اطلاعات هر محصول، سیستم بارکدها خصوصا بارکدهای مولکولی یکی از ابزارهای قدرتمند می‌باشد. علی‌رغم این‌که برچسب کنوانسیون CITES برای تجارت خاویار ضروری نیست و کشورهایی مثل چین، روسیه و ژاپن قوانین مختص به خود برای تجارت خاویار دارند؛ اما ضروری می‌باشد برای نزدیک شدن به استانداردهای کشورهای اروپایی تجارت خاویار بر اساس قوانین سایتس، اقدام به شناسایی و بارکدینگ محصولات خاویار با ابزارهای قدرتمندی مثل بارکدینگ مولکولی و ردیابی نشانگرها شود.

۵- نتیجه‌گیری

این روش شناسایی مولکولی که برای پاسخ به وجود DNA تاسماهیان می‌باشد، بررسی قابلیت تفکیکی بر اساس تشکیل باند روی ژل دارد و مسلما می‌تواند برای تشخیص گونه خاویار تمامی تاسماهیان دریای کاسپین بر اساس تفاوت اندازه ایجاد شده روی ژل آگارز مورد استفاده واقع شود که از نظر وقت و هزینه، مقرون‌به‌صرفه می‌باشد و در تحقیقات تکمیلی تشخیص گونه و هیبریدها می‌تواند به‌عنوان ابزار کمکی موثر واقع شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود از انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری به جهت فراهم‌آوری امکانات انجام این تحقیق اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

بدین‌وسیله اعلام می‌دارد که هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

[1] Moradi, Y. (2007). *Caviar control and processing*. Agricultural Education and Extension Institute. (**In Persian**). https://www.gisoom.com/book/1571307/

[2] 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. DOI:10.1016/j.ympev.2005.08.007

[3] Birstein, V. J., Hanner, R., & Desalle, R. (1997). Phylogeny of the acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In *Developments in environmental biology of fishes* (pp. 127–155). Kluwer Academic Publishers.

[4] Ludwig, A., Debus, L., & Jenneckens, I. (2002). A molecular approach to control the international trade in black caviar. *International review of hydrobiology*, *87*(5–6), 661–674. DOI:10.1002/1522-2632(200211)87:5/6<661::AID-IROH661>3.0.CO;2-S

[5] 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.

[6] Pappalardo, A. M., Petraccioli, A., Capriglione, T., & Ferrito, V. (2019). From fish eggs to fish name: Caviar species discrimination by Coibar-RFLP, an efficient molecular approach to detect fraud in the caviar trade. *Molecules*, *24*(13), 2468. DOI:10.3390/molecules24132468

[7] Jamshidi, S., & Hasanzadeh Saber, M. (2021). Investigating verification of sturgeon caviar in cosmetic products using barcoding method of mitochondrial genes. *Journal of aquatic physiology and biotechnology*, *9*(2), 1-20. (**In Persian**). https://japb.guilan.ac.ir/article_5020_en.html

[8] 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. DOI:10.1007/s12686-017-0790-5

[9] 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. DOI:10.1371/journal.pbio.0020312

[10] Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society b: biological sciences*, *270*(1512), 313–321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218

[11] Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, *360*(1462), 1847–1857. DOI:10.1098/rstb.2005.1716

[12] Costa, F. O., DeWaard, J. R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Hajibabaei, M., & Hebert, P. D. N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: The case of the Crustacea. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, *64*(2), 272–295. DOI:10.1139/F07-008

[13] 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. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108370

[14] De Lima, M. C. C., Lima, S. C., Savada, C. S., Suzuki, K. M., Orsi, M. L., & de Almeida, F. S. (2020). Use of DNA barcode in the identification of fish eggs in tributaries of the paranapanema river basin. *Genetics and molecular biology*, *43*(3), 1–9. DOI:10.1590/1678-4685-gmb-2019-0352

[15] Han, C., Dong, S., Li, L., Gao, Q., & Zhou, Y. (2021). DNA barcoding and mini-DNA barcoding reveal mislabeling of salmonids in different distribution channels in the Qingdao area. *Journal of ocean university of China*, *20*(6), 1537–1544. DOI:10.1007/s11802-021-4777-1

[16] DeSalle, R., & Birstein, V. J. (1996). PCR identification of black caviar. *Nature*, *381*(6579), 197–198. DOI:10.1038/381197a0

[17] Rezaei Gilkolaei, S. (2002). DNA PCR amplification for species diagnosis of caviar from Caspian Sea sturgeon. *Journal of agricultural science and technology*, *4*, 51–61.

[18] Fopp-Bayat, D. (2007). Genetic identification of black caviar based on microsatellite DNA analysis. *Environmental biotechnology*, *3*(2), 57–60.

[19] Ghadirnejad, H. (2009). Barcoding of five sturgeon species in Iran. *Journal of molecular genetics l*, *2*(4), 29–34.

[20] Kolangi Miandare, H., Farahmand, H., Aghilinejhad, S. M., & Akbarzadeh, A. (2012). Introdution of Cyt b gene as useful gene for identification of Caspian Sturgeon caviar. *Utilization and cultivation of aquatics*, *1*, 51-62. (**In Persian**). https://japu.gau.ac.ir/article_1170.html?lang=en

[21] Popa, G. O., Dudu, A., Bănăduc, D., Curtean-Bănăduc, A., Barbălată, T., Burcea, A., … & Costache, M. (2017). Use of DNA barcoding in the assignment of commercially valuable fish species from Romania. *Aquatic living resources*, *30*, 20. DOI:10.1051/alr/2017018

[22] 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. DOI:10.3390/foods11071007