



بررسی پلی مورفیسم ناحیه کنترل mtDNA تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* در رودخانه سفیدرود و جنوب شرقی دریای خزر

فریبا عطائی

کارشناسی ارشد بیوسیسستماتیک جانوری، پژوهشگر مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

محمد پور کاظمی

دکترای ژنتیک ماهی، دانشیار انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت

بهرام حسن زاده کیابی

دکترای آبیان و حیات وحش، استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

مسعود شیدایی

دکترای سیتوژنتیک گیاهی، استاد دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

Analysis of mtDNA D-Loop Region Polymorphism *Acipenser persicus* in Sefidroud River and Southeast Region of Caspian Sea

Fariba Ataei, M.Sc.

Biosystematic Zoologist, National Research Center for Genetic Eng. and Biotech.

Mohammad Pourkazemi, Ph.D.

Associate Professor, International Sturgeon Research Institute of Rasht

Bahram Hassanzadeh Kiabi, Ph.D.

Assistant Professor, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University

Masoud Sheidai, Ph.D.

Professor, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University

Abstract

The genetic diversity of *Acipenser persicus* in Sefidroud and the Southeast of Caspian sea region was investigated using PCR-RFLP. The mtDNA D-Loop regions were amplified using PCR techniques followed by RFLP analysis. Initially 9 enzymes were investigated then polymorphic enzymes selected and, 30 specimens digested with selected enzymes. Eight composite haplotypes were detected among 30 specimens, two haplotypes were common and six haplotypes were rare. Heteroplasmy was observed in the all of specimens. The average nucleotide and haplotype diversity were estimated to be 0/0505 and 0/781±0/0073. Statistical analysis and simulation by Monte carlo with 1000 times replication indicated that significant differences were not observed in the distribution of haplotypes between the Sefidroud and Southeast Caspian areas.

Keywords: mtDNA, PCR-RFLP, D-Loop, *Acipenser persicus*.

چکیده

روش تجزیه و تحلیل RFLP روی محصولات PCR مولکول mtDNA در مطالعه تنوع در سه جمعیت گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به کار گرفته شد. ناحیه کنترل mtDNA با استفاده از PCR تکثیر شد و متعاقب آن نمونه‌های DNA با آنزیم‌های برشی برای تجزیه و تحلیل RFLP هضم گردید. در ابتدا ۹ آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. سپس آنزیم‌های پلی مورفیک انتخاب شد. از میان ۳۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۸ هاپلوتیپ تعیین گردید که از بین هاپلوتیپ‌های شناخته شده تعداد ۲ هاپلوتیپ بیشترین فراوانی را میان سایرین داشتند و ۶ هاپلوتیپ فقط یک بار در دو منطقه سفیدرود و جنوب شرقی دریای خزر ظاهر گردیدند. هتروپلازمی در تمامی نمونه‌ها مشاهده شد. تجزیه و تحلیل آماری هاپلوتیپ‌ها، متوسط تنوع هاپلوتیپی ۰/۰۷۸۱ ± ۰/۰۰۷۳ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۱ ± ۰/۵۰۵ را در بین افراد نشان داد. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که توزیع هاپلوتیپ‌ها بین دو منطقه دارای اختلاف معنی‌داری نیست (P < ۰/۰۵ و $\chi^2 = ۴/۳۶$).

کلیدواژه‌ها: تاسماهی ایرانی، mtDNA، PCR-RFLP، D-Loop.

صورت گرفته است، پدیده‌ای به نام هتروپلاسمی را در آن‌ها آشکار می‌سازد، هتروپلاسمی در واقع حضور بیش از یک نوع mtDNA در یک فرد است که هتروپلاسمی طول (تنوع در طول) رایج‌ترین نوع هتروپلاسمی می‌باشد. برای اولین بار، وقوع هتروپلاسمی طول در تاسماهی سفید (*Aci penseser trasmontanus*) گزارش شد. امروزه جمعیت تاسماهی‌های جهان کاهش یافته است و تمامی گونه‌های این گروه به‌عنوان گونه‌های در معرض خطر محسوب می‌شوند. از این رو، حفاظت و نگهداری تنوع زیستی و ذخایر ژنتیکی این ماهی‌ها از طریق مدیریت تنوع زیستی و ذخایر بسیار مهم است. زیرا تاسماهی‌های دریای خزر بیشترین درصد تاسماهی‌های کل دنیا را تشکیل می‌دهند. در مطالعه حاضر ناحیه کنترل mtDNA تاسماهی ایرانی (*Aci penseser persicus*) به منظور ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت و هدف از انجام آن شناسایی جمعیت‌های موجود و طراحی نشانگر مولکولی به منظور تمایز جمعیت تاسماهی ایرانی (*Aci penseser persicus*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از ماهیان خاویاری صیدشده جهت استحصال خاویار، ۳۰ نمونه تاسماهی ایرانی (*Aci penseser persicus*) از رودخانه سفیدرود و مناطق جنوب شرقی دریای خزر نمونه‌برداری شد. نمونه‌گیری از انتهای باله دم و بافت ماهیچه‌ای تاسماهی ایرانی انجام و در الکل اتیلیک ۹۵ درصد و یا در ازت مایع فیکس شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های منجمدشده در ازت مایع، جهت نگهداری طولانی مدت به فریزر -86°C انتقال یافتند. سپس DNA ژنومی آن‌ها طبق روش فنل کلروفرم استخراج گردید (Pourkazemi, 1996). ناحیه کنترل mtDNA با استفاده از جفت آغازگر L-tRNA و H-tRNA تکثیر شد (Pourkazemi, 1996). سپس DNA تکثیرشده بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۶٪ الکتروفورز و توسط آنزیم‌های BclI, AvaII, MboI, AluI, HinfI, ThaI, EcorI, HaeIII, RsaI, برش داده شد. فقط سه تا از آن‌ها AvaII, MboI, پلی‌مورفیسم را نشان دادند که انتخاب و تمام نمونه‌ها

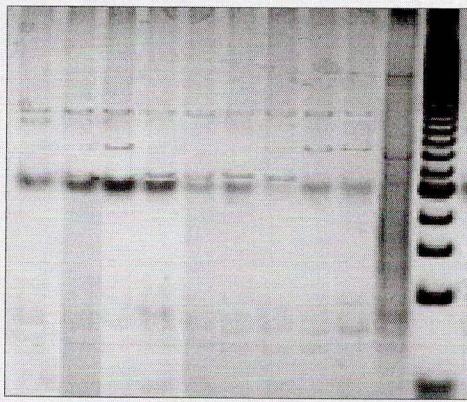
امروزه برای حل مسائل سیستماتیکی و جمعیتی، از تکنیک‌هایی استفاده می‌شود که مستقیم یا غیرمستقیم تنوع را در سطح اسیدنوکلئیک مشخص می‌کنند. بررسی‌های mtDNA-RFLP نشان می‌دهد که DNA میتوکندری بسیار متنوع است و برای تفکیک ژنتیکی جمعیت‌ها، تکامل و مطالعات سیستماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. mtDNA (Brown, 1992) محتوی نشانگرهای ژنتیکی است که دلایلی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از نظر تاریخی و الگوهای جدیدی از جریان ژن داخل و بین مناطق یا جمعیت‌ها مهیا می‌سازد (Avis, 1994). در مهره‌داران ژنوم میتوکندری ۱۶۰۰۰ جفت باز و حاوی ۳۷ ژن است. سازمان‌دهی ژنوم میتوکندری شدیداً حفاظت شده است. ۱۳ ژن رمزکننده پروتئین، ۲۲ ژن رمزکننده tRNA و ۲ ژن رمزکننده rRNA و یک ناحیه غیر رمزکننده (D-Loop) یا ناحیه کنترل را تشکیل می‌دهد، که بین ژن‌های tRNA-pro, tRNA-phe, قرار دارد (Anderson, 1981). رشته اطلاعات اصلی رمزگذاری، زنجیره سنگین می‌باشد. مبدا نسخه‌برداری برای رشته سنگین و تکثیر mtDNA ناحیه کنترل نامیده می‌شود که متغیرترین بخش مولکول mtDNA بوده و برای تعیین اختلافات نوکلئوتیدی داخل گونه‌ای بسیار مناسب است. ناحیه کنترل mtDNA مهره‌داران پروتئینی رمز نمی‌کند و فقط واجد توالی‌های محدود خیلی کوتاهی است که در میان تاکسون‌ها حفاظت می‌شود، اساساً در ناحیه کنترل، جهش در طول و جایگاه نوکلئوتیدی رخ می‌دهد (Harrison, 1989). توالی‌های بخشی از ناحیه کنترل در مطالعات فیلوژنتیک جمعیت‌های *Cichlidfish* و *Dipodomys panaminitinus* و ماهیان خاویاری حوزه خزر استفاده شده است. در مطالعه ماهیان خاویاری حوزه خزر ناحیه کنترل mtDNA گونه تاسماهی روسی (*Aci penseser gueldenstaedti*) کلون شده و به‌طور کامل تعیین توالی گردید (Pourkazemi, 1996). ناحیه کنترل این گونه از نظر اندازه بسیار متنوع بود که این تنوع مربوط به توالی ۸۲ جفت بازی است که بعد از انتهای ۳ ژن tRNA_{pro} تکرار می‌شود.

مطالعاتی که بر روی دامنه وسیعی از مهره‌داران و بی‌مهرگان

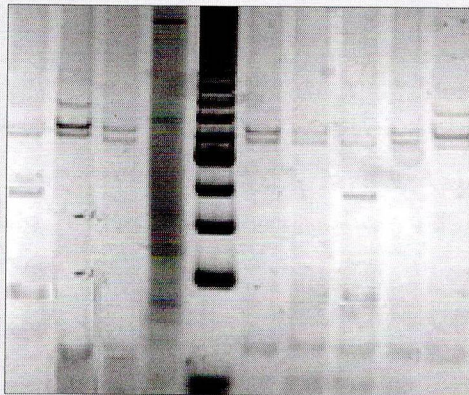
با آن ها هضم شدند (FOURKAZEMI, 1990). قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از ژل پلی آکرلامید ۶٪ تفکیک شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار کامپیوتری و شبیه‌سازی Monte Carlo استفاده گردید (Roff, 1989).

نتایج

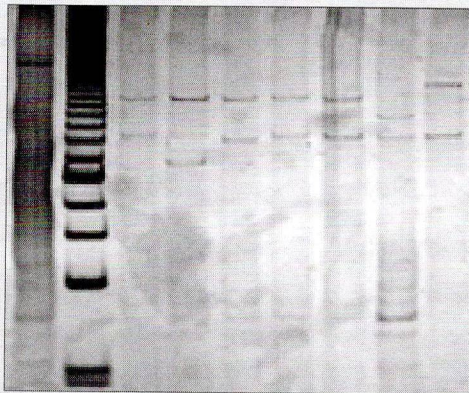
آغازگرهای مورد استفاده قطعاتی با طول‌های ۷۵۸، ۸۴۰، ۹۲۲ و ۱۰۰۴ جفت بازی را تکثیر کرده که در تمامی نمونه‌ها این تنوع طولی قابل مشاهده است. هر قطعه ۷۵۸ جفت بازی دو توالی تکراری تصادفی، ۸۲ جفت بازی، هر قطعه ۸۴۰ جفت بازی سه توالی تکراری تصادفی، هر قطعه ۹۲۲ جفت بازی چهار توالی تکراری تصادفی، هر قطعه ۱۰۰۴ جفت بازی پنج توالی تکراری تصادفی دارد. در مطالعه حاضر سه آنزیم برش‌دهنده MboI, AvaII, RsaI در هر دو جمعیت پلی‌مورفیسم را نشان می‌دهند (شکل‌های ۱ و ۲ و ۳). بعضی از آنزیم‌ها مثل Alu I الگوی منومورفیک را در تمامی افراد نشان می‌دهد. برای تجزیه و تحلیل باندها، ابتدا محصول هضم آنزیمی روی ژل آکرلامید ۶٪ الکتروفورز شد که باید مجموع اندازه باندهای حاصل با اندازه باند اولیه برابر شود که البته یافتن محصولات هضم آنزیمی یک باند روی ژل و به دست آوردن الگوی هضم آنزیمی تا حدود زیادی مشکل بوده و نیازمند دقت و حوصله بیشتر می‌باشد. نتایج به دست آمده از هضم آنزیمی محصول PCR نشان می‌دهد، آنزیم RsaI دارای یک جایگاه برش در داخل توالی تکراری تصادفی است که در برش‌های حاصل از آن دو قطعه ۸۲ جفت بازی بر روی ژل معلوم می‌شوند. آنزیم‌های MboI, AvaII واحد یک جایگاه برش آنزیمی در خارج از توالی تکراری تصادفی هستند که در آنزیم AvaII پلی‌مورفیسم با جایگزینی دو باند ۲۷۶ جفت بازی و ۷۲ جفت بازی به جای یک باند ۳۴۸ جفت بازی آشکار می‌شود و پلی‌مورفیسم در آنزیم MboI به صورت جایگزینی دو باند ۲۷۲ و ۲۲۴ جفت بازی به جای یک باند ۳۴۴ جفت بازی مشخص می‌گردد (جدول ۱). هر سه آنزیم دو نوع ژنوتیپ A و B را نشان دادند. اما آنزیم MboI یک ژنوتیپ F نیز دارد و ژنوتیپی است که برش نمی‌خورد (جدول ۲). در ۳۰ نمونه تاسماهی ایرانی از رودخانه



شکل ۱. الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم MboI به همراه مارکر مولکولی 100 bp



شکل ۲. الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم RsaI به همراه مارکر مولکولی 100 bp



شکل ۳. الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم AVaII به همراه مارکر مولکولی 100 bp

MboI			AvaII		RsaI	
A	B	F	A	B	A	B
496	344	840	492	492	368	304
344	274		348	276	304	193
	224			72	69	93
					65	86
					17	82
					17	82

جدول ۲. هاپلوتیپ‌های mtDNA تاسماهی ایرانی (حروف بیانگر قطعه برشی است که در هر فرد یافت می‌شود)

نام آنزیم	هاپلوتیپ‌ها							
	AAA	BAA	ABA	FAA	BBB	FBB	AAB	BBA
MboI	A	B	A	F	B	F	A	B
AvaII	A	A	B	A	B	B	A	B
RsaI	A	A	A	A	B	B	B	A

تعیین تنوع ژنتیکی، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و تشخیص خاویار به کار برده می‌شود. با استفاده از این اطلاعات می‌توان صادرات محصولات آبزی پروری از جمله گوشت و خاویار تاسماهی‌ها را با اطمینان کامل از نوع آن انجام داد. از مطالعات باروکر و همکاران (Buroker *et al*, 1990) در ماهیان خاویاری، (Wilkinson & Chapman, 1991) در خفاش، و اندرسون و همکاران (Anderson *et al*, 2000) در ماهی خاویاری و هریسون و رند (Harrison & Rand, 1986) در زنجره، چنین برمی‌آید که جهش از طریق همانندسازی توالی‌های واحد و اضافی و غیرجفتی در ناحیه توالی تکراری تصادفی به صورت تنوع طولی آشکار می‌شود. در مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل RFLP - PCR هتروپلاسمی در طول و جایگاه نوکلئوتیدی تاسماهی ایرانی را نشان داد که جهش وقوع این هتروپلاسمی را آشکار ساخته است.

براون و همکارانش در سال ۱۹۹۲ بر اساس هضم آنزیمی ژنوم کامل میتوکندری تاسماهی سفید اختلاف معنی‌داری را در فرکانس ژنوتیپ‌ها بین رودخانه‌های کلمبیا و فریزر پیدا کردند. آن‌ها پیشنهاد کردند که این اختلاف معنی‌دار احتمالاً به‌خاطر اثر رانش ژنتیکی می‌باشد. در این تحقیق، توزیع و فرکانس‌های تنوع طول در تاسماهی ایرانی اختلاف معنی‌داری

سفید رود و جنوب شرقی دریای خزر ۸ هاپلوتیپ مشخص شد که در جمعیت ناحیه جنوب شرقی دریای خزر بیشترین تنوع هاپلوتیپی 0.0735 ± 0.0781 و متوسط تنوع نوکلئوتیدی 0.528 و متوسط واگرایی نوکلئوتیدی 0.00231 به دست آمد و نتایج حاصل از تست x^2 Monte carlo نشان داد که هاپلوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بحث

امروزه ذخایر ماهیان خاویاری در سراسر دنیا از جمله دریای خزر به‌خاطر آلودگی‌های محیطی، تقاضای زیاد گوشت و استحصال خاویار رو به نابودی است. یکی از راه‌های بازسازی جمعیت ماهیان خاویاری، تکثیر مصنوعی و حتی طبیعی آن‌ها است. اهداف اصلی آزمایشات مارکرهای ژنتیکی در تاسماهی‌ها، تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آن‌ها می‌باشد و با تعیین مارکرهای ژنتیکی می‌توان اثرات صید و صیادی و آلودگی‌ها را نیز بر روی تنوع ژنتیکی آن‌ها به‌دست آورد و اطلاعات زیادی را در مورد ژنتیک گونه‌های در حال انقراض یا کمیاب تهیه نمود. نشانگر RFLP نیز به‌عنوان یکی از مارکرهای متداول ژنتیکی به‌طور وسیعی در جانوران از جمله تاسماهی‌ها به منظور رده‌بندی،

Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sunderland: Sinauer Associate.

Brown, J. R. et al (1992). MtDNA length variation and heteroplasmy in population of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 132: 221-228.

Buroker, N. E. et al (1990). Length heteroplasmy of White sturgeon mtDNA: An illegitimate model. *Genetics*, 124: 157-163.

Harrison, R. G. (1989). Animal mtDNA is a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 6-11.

Meyer, A. et al (1990). Monophyletic origin of Like Victoria cichlid fished suggested by mtDNA sequences. *Nature*, 347: 550-553.

Patterson, C. (1982). Morphology and inter-relationships of primitive ictinopterygiin fishes. *American Zoologist*, 22: 241-259.

Pourkazemi, M. (1996). *Molecular and Biochemical Genetic Analysis of Sturgeon Stocks from the South Caspian Sea*. Ph. D. Thesis, University of Wales, Swansea.

Pourkazemi, M. (1999). Application of mtDNA D-Loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 23-28.

Rand, D. M., R. G. Harrison (1986). MtDNA transmission genetics in crickets. *Genetics*, 114: 955-970.

Roff, D. A. and P. Bentzen (1989). The statistical analysis of mtDNA polymorphisms: X^2 and problem of small sample size. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 539-545.

Thomas, W. K., and Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson (1990). Spatial and temporal continuity of kangaroo rat population shown by sequencing mtDNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 101-112.

Upholt, W. B. and I.B. Dawid. (1977). Mapping of mtDNA of individual sheep and goats; rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, 11: 571-583.

Wilkinson, G. S. and Chapman, A. M. (1991). Length and sequence variation in evening bat D-Loop mtDNA. *Genetics*, 128: 607-617.

تقدیر و تشکر

از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی به خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزنده ایشان در حین انجام این تحقیق و از کارشناسان محترم بخش ژنتیک انستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت تشکر و قدردانی می‌شود.



که این نتایج با نتایج پورکاظمی در سال ۱۹۹۶ بر روی تاسماهی روسی کاملاً منطبق است و دلایل احتمالی آن جریان ژنی بالا، فقدان مانع فیزیکی بین جمعیت‌ها و همچنین اثر تکثیر مصنوعی می‌باشد (Alukhov, 1987). در مطالعه بر روی تاسماهی روسی بر اساس تجزیه و تحلیل RFLP ناحیه کنترل mtDNA، متوسط تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۸- بود (Pourkazemi, 1999) که تنوع نوکلئوتیدی تحقیق حاضر شبیه مطالعه مذکور بوده اما واگرایی نوکلئوتیدی با آن اختلاف دارد که علت آن ممکن است ناکافی بودن تعداد نمونه و آنزیم باشد که البته برای رفع مشکل از تست شبیه سازی Monte carlo استفاده گردید. در این تحقیق از بین ۸ هاپلوتیپ مشخص شده، ۲ هاپلوتیپ AAA و BAA معمول و بقیه نادر بودند که فراوانی هاپلوتیپ‌ها اختلاف معنی داری را نشان نداد که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی روی ناحیه کنترل mtDNA تاسماهی روسی شباهت دارد (Pourkazemi, 1999). از آنجایی که ناحیه کنترل mtDNA تحت تاثیر فشار انتخابی قرار نمی‌گیرد وسیله مناسبی جهت بررسی تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی است. اما به دلیل اینکه تعداد نمونه‌ها و آنزیم‌های مورد مطالعه کافی نبوده و فقط ۲۸ جایگاه نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفته، در بررسی حاضر، اختلافات، معنی دار نیست و تنوع بسیار پایین است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی بررسی‌ها با تعداد نمونه‌ها و آنزیم‌های پلی مورفیک بیشتری صورت گیرد و نمونه‌ها از مناطق وسیع‌تر، در دریای خزر (رودخانه ولگا، ارال ویا کورا) تهیه و مورد بررسی قرار گیرد و نیز ناحیه کنترل mtDNA تاسماهی ایرانی تعیین توالی گردد.

منابع

Altukhov, Yu. H., and E. A. Salmenkova (1987). Population genetics of warm water fish. In K. Trews. *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*. Berlin: H. Heenmann GmbH & Co.

Anders, H. J., C. R. Geol and M. S. Howell (2000). Assessing genetic variation among Columbia basin White sturgeon population. *Annual report*, 99-BI-16061: 99-122.

Anderson, S.A. et al (1981). Sequence of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:454-456.