تجزیه و تحلیل ساختار کامل ناحیه دی لوپ میتوکندریایی به همراه موتیف‌های تنظیمی در ۴ گونه ماهیان خاویاری دریای خزر

خدیجه دادخواه*[۱] ، قدرت رحیمی میانجی[۱]، ایوب فرهادی[۱]

*Kdadkhah29@gmail.com

۱- گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۸

چکیده

در این پژوهش قطعه کامل دی لوپ به همراه موتیف‌های تنظیمی آن در چهار گونه از ماهیان خاویاری دریای خزراز جنس *Acipenser* (چالباش *A.Gueldenstadtii*، قره برون *A.persicus*، شیپ *A.nudiventris*، اوزون برون *A.stellatus*) مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش استات آمونیوم و واکنش PCR توسط یک جفت آغازگر اختصاصی جهت تکثیر ناحیه کامل دی لوپ انجام گرفت. توالی‌یابی با استفاده از روش سنگر انجام شد. توالی تکراری مینی ستلایت در ناحیه بالادست دی لوپ و بعد از توالی کدکننده تی آر ان آ پرولین در همه گونه‌ها به جز شیپ مشاهده شد. نتایج نشان داد که واحدهای تکراری مرکزی ۸۳-۸۲ جفت بازی با ۳/۲ تکرار در چالباش و قره‌برون و ۲/۴ تکرار در اوزون‌برون سبب تنوع طول در این ناحیه شده است. علاوه بر این، توالی تکراری مرکزی، دو توالی تکراری دیگر با اندازه ۳۹ و ۴۳ جفت باز نیز در این بخش مشاهده شد که این توالی ها نیز با ۳/۲ تکرار در این ناحیه وجود داشتند. طول ناحیه کنترلی در گونه‌های چالباش، قره‌برون، اوزون‌برون و شیپ به ترتیب برابر با ۹۲۱، ۸۷۰، ۸۲۶ و ۸۳۹ جفت باز بود. بررسی ساختار کلی ناحیه دی لوپ نشان داد که ناحیه کنترلی ماهیان خاویاری شامل همولوگ‌هایی از بلوک‌های توالی محافظت شده CSB می‌باشد که واحد های تکراری مینی ستلایت در بالادست این بلوک‌ها واقع شده‌اند. حضور توالی‌های تکراری مینی ستلایت در ناحیه کنترلی دی لوپ اهمیت این نشانگرها را در برنامه‌های حفظ منابع ژنتیکی و غربالگری ماهیان خاویاری نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: توالی‌یابی، دی لوپ میتوکندری، ماهیان خاویاری، مینی ستلایت، دریای خزر

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

مقدمه

در جهان ۲۷ گونه ماهیان خاویاری وجود دارند و پنج گونه از آنها (چالباش *A.Gueldenstadtii*، قره برون *A.persicus*، شیپ *A.nudiventris*، اوزون برون *A.stellatus*) که متعلق به دو جنس *Huso* و *Acipenser* می‌باشند، در دریای‌خزر یافت می‌شوند (Pourkazemi *et al*., 2006). اکثر ماهیان خاویاری توسط اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) به عنوان گونه‌های در معرض خطر شناخته شده‌اند (Dugo *et al*., 2004). گزارش شده است که ۸۵ درصداز ماهیان خاویاری در معرض خطر انقراض هستند (Congiu *et al*., 2011). تحقیقات نشان داده است که تولید تجاری خاویار در اروپا و شمال امریکا و همچنین در روسیه و ایران بشدت کاهش یافته است (Raymarkers & Hoover, 2002). امروزه اثرات عوامل مختلف بر جمعیت ماهیان خاویاری، باعث شده است که ماهیان اوزون‌برون و شیپ در اروپا تقریبا ناپدید شوند و جمعیت اوزون‌برون و چالباش و فیل‌ماهی دریای سیاه نیز بشدت کاهش یافته است (Williot *et al*., 2002). مطالعات مولکولی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها اطلاعات ارزشمندی را برای مدیریت مناسب و بقاء گونه‌های در معرض خطر در اختیار قرار می‌دهد (Rosenthal *et al*., 2011). شناسایی ساختار ژنتیکی بویژه در حوزه آبزیان و برنامه‌های مدیریتی ضروری است و ابزارهای ارزشمند در تجارت ماهیان خاویاری می‌باشند (Nielsen *et al*., 2012). توالی‌یابی ژن‌های میتوکندریایی به عنوان یک روش مولکولی قدرتمند و ارزان برای تشخیص ماهیان خاویاری شناخته شده است (Ogden *et al*., 2013). منطقه کنترلی دی لوپ بین TRNA فنیل آلانین و پرولین در ژنوم میتوکندری مهره‌داران قرار دارد و وقوع جهش در این ناحیه ۵-۳ برابر در مقایسه با بقیه ژنوم میتوکندری است (Meyer *et al*., 1993). حضور مناطق حفاظت شده در منطقه کنترلی میتوکندری نشان می‌دهد که این ناحیه ممکن است دارای عملکرد تنظیمی در تکثیر و رونویسی ژنوم باشد.

با وجود تغییرات زیاد در طول منطقه کنترلی ژنوم میتوکندری در مهره‌داران، اندازه آنها عموماً در حدود ۱۱۰۰ جفت باز است (Anderson *et al*., 1981). این تغییرات به طور عمده شامل جایگزینی و حذف نوکلئوتیدهاست (Lunt *et al*., 1998). تعداد زیادی از مطالعات تجربی در ماهیان، بلوک‌های توالی تکراری را در این ناحیه کنترلی شناسایی کرده‌اند. اندازه و ساختار آنها ممکن است در بین گونه‌های مختلف، متفاوت باشند (Shui *et al*., 2008; Ravago *et al*., 2002; Ludwig *et al*., 2000; Abhyankar *et al*., 2009). این توالی‌های تکراری می‌تواند در نزدیکی'۵ یا نزدیک به انتهای '۳ (Broughton *et al*., 1997) ناحیه کنترلی قرار گیرند. Mugue و همکاران (۲۰۰۸) از توالی‌یابی ناحیه کنترلی میتوکندری برای شناسایی ۹ گونه تاس ماهی (چالباش، شیپ، قره برون، بری، آموراسترجن، استرلیاد، اوزون برون، فیل ماهی، کالوگا) استفاده کردند. Khoshkholgh و همکاران (۲۰۱۱) از توالی‌یابی دی لوپ برای شناسایی تنوع ژنتیکی گونه تاس‌ماهی ایرانی استفاده نمودند. Chakmehdouz Ghasemi و همکاران (۲۰۱۴) از توالی‌یابی دی لوپ میتوکندری برای بررسی ارزیابی ساختار ژنتیکی و جمعیتی تاس‌ماهی ایرانی سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه سفیدرود استفاده نمودند. Boscari و همکاران (۲۰۱۴) از توالی‌یابی دی لوپ میتوکندری به عنوان داده‌های مکمل در شناسایی گونه‌های هیبرید و خالص خاویاری استفاده کردند. البته این محققین به حضور بلوک‌های تکراری در این ناحیه توجه نداشته‌اند. اما Ludwig و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی ۱۱ گونه خاویاری وجود بلوک‌های تکراری در ناحیه کنترلی دراین گونه ها را گزارش نمودند. Çiftci و همکاران (۲۰۱۳) با توالی یابی ناحیه دی لوپ در گونه‌های اوزون‌برون و چالباش و فیل‌ماهی متوجه حضور بلوک‌های تکراری در این ناحیه شدند که اندازه آن را ۸۴-۸۲ جفت باز گزارش کردند. این تحقیق به منظور بررسی ساختار کامل ناحیه کنترلی دی لوپ میتوکندریایی و موتیف های تنظیمی آن در چهار گونه ماهیان خاویاری

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

دریای خزر صورت گرفت که تاکنون در ماهیان خاویاری به این صورت مورد توجه قرار نگرفته است.

مواد و روش کار

نمونه برداری و استخراجDNA

نمونه‌هایی از بافت باله دمی چهار گونه ماهیان خاویاری دریای خزر شامل: ۱۰ نمونه قره‌برون، ۴ نمونه چالباش، ۱۰ نمونه اوزون‌برون و ۱۰ نمونه شیپ که توسط کارشناسان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر گرفته شد، در اختیار ما قرار گرفتند. نمونه‌ها ابتدا در اتانول ۹۹ درصد نگهداری شدند و سپس تا زمان استخراج DNA در۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند. استخراج DNA به‌روش استات آمونیوم (McQuowen *et al*., 2000) صورت گرفت و برای تعیین کمیت و کیفیت DNAاستخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت‌های مخلوط مادر کمپانی یکتا تجهیز آزما در دستگاه ترموسایکلر (BioRad ساخت کشور آمریکا) با استفاده از آغازگر اختصاصی رفت:

F-5 -AACTGCCCTAGTAGCTTAGAC-3 و

برگشت:

R-5 -GACAAGTCAGTCCTGCTTTTG-3 انجام گرفت (Shao *et al*., 2014).

واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر، حاوی ۱۰۰ نانو گرم از DNA نمونه، نیم میکرولیتر آغازگر رفت و نیم میکرولیتر آغازگر برگشت در غلظت ۱۰ پیکو مول و ۷/۵ میکرولیتر مخلوط مادر کمپانی یکتا تجهیز آزما (۰/۵ میلی مول از dNTP و ۰/۵ میلی مول DNA پلی‌مراز و ۱/۲ میلی مول MgCl2) که با افزودن آب استریل به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر رسانده شد، انجام گرفت. چرخه‌های حرارتی برای واکنش شامل: ۴ دقیقه دناتوراسیون اولیه در۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد دما و ۳۰ ثانیه زمان برای دناتوراسیون، ۵۸ درجه سانتی گراد دما و ۳۰ ثانیه زمان برای اتصال آغازگر و ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه دما برای بسط در سیکل بکار برده شد و ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بسط نهایی صورت گرفت. پس از تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱٪ انتقال یافتند تا برای انجام الکتروفورز و در ادامه برای رویت باندهای احتمالی مورد سنجش قرار گیرند.

توالی‌یابی

از محصولات PCR نمونه‌هایی که باند بهتر داشتند، برای توالی‌یابی به روش سنگر برای (دو نمونه برای هر گونه) مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها به کمپانی میکروسنس سوئیس ارسال شدند. برای انجام توالی‌یابی دو طرفه از قطعه تکثیری، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۵۰ میکرولیتر در غلظت ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده در PCR، به شرکت مربوطه ارسال شدند.

هم‌ترازی توالی‌ها

بعد از دریافت توالی‌ها، برای مطمئن شدن از صحت توالی‌ها با ابزار بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مورد ارزیابی قرار گرفتند و همولوژی توالی‌ها مشخص شدند. سپس با استفاده از نرم افزار CLUSTAL X نسخه ۲/۱ تنوع و هم ترازی در توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های رفت و برگشت هر گونه با توجه به ژنهای مرجع مربوطه شان توسط نرم افزار BioEdit ورژن 7.0.5 مورد ویرایش قرار گرفت.

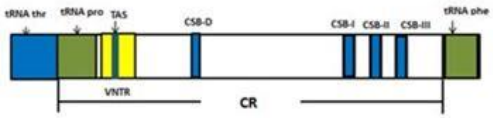
بلوک‌های تکراری مینی ستلایت(VNTR)

در تحقیق حاضر حضور بلوک‌های تکراری در ناحیه دی لوپ توسط نرم افزار TANDOM REPEAT FINDER (tandem.bu.edu/trf/trf.submit.options.html) مورد بررسی قرار گرفتند.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

بلوک توالی‌های محافظت شده (CSB)

در بسیاری از مهره‌داران، منطقه غیر کدگذاری در ژنوم میتوکندری بین TRNA ترئونین و فنیل آلانین قرار گرفته است. توالی مرتبط با خاتمه (TAS) و بلوک‌های توالی حفظ شده (CSBIII, CSBII, CSBI) به عنوان یک سیگنال برای آغاز و خاتمه رونویسی عمل می‌کنند (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار کامل دی لوپ به همراه نواحی تنظیمی و توالی میتی ستلایت

Figurre 1: The complete D-loop structure along with regulatory region and mini-satellite sequence.

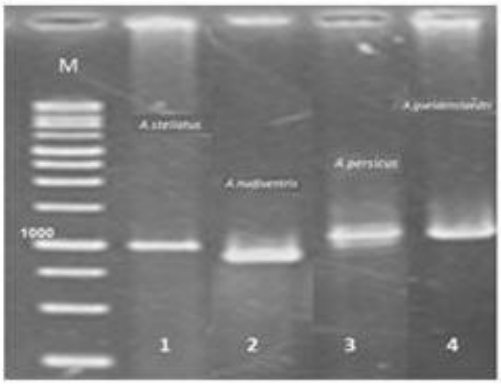
به طور کلی، این توالی‌های کلیدی بسیار محافظت شده‌اند. برای شناسایی نواحی تنظیمی دخیل در امر رونویسی باید روی بلوک CSBIII, CSBII, CSBI و CSB-D متمرکز شد. این بلوک‌های تنظیمی بااستفاده از نرم افزار CLUSTAL X نسخه ۲/۱ ترازبندی و شناسایی شدند.

تعیین روابط فیلوژنی

تحلیل‌های فیلوژنیک براساس ترسیم درخت ژنی ملاکی برای جداسازی ویژه و نیز تشخیص گونه‌های نیازمند محافظت و همچنین گونه‌های در معرض انقراض می‌باشند که از روش‌های کار آمد و قدرتمند محسوب می‌شوند. ناحیه کنترلی دی لوپ به جهت نرخ جهش بالا عمدتا برای مطالعات فیلوژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش neighbor jointing و به کمک مدل حداکثر درست نمایی و با بوت استرپ ۱۰۰۰ توسط نرم افزار MEGA 7 نسخه ۶۸ بیتی انجام شد.

نتایج

استخراج DNA و تکثیر قطعه مورد نظر (دی لوپ میتوکندری) و نواحی مرتبط به آن (TRNA ترئونین و پرولین) با موفقیت انجام گرفت (شکل۲).



شکل ۲: مشاهده باندهای قطعه تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪

Figure 2: Visualized bands of amplified fragment using 1% agarose gel electrophoresis.

باندهای مشاهده شده در شکل ۲ تنوع طولی در ناحیه کنترلی میتوکندری را به و ضوح در گونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند. توالی‌ها نشان دادند که در این ناحیه در اندازه قطعه دی لوپ تنوع وجود دارد و دامنه آن از ۸۲۶ نوکلئوتید در ماهی شیپ تا ۹۲۱ نوکلئوتید در ماهی چالباش متغیر بود. طول ناحیه کنترلی در گونه‌های چالباش، قره‌برون، اوزون‌برون و شیپ به ترتیب برابر با ۹۲۱، ۸۷۰، ۸۲۶ و ۸۳۹ جفت باز بود (شکل۳).

برای شناسایی نواحی تنظیمی رونویسی روی حضور بلوک های تنظیمی CSB تمرکز شد. موقعیت‌های نسبی CSB شناسایی شده در این مطالعه، مشابه سایر مهره‌داران بود. طول این نواحی در توالی‌های CSB-D و CSB-I و CSB-II و CSB-III به ترتیب برابر با ۱۷ ، ۳۰ ، ۱۶ و ۱۷ نوکلئوتید بود (جدول۱).

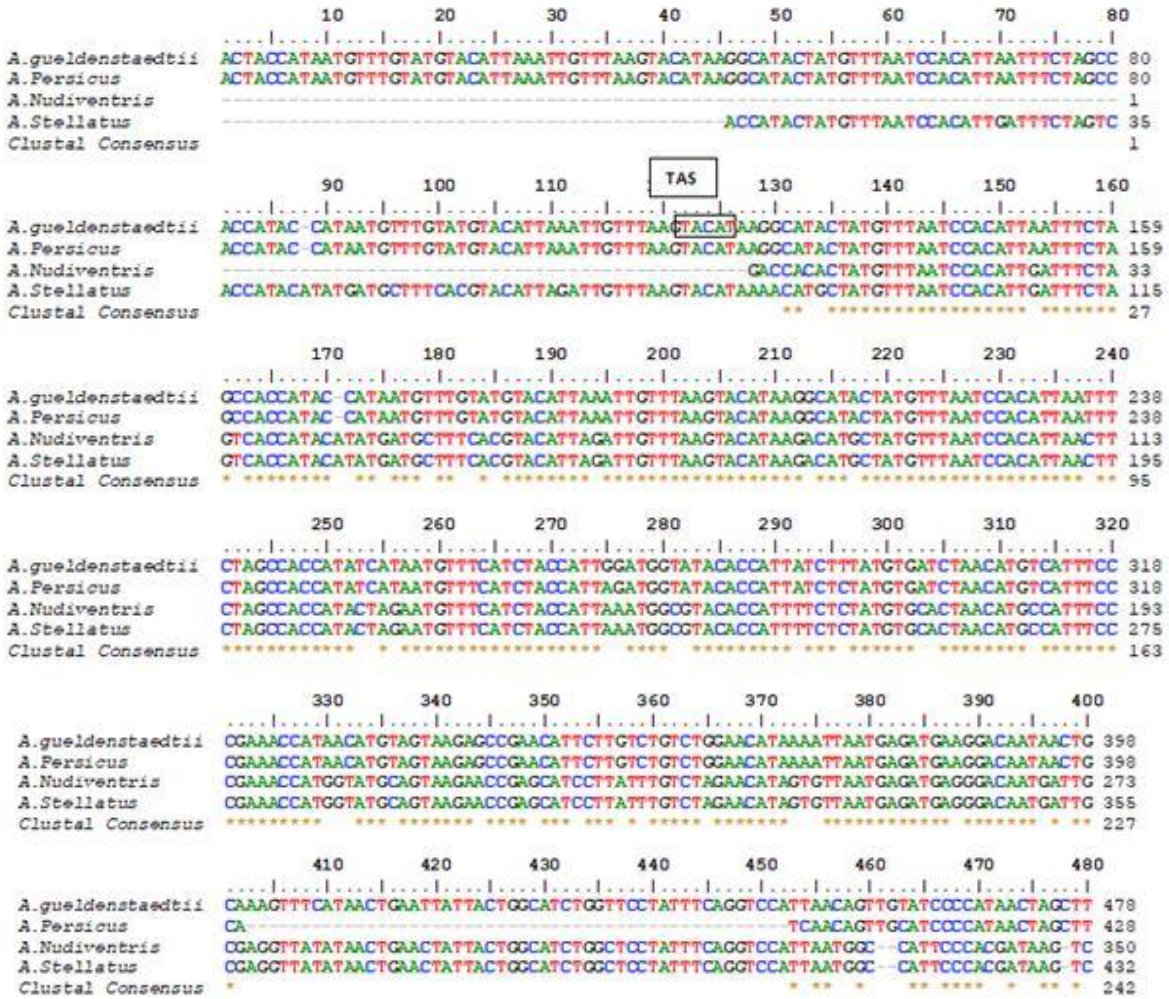
ترکیب بازها برای هر بلوک CSB تقریبا ویژه بود بنحوی که بلوک‌های CSB-D و CSB-I غنی از بازهای A و T و بلوک‌های CSB-III و CSB-II غنی از بازهای A و C بودند (شکل۳).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

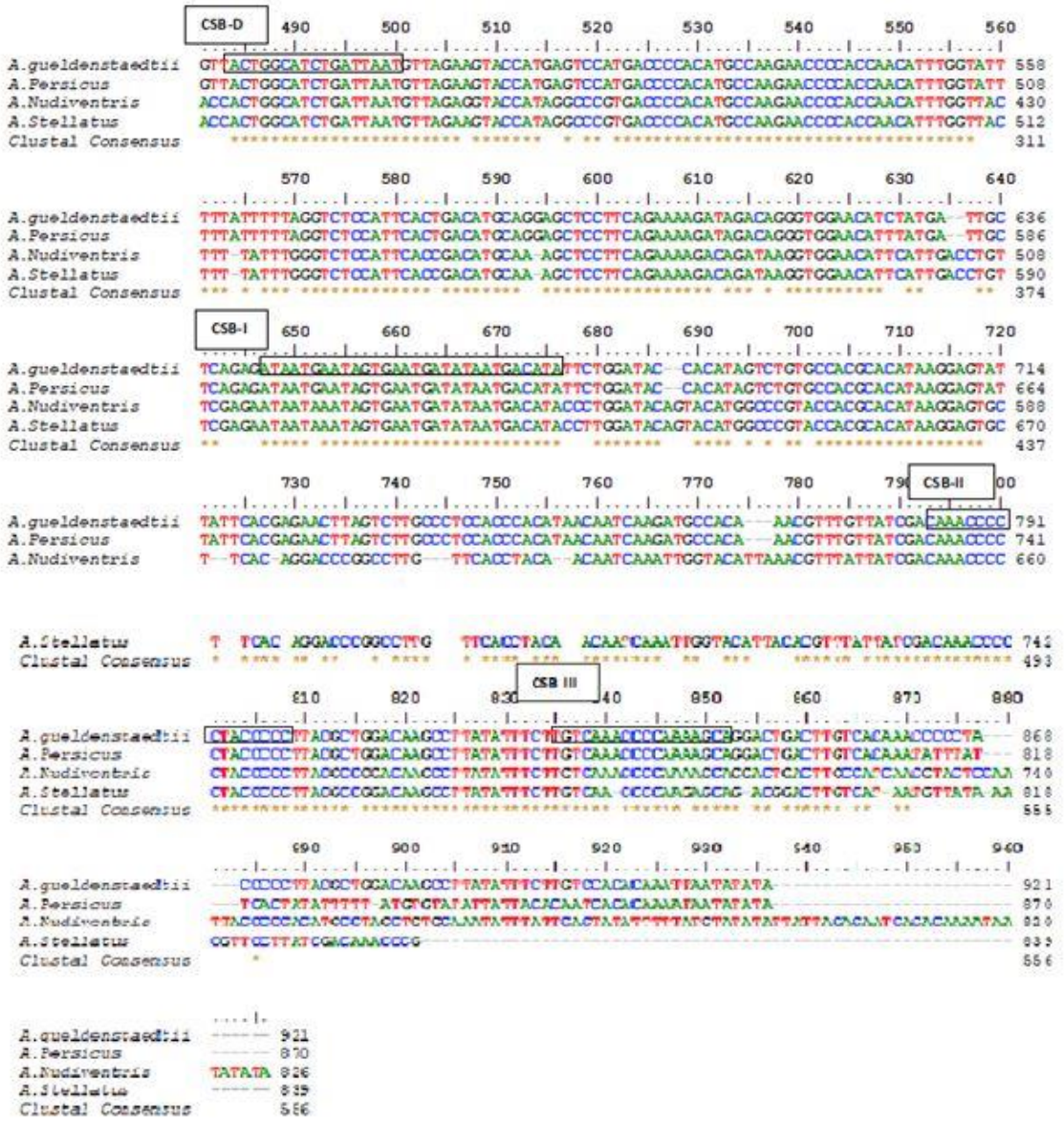
جدول ۱: توالی بلوک‌های محافظت شده (CBS) ، TAS و VNTR در ناحیه دی‌لوپ

Table 1: Conserved sequence blocks (CSB), TAS and VNTR in D-loop region.

نام توالی	نوکلئوتید
TAS	TCCAT
CSB-D	TACTGGCATCTGATTAAT
CSB-I	ATAATGAATAGTGAATGATATAATGACATA
CSB-II	CAAACCCCTACCCCC
CSB-III	TGTCAAACCCCAAAAGCA
VNTR (82bp)	TACCATAATGTTTGTATGTACATTAAATTGTTTAAGTACATAAGGGATACT
	ATGTTTAATCCACATTAATTTCTAGCCACCA
VNTR (39bp)	ACATTAATTTCTAGCCACCATACCATAATGTTTGTATGT
VNTR (43bp)	ACATTAAATTGTTTAAGTACATAAGGCATACTATGTTTAATCC



[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]



شکل ۳: موقعیت توالی بلوک‌های تنظیمی CSB-D، CSB-I، CSB-II ، CSB-III و TA در ناحیه دی‌لوپ

Figure 3: Location of conserved sequence blocks of CSB-D, CSB-I, CSB-II, CSB-III and TAS in the D-loop region.

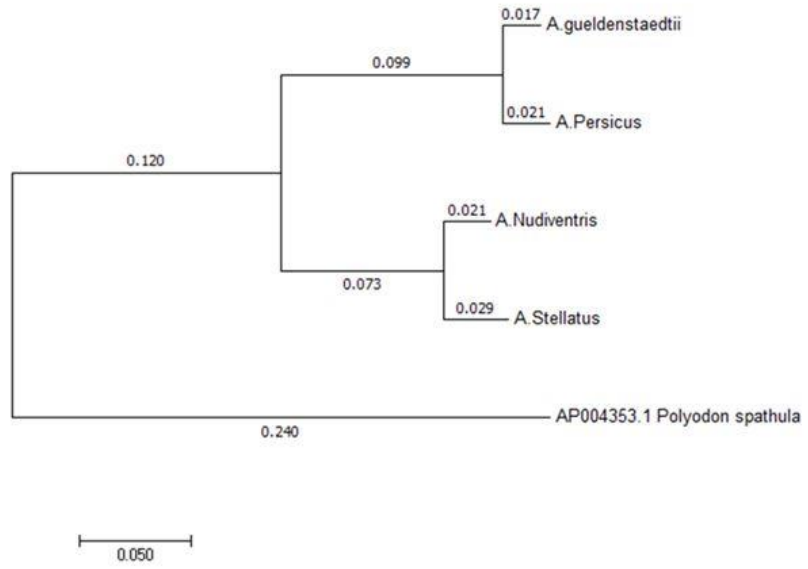
در بررسی توالی ناحیه کنترلی ماهیان خاویاری مورد مطالعه در ناحیه '۵ بلافاصله بعد از توالی TRNA پرولین (شکل۳) بلوک‌های تکراری مینی ستلایت با اندازه ۸۳-۸۲ جفت باز با ۳/۲ تکرار در گونه چالباش و قره‌برون و ۲/۴ تکرار در اوزون‌برون دیده شد (جدول ۲). البته این تکرارها بدون هیچ فاصله بدنبال هم قرار داشتند. علاوه بر این، بلوک تکراری مرکزی، دو توالی تکراری دیگر نیز در اندازه‌های کوچکتر (۳۹ و ۴۳ جفت باز) با ۳/۲ تکرار در قره‌برون و چالباش با کیفیت مشابه دیده شدند. این توالی‌های تکراری در گونه شیپ وجود نداشت (جدول۲). همانطوریکه در جدول ۲ نشان داده شد، این ناحیه غنی از بازهای A و T می‌باشد. آنالیز فیلوژنی برای چهار گونه خاویاری مورد بررسی و فاصله ژنتیکی آنها در شکل ۴ نشان داده شده است.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

جدول ۲: موقعیت، ویژگی‌ها و ترکیب نوکلئوتیدهای توالی میتی‌ستلایت در ناحیه دی‌لوپ

Table 2: The position, characteristics and nucleotits compostion VNTR sequence in D-loop region.

گونه	(%) T	(%) G	(%) C	(%) A	درصد ایندل	تعداد تکرار	اندازه	موقعیت نشانگر
	۳۸	۱۰	۱۶	۳۳	۰	۳/۲	۸۲	۳-۲۶۱
چالباش	۳۷	۱۰	۱۷	۳۴	۲۰	۳/۲	۳۹	۶۵-۱۹۲
	۳۷	۱۰	۱۵	۳۶	۲۰	۳/۲	۴۳	۱۰۴-۲۳۵
	۳۸	۱۰	۱۶	۳۳	۰	۳/۲	۸۲	۳-۲۶۱
قره برون	۳۷	۱۰	۱۷	۳۴	۲۰	۳/۲	۳۹	۶۵-۱۹۲
	۳۷	۱۰	۱۵	۳۶	۲۰	۳/۲	۴۳	۱۰۴-۲۳۵
اوزون‌برون	۳۶	۱۱	۲۰	۳۱	۰	۳/۲	۸۳	۷-۲۰۸



شکل ۴: روابط فیلوژنی در چهار گونه خاویاری

Figure 4: Phylogeny relations in four sturgeon species.

بحث

نتایج نشان دادند که در این ناحیه، اندازه قطعه دی لوپ دارای تنوع بوده است و دامنه آن از ۸۲۶ نوکلئوتید در ماهی شیپ تا ۹۲۱ نوکلئوتید در ماهی چالباش متغیر بود. در ناحیه کنترلی در بخش '۵ بلافاصله بعد از تی آر ان آ پرولین بلوک های تکراری مینی ستلایت مشاهده شد که ۲/۴ در اوزون‌برون و ۳/۲ تکرار در چالباش و قره‌برون بود. اندازه این واحد تکراری در این موقعیت ۸۳-۸۲ جفت باز بود که در تحقیقات قبلی توسط Ludwig و همکاران (۲۰۰۰) نیز در چالباش، قره برون و اوزون برون مشاهده شد. البته در تحقیق حاضر علاوه بر این بلوک تکراری مرکزی، دو بلوک تکراری دیگر با اندازه‌های کوچکتر ۳۹ و ۴۳ جفت باز با ۳/۲ تکرار مشاهده شدند. در تحقیق حاضر همچنین بر حضور بلوک‌های تنظیمی CSB و همچنین توالی تنظیمی موثر بر خاتمه رونویسی (TAS) تمرکز شده است که در هر چهار گونه توالی TAS در بالادست CSB در نا حیه '5 دی لوپ مشاهده شد. مناطق تنظیمی و بلوک‌های محافظت شده شامل بلوک‌های D وCSB1,2,3 همانند سایر گونه‌های ماهی در ناحیه کنترلی بوده است (Satoh *et al.*, 2016). اگرچه کار

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

کردهای دقیق بلوک‌های تنظیمی CSB-I و CSB-D هنوز واضح نیست. اما نشان داده شد که بلوک‌های تنظیمی CSB-I و CSB-D در مهره‌داران در رپلیکاسیون و نسخه برداری ژنوم میتوکندری دخالت دارند (Satoh *et al.*, 2016). بلوک‌های تنظیمی CSB-II در ارتباط با اتصال RNA به DNA در فرآیند تکثیر DNA عمل می‌کند. به همین دلیل نیز غنی از GC می باشد که برای اتصال ضروری است. موتیف CSB-III نیز که دارای توالی پلی A می‌باشد در خاتمه رونویسی نقش دارد. عمل ناحیه دی لوپ را به طور ساده می‌توان باز نگه داشتن رشته های mtDNA دانست تا ناحیه مورد نظر بیشتر در دسترس برای پروتئین‌های ماشین رونویسی و همانندسازی قرار گیرد.

در مطالعه Ludwig و همکاران (۲۰۰۰) که بر ۱۹ گونه خاویاری انجام گرفت، جهش در بالادست TAS را به حضور بلوک‌های تکراری در پایین دست این موتیف نسبت دادند. آنها همچنین واحد های تکراری با اندازه ۸۲ جفت باز در گونه چالباش، قره‌برون، اوزون‌برون و شیپ مشاهده کردند که در مورد گونه شیپ به لحاظ حضور واحدهای تکراری با تحقیق حاضر مغایرت داشت. Mugue و همکاران (۲۰۱۶) نیز با تحقیق بر گونه شیپ دریای خزر در روسیه توالی تکراری ۸۲ جفت بازی را در گونه شیپ گزارش کردند. Ray و همکاران (۲۰۰۳) با تحقیق بر ناحیه کنترلی تشکیل بلوک‌های تکراری در این ناحیه را به ژن‌های نزدیک به آنها 12SrRNA و tRNA مربوط دانستند. Çiftci و همکاران (۲۰۱۳) با توالی‌یابی ناحیه دی لوپ در گونه‌های اوزون‌برون، چالباش و فیل‌ماهی متوجه حضور بلوک تکراری در این ناحیه شدند که اندازه آن را ۸۳-۸۲ جفت باز گزارش کردند. Saitoh و همکاران (۲۰۰۰) در ناحیه کنترلی ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) نیز بلوک تکراری با اندازه ۷۴ جفت باز را گزارش کردند. این توالی‌ها، تکرارهای متفاوتی را در بین گونه‌ها نشان می‌دهند که شاید در نتیجه تکامل هماهنگ باشد. تفاوت در فراوانی کپی چندگانه از ژنوم در گونه‌ها ممکن است به تفاوت‌های نرخ جهش نسبت داده شود یا مکانیسمی که ممکن است میزان جهش را تنظیم کند. آنچه که مشخص است حضور بلوک‌های تکراری در این ناحیه می‌تواند در شناسایی برخی از گونه‌های ماهیان خاویاری موثر باشد. اهمیت این داده‌ها همچنین به جهت پایداری روشهای مبتنی بر PCR دارای ارزش بالایی می‌باشد. توالی های تکراری همچنین به دلیل تنوع زیاد، دارای ارزش بالایی در تفکیک گونه‌ها می‌باشند. این مسئله بخصوص در بررسی تنوع بین گونه‌ای هنگامی که داده‌ها خیلی بزرگ نیستند، برای رویکردهای رده‌بندی موجودات اهمیت زیادی دارند. آنالیز ناحیه کنترلی میتوکندری در این مطالعه آشکار کرد که در بین گونه‌های خاویاری تنوع مشاهده می‌شود که به لحاظ فیلوژنی دارای ارزش ویژه است. بررسی فیلوژنی نشان داد که روابط چهار گونه خاویاری مورد بررسی بگونه‌ای است که هر ۴ گونه خاویاری دریای خزر در یک کلاد قرار می‌گیرند. اما دو گونه شیپ واوزون برون در شاخه مجزا از دو گونه قره برون و چالباش واقع می شوند. انجام تحقیقات بیشتر و تمرکز بیشتر بر این توالی‌های محافظت شده به منظور امکان توسعه نشانگرهای اختصاصی داخل گونه‌ای جهت استفاده در برنامه های حفظ منابع ژنتیکی و اصلاح نژاد این گونه ها توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری که در نمونه‌برداری و در اختیار گذاشتن ماهیان خاویاری برای انجام این تحقیق همکاری لازم داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abhyankar, A., Park, H. B., Tonolo, G. and Luthman, H., 2009. Comparative sequence analysis of the non-protein-coding mitochondrial DNA of inbred rat strains. PloS one, 4(12), e8148. DOI: 10.1371/ journal.pone.0008148.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J. and Schreier, P. H., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290(5806), 457.

Boscari, E., Barmintseva, A., Pujolar, J. M., Doukakis, P., Mugue, N. and Congiu, L., 2014. Species and hybrid identification of sturgeon caviar: a new molecular approach to detect illegal trade. Molecular ecology resources, 14(3), 489-498. DOI: 10.1111/ 1755-0998.12203

Broughton, R. E. and Dowling, T. E., 1997. Evolutionary dynamics of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of the minnow Cyprinella spiloptera. Molecular biology and evolution, 14(12), 1187-1196. DOI: 10.1093/oxfordjournals. molbev.a025728

Chakmehdouz Ghasemi, F., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., Hasanzadeh Saber, M., Ghoroghi, A. and Azizzadeh Pormehr, L., 2014. Population genetic structure of Persian sturgeon (Acipenser persicus) between South Caspian Sea and Sefidrud River using DNA sequencing method. Iranian Scientific Fisheries Journal, 23(2), pp.11-20. DOI: 10.22092/ ISFJ.2014.103686

Çiftci, Y., Eroğlu, O. and Firidin, Ş., 2013. Heteroplasmy and length variation in the tRNApro-Dloop regions of three sturgeon species (A. stellatus, A. gueldenstaedtii and H. huso) from the Turkish coast of the Black Sea. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 38(3). DOI: 10.5505/tjb.2013.70783

Congiu, L., Pujolar, J. M., Forlani, A., Cenadelli, S., Dupanloup, I., Barbisan, F. and Fontana, F., 2011. Managing polyploidy in ex situ conservation genetics: the case of the critically endangered Adriatic sturgeon (Acipenser naccarii). PloS one, 6(3), e18249. DOI: 10.1371/ journal.pone.0018249

Dugo, M. A., Kreiser, B. R., Ross, S. T., Slack, W. T., Heise, R. J. and Bowen, B. R., 2004. Conservation and management implications of fine-scale genetic structure of Gulf sturgeon in the Pascagoula River, Mississippi. Journal of Applied Ichthyology, 20(4), 243-251. DOI: 10.1111/ j.1439-0426.2004.00572.x

Khoshkholgh, M., Pourkazemi, M., Nazari, S., and Azizzadeh Pormehr, L., 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, Acipenser percicus, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. Caspian Journal of Environmental Sciences, 9(1), 17-25.

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

Lunt, D. H., Whipple, L. E. and Hyman, B. C., 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

Molecular Ecology, 7(11), 1441-1455. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00495.x

MCQuown, E.C., Sloss, B.L. and Sheehen, R.J., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon .New primer sequences for Scaphyhinchus and Acipenser.transactions of the American fisheries society.129:1380.1388. DOI: 10.1577/1548-8659

Meyer, A., 1993. Evolution in mitochondrial and in fishes. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2. Molecular Biology Frontier.

Mugue, N. S., Barmintseva, A. E., Rastorguev, S. M., Mugue, V. N. and 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. Russian Journal of Genetics, 44(7), 793-798.

Mugue, N., Barmintseva, A., Schepetov, D., Shalgimbayeva, G. and Isbekov, K., 2016. Complete mitochondrial genomes of the critically endangered Ship sturgeon Acipenser nudiventris from two seas. Mitochondrial DNA Part B, 1(1), 195-197. DOI: 10.1080/23802359.2016.1144103

Nielsen, E. E., Cariani, A., Mac Aoidh, E., Maes, G. E., Milano, I., Ogden, R. and Bekkevold, D., 2012. Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. Nature communications, 3, 851.

Ogden, R., Gharbi, K., Mugue, N., Martinsohn, J., Senn, H., Davey, J. W. and Sergeev, A., 2013. Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing. Molecular Ecology, 22(11), 3112-3123. DOI: 10.1111/mec.12234

Pourkazemi, M., 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. Journal of Applied Ichthyology, 22, 12-16. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007. 00923.x

Ravago, R. G., Monje, V. D. and Juinio-Meñez, M. A., 2002. Length and sequence variability in mitochondrial control region of the milkfish, Chanos chanos. Marine Biotechnology, 4(1), 40-50. DOI: 10.1007/ s10126-001-0076-4

Ray, D. A. and Densmore, L. D., 2003. Repetitive sequences in the crocodilian mitochondrial control region: Poly-A sequences and heteroplasmic tandem repeats. Molecular biology and evolution, 20(6), 1006-1013.

Raymakers, C. and Hoover, C., 2002. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries. Journal of Applied Ichthyology, 18(4-6), 629-638. DOI: 10.1046/j.1439-0426.2002. 00398.x

Rosenthal, H., Wei, Q., Chang, J., Bronzi, P. and Gessner, J., 2011. Conclusions and recommendations of the 6th International Symposium on Sturgeons (Wuhan, China, October 2009). Journal of Applied Ichthyology, 27(2), 157-161. DOI:10.1111/ j.1439-0426.2011.01755.x

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

Saitoh, K., Hayashizaki, K., Yokoyama, Y., Asahida, T., Toyohara, H. and Yamashita, Y., 2000. Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationship. Journal of Heredity, 91(4), 271-278. DOI: 10.1093/ jhered/91.4.271

Satoh, T. P., Miya, M., Mabuchi, K., and Nishida, M., 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. Bmc Genomics, 17(1), 719. DOI: 10.1186/ s12864-016-3054-y

Shao, W., Wei, L., Li, L., Wang, H., Lin, Z. and Chen, J., 2014. Universal DNA primers for amplification complete mitochondrial genome for sturgeons. Conservation genetics resources, 6(2), pp.305-307. DOI 10.1007/s12686-013-0112-5

Shui, B. N., Han, Z. Q., Gao, T. X. and Miao, Z. Q., 2008. Tandemly repeated sequence in 5'end of mtDNA control region of Japanese Spanish mackerel Scomberomorus niphonius. African Journal of Biotechnology, 7(24).

Williot, P., Arlati, G., Chebanov, M., Gulyas, T., Kasimov, R., Kirschbaum, F. and Kim, Y., 2002. Status and management of Eurasian sturgeon: an overview. International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology, 87(5-6), 483-506. DOI: 10.1002/1522-2632(200211)87:5/6<483::AID-IROH483>3.0.CO;2-K

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]

Analysis of complete structure of mitochondrial D-loop region with regulating motifs in four sturgeon species of the Caspian Sea

Dadkhah Kh.[1]*; Rahimi Mianji Gh.[1]; Farhadi A.[1]

*Kdadkhah29@gmail.com

1- Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Abstract

In this study, analysis of complete structure of mitochondrial D-loop region with its regulatory motifs was investigated in four species of the Acipenser of Caspian sea (*A. gueldenstadtii, A. persicus, A. stellatus, A. nudiventris*). DNA extraction was done by acetate Ammonium method and PCR reaction were performed by a pair of specific primers for the complete amplification of D-loop along with sequences associated with tRNA-threonine and proline. Sequencing on amplified fragments were was done on both strands. Repetitive sequence of tandem repeat (mini-satellite) was observed in the upstream site of D-loop region after the sequence of tRNA proline in all species except the Ship. The results showed that the central repetitive units of 83-82 pairs with 3.2 repetitions in *A. persicus* and *A. gueldenstaedtii* and 2.4 repetitions in *A. stellatus* were the reason for the length variation in this region. In addition to the central repeat sequences, there were two more repetitive sequences of 39 and 43 bp in this section, which were also present with 3.2 repetitions. But none of these repetitive sequences was observed in ship. The length of the control region in the A. gueldenstadtii, A. persicus, A. stellatus, A. nudiventris was 921, 870, 826 and 839 bp, respectively. The overall structure of the D-loop region showed that the sturgeon control region is similar to that of other fish, including the homologues of the CSB-conserved blocks, which are located on the upstream of these blocks. According to the presence of tandem repeat (mini-satellite) in control D-loop region and also the importance of these markers in conservation programs for genetic resources it may be possible to use them in screening of sturgeon species.

Keywords: Sequencing, Mitochondrial D-loop, Sturgeon,Tandom repeat, Caspian sea

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.5.4.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119488]