RICEST© RICEST© RICEST©

معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی پنج گونه از خانواده کپور ماهیان دریای خزر به روش PCR-RFLPs

سهراب رضوانی گیل کلائی[۱]*؛ فرامرز لالوئی[۲]؛ رضا عقیلی[۳] و حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی[۴]

Rezvani@ifro.ir

۱- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۲ و۳- مرکز اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

۴- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۵

چکیده

در این تحقیق ۱۵ نمونه ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901)، ۱۰ نمونه سس ماهی بزرگ سر *Barbus capito* (Gueldenstaedti, 1772) ۱۰ نمونه ماهی سیم *Abramis brama* (Linnaeus, 1785)، ۱۰ نمونه ماهی ماش *Aspius aspius* (Linnaeus, 1758) و ۱۵ نمونه باله ماهی کلمه *Rutilus rutilus caspicus* در مکانهای صید تجاری و در تیوپ‌های ۵۰۰ میکرولیتری جمع‌آوری گردید. DNA کلی این نمونه‌ها به روش فنل کلروفرم (Hillis & Moritz, 1990) استخراج شدند و با استفاده از یک جفت پرایمر (جلودار) دارای توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ماهی کلمه به روش PCR ازدیاد پیدا کردند.

جهت آنالیز $RFLP_S$، محصول PCR ژن سیتوکروم b (۱۱۱۷bp) هر یک از نمونه‌های ماهی، با پنج آنزیم محدودالاثر (DNAasa) در دمای مناسب انکوباسیون، هضم گردیدند. باندهای DNA، با الکتروفورز عمودی در ژل پلی اکریلامایـد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره آشکار گردیدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پنج آنزیم *Hinf I*، *Hinc II*، *Hha I*، *RsaI* و *Mbo I* الگوهای پلی مورفیسم در بین برخی گونه‌ها نشان دادند که در نتیجه ژنوتیپ‌های ناشی از هضم آنزیمی از ۴ آنزیم *Hinf I*، *Mbo I*، *Hha I* و *Rsa I* هاپلوتیپهای AAAA را برای سس بزرگ سر، BBBB برای کلمه، CCCC برای سیم و EEEE را برای ماهی سفید نشان دادند که هر یک از این هاپلوتیپ‌ها برای هر یک از این گونه‌ها دارای اهمیت نشانگر ژنتیکی گونه‌ای می‌باشد و برای تمایز این گونه‌ها دارای ارزش می‌باشند.

لغات کلیدی: کپور ماهیان، Cyprinidae، نشانگرهای مولکولی، PCR-RFLP، دریای خزر

* نویسنده مسئول

مقدمه

دریای خزر در مقایسه با دریاهای آزاد دارای تنوع کمتری از گونه‌های ماهیان می‌باشد و تاکنون تنها ۹۸ گونه ماهی در آن شناسایی شده‌اند. خانواده کپور ماهیان دارای ۱۹ جنس و ۲۴ گونه و زیر گونه در حوضه دریای خزر می‌باشد (شریعتی، ۱۳۷۲).

بررسی تنوع نوکلئوتیدی درون و بین جمعیت‌ها با استفاده از مولکول DNA میتوکندری (mtDNA) و آنزیمهای اندونکلئاز محدودالاثر از سال ۱۹۷۹ آغاز شد.

برای اولین بار Avise و همکارانش در سال ۱۹۸۴ روش RFLP و بکارگیری mtDNA را در ماهی در گونه Blue gill (*Lepomis macrochirus*) بکار گرفتند.

بعدها این روش در گونه‌های زیادی از آبزیان و ماهیان مورد استفاده قرار گرفت که از جمله در تون ماهیان اقیانوس آتلانتیک و آرام (Graves *et al*., 1984)، ماهی کاد (Smith *et al*., 1989)، شاه میگوی ایران (محمدی کاشانی، ۱۳۸۱ ؛ اردلان، ۱۳۸۱)، میگو (رضوانی گیل کلائی، ۱۳۸۰)، پنج گونه ماهیان خاویاری دریای خزر ; (Rezvani Gilkolaei, 1997,1999,2000 ; Pourkazemi, 1996)، استورژن سفید (*A. transmontanus*) (Brown *et al*., 1992)، استورژن دریاچه‌ای (*A. fulvescens*) (Guenette *et al*., 1993) و استورژن آتلانتیک (*A. oxirhynchus*) (Bowen & Avise, 1990) را می‌توان نام برد.

امروزه ژنوم میتوکندریایی بطور گسترده برای دستیابی به نشانگرهای ژنتیکی در گونه‌های جانوری بکار می‌رود (Hynes *et al*.,1996 ; Ovenden & Wite, 1990). ویژگی‌هایی مانند کوچکی مولکول (در اکثر ماهیان در حدود ۵۰۰ ± ۱۶۵۰۰ جفت باز می‌باشد) (Rezvani Gilkolaei, 1997)، توارث مادری (Berrebi, 1995) و سرعت موتاسیون که پنج تا ده برابر ژنوم هسته‌ای بنحوی که در هر میلیون سال ۲ درصد تغییرات را متحمل می‌شود، بعنوان ساعت تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرند و برخی از ژنهای مستقر در آن برای بررسیهای بین گونه‌ای مانند سیتوکروم b و c و برخی ژنهای دیگر برای بررسی درون گونه‌ای و جمعیت‌ها مثل ناحیه D-Coop و ND5 -6 ... بسیار ارزشمند می‌باشند (Beckenbach, 1991).

آنالیز PCR-RFLP بعنوان یک روش مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها شناخته شده است (Chow & Inoue, 1993 ; Cronin *et al*., 1994). در حال حاضر شناسایی ماهیان با استفاده از روشهای مورفولوژی و مرستیک و روشهای کلاسیک معمول بوده و روشهای جدید (مولکولی) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد تا نتایج با هم مقایسه شوند. از طرفی ماهیان تجاری و گونه‌های در معرض خطر چون از اهمیت خاصی برخوردار هستند و گوشت و تخم آنها بفروش می‌رسد، برای شناسایی ماهیت گوشت و تخم (خاویار) روشهای مولکولی نیز مفید می‌باشد. امروزه روشهای مولکولی و بیوشیمیایی جدید مسئول تشخیص بسیاری از مشکلات تاکسونومیک و سیستماتیک هستند، زیرا اغلب گونه‌ها براساس مدارک ریختی قابل شناسایی نبوده یا بسیار مشکل می‌باشد. (Lin *et al*., 2002). هدف از این تحقیق بکارگیری این روش در تمایز گونه‌های پراهمیت کپور ماهیان دریای خزر برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌های بافت باله از ۵ گونه ماهی، سیم، ماش، کلمه، سفید و سس که به روش پره صید شده بودند از صیدگاههای سواحل ایران جمع‌آوری شد. در این بررسی ۱۰ نمونه از ماهی سیم ، ۱۰ نمونه از ماهی ماش، ۱۵ نمونه از کلمه، ۱۵ نمونه از ماهی سفید و ۱۰ نمونه از سس ماهی بزرگ سر در مجموع ۶۰ نمونه جمع‌آوری و بلافاصله حدود ۲۰۰ میلیگرم از بافت باله ماهیان در الکل مطلق (اتیلیک خالص) در ظروف نمونه تثبیت گردیدند و سپس برای انجام آزمایشات مولکولی به آزمایشگاه مرکز اکولوژی دریای خزر منتقل شدند.

DNA کلی هر یک از نمونه‌ها با روش فنل- کلروفرم (Rezvani Gilkolaei, 1997) به شرح زیر استخراج گردید:

ابتدا مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلیگرم از بافت باله ماهی خرد شد و در داخل میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتری (µl) قرار گرفت. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول STE[1] و ۳۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد SDS[2] و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰میلیگرم بر میلی‌لیتر) به آن اضافه گردید و برای بهتر مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه روی روتاتور قرار گرفت. سپس به مدت کافی میکروتیوب

1-STE : Sodium chloride 50 mm – Tris 25mM – EDTA 10 mM

2- SDS: Sodium Dodecyle Sulfate

RICEST© RICEST© RICEST©

با محتوی آن برای هموژنه شدن در بن ماری ۵۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد.

بعد از این مرحله مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل به میکروتیوب اضافه شد و به مدت یک تا یک و نیم ساعت بر روی روتاتور قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه گردانده شد که در نتیجه آن در داخل میکروتیوب ۲ فاز تشکیل شد که فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل و به آن ۵۰۰ میکرولیترکلروفرم اضافه شد. بعد از بهم زدن و مخلوط کردن آن، به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه روی روتاتور گذاشته شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور گردانده شد.

در این مرحله دو فاز در میکروتیوب ایجاد شد که با دقت کافی فار رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و به آن ۸۰۰ میکرولیتر الکل مطلق و ۴۰ میکرولیتر محلول استات سدیم اضافه گردید. با ظاهر شدن DNA به صورت هاله ابری شکل، به مدت ۱۵ دقیقه نمونه‌ها با سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه گردانده شدند. در نتیجه آن رسوب شیری رنگی در ته میکروتیوب باقی ماند که متعاقب آن محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده الکل اتیلیک ۷۰ درصد به میزان ۵۰۰ میکرولیتر اضافه و به مدت ۲ دقیقه سانتیریفیوژ شد. مجدداً محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده الکل ۷۰ درصد اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته شد تا رسوب کاملاً خشک شود.

پس از آنکه رسوب DNA خشک شد مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۴ میکرولیتر RNAase به آن اضافه شد و در بن ماری ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا DNA در آب مقطر حل شود و RNAase موجب حذف RNAهای موجود در محلول شود. DNA بدست آمده برای استفاده طولانی مدت در ۲۰- درجه سانتیگراد و برای استفاده روزانه در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

با استفاده از ژل آگارز و انجام الکتروفورز افقی که طرز تهیه ژل و استفاده از دستگاه الکتروفورز در Rezvani Gilkolaei در سال ۱۹۹۷ شرح داده شده است، پس از مخلوط کردن ۳ تا ۵ میکرولیتر از DNA با ۲ میکرولیتر Loding buffer به چاهکهای فوقانی ژل آگارز تزریق شدند. پس از آن تانک الکتروفورز به دستگاه EPS با جریان ۶۵ تا ۷۰ ولت وصل و مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از دستگاه UV که براساس خاصیت فلورسانس کار می‌کند کیفیت DNA بدست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت. به موازات استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز، کمیت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

توالی نوکلئوتیدهای سیتوکروم b مربوط به گونه *Rutilus rutilus caspicus* از طریق پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد و با استفاده از توالی این ژن که دارای ۱۱۴۱ bp بود (Zardoya, 1998) پرایمر Forward از باز شماره ۱ الی ۲۲ و پرایمر Reverse از باز شماره ۱۰۹۸ الی ۱۱۱۷ انتخاب گردیدند که توالی دو پرایمر بصورت زیر است:

Primer Forward : 5´-ATG GCA AGC TAC GAA AAA CCC-3´

Primer Reverse : 5´-CCA CTC ATC CGT CTA GTG GG-3´

این جفت پرایمرها توسط شرکت MWG Biotech در آلمان تولید گردید.

برای تکثیر ژن سیتوکروم b از روش PCR استفاده گردید مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از DNA که قبلاً استخراج شده و همچنین ۲ پرایمر هر کدام با غلظت ۳۰ تا ۴۰ پیکومول به میزان ۲ میکرولیتر، بافر PCR (10x) به میزان ۶ میکرولیتر، dNTP (10 mM) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، Taq DNA polymerase (Unite 1) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (غلظت ۱/۵ mMol) به میزان ۱/۵ میکرولیتر و آب مقطر به حد کافی تا حجم واکنش به ۵۰ میکرولیتر برسد. سپس تیوب حاوی این واکنش داخل دستگاه Thermal cycler قرار گرفت که برنامه زمان و دمای آن بشرح زیر بود:

	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
Deneturing	۹۴	۵۸ ثانیه
Anealing	۴۷ در کلمه و سفید ۵۵ در سس ۵۸ در ماش و سیم برای تمام گونه‌ها ۳۰ چرخه	۵۸ ثانیه
Extension	۷۲	۱دقیقه و ۳۰ ثانیه

محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد با دستگاه UV از نظر کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

با استفاده از نرم افزار DNAsis لیست آنزیمهایی که در محدوده بازهای آلی در توالی ژن سیتوکروم b جایگاه اختصاصی دارند، مشخص گردید. با استفاده از ۵ آنزیم *Hinc II* , *Hha I* , *Hinf I* , *Mbo I* و *RSa I* در بررسی مقدماتی مشخص گردید که نیاز به استفاده از سایر آنزیم‌ها نمی‌باشد.

جهت هضم آنزیمی بسته به غلظت محصول PCR مقدار ۴ تا ۸ میکرولیتر را با مقدار مشخصی آنزیم و بافر آن، طبق توصیه شرکت سازنده در داخل میکروتیوبهای ۵۰۰ میکرولیتری مخلوط شده و با افزودن آب مقطر استریل حجم واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس میکروتیوبها در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت نگهداری شد تا آنزیم عمل کند. کیفیت و کمیت عمل هضم آنزیمی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تهیه ژل پلی اکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره به روش بیان شده در Rezvani Gilkolaei (1997) انجام پذیرفت. آنالیز در این تحقیق به تفکیک آنزیمهایی است که دارای الگوهای پلی‌مورفیسم در پروفیل ژل پلی‌اکریل آمید در اثر الکتروفورز بودند و همینطور اندازه‌گیری قطعات DNAmt بر اثر هضم آنزیمی بوجود آمدند.

نتایج

روش فنل کلروفرم برای استخراج DNA در ۵ گونه ماهی از خانواده کپور ماهیان دریای خزر روش مناسبی بود که DNA استخراجی دارای کیفیت مناسب بود که شکل ۱ نمونه‌ای از آنرا نشان می‌دهد.

پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن سیتوکروم b برای ۵ گونه ماهی سفید، ماش، سیم، سس ماهی بزرگ سر و ماهی کلمه دارای توالی مناسب برای amplification ژن مذکور در تمام ۵ گونه بوده است و در تمام ۵ گونه مورد بررسی اندازه ژن مورد نظر یکسان بوده است (شکل ۲) و اندازه آن تقریباً ۱۱۱۷bp بوده است.

۵ آنزیم محدود الاثر *Hha I* ، *Hinc II* ، *Hinf II* ، *Mbo I* و *Rsa I* با نشان دادن ژنوتیپ‌های مختلف موجب آشکارشدن پلی مورفیسم بین گونه‌های مورد تحقیق گردیدند.

آنزیم *Hinf II* نیز ۵ نوع ژنوتیپ A ، B ، C ، D و E را نشان داد. بطوریکه نمونه‌های سس ماهی بزرگ سر ژنوتیپ A، در ماهی کلمه ژنوتیپ B، در ماهی سیم ژنوتیپ C، در ماهی ماش ژنوتیپ D و در ماهی سفید ژنوتیپ E را نشان داد (شکل ۱).

آنزیم *Hha I* در هضم نمونه‌های ژن سیتوکروم b در ۵ گونه از ماهی مورد بررسی پنج نوع ژنوتیپ A ، B ، C ، D و E را نشان دادند. بطوریکه در ماهی سس بزرگ سر ژنوتیپ A و در ماهی کلمه ژنوتیپ B، در ماهی سیم ژنوتیپ C، در ماهی ماش ژنوتیپ D و در ماهی سفید ژنوتیپ E را نشان داد (شکل ۲).

آنزیم *Mbo I* نیز در این بررسی ۵ ژنوتیپ A ، B ، C ، D و E را نشان داد. بنحویکه در سس ماهی بزرگ سر ژنوتیپ A، در ماهی کلمه ژنوتیپ B، در ماهی سیم ژنوتیپ C، در ماهی ماش ژنوتیپ D و در ماهی سفید ژنوتیپ E را نشان داد (شکل ۳).

آنزیم *Rsa I* نیز مشابه سه آنزیم یاد شده ۵ ژنوتیپ از خود نشان داد بطوریکه در سس ماهی بزرگ سر ژنوتیپ A، در کلمه ژنوتیپ B، در ماهی سیم ژنوتیپ C، در ماهی ماش ژنوتیپ D و در ماهی سفید ژنوتیپ E را نشان داد (شکل ۴).

و بالاخره آنزیم *Hinc II* بر خلاف آنزیم‌های یاد شده، فقط ۳ ژنوتیپ A ، B و C را برای ۵ گونه ماهی مورد نظر نشان داد بنحویکه در سس ماهی بزرگ سر ژنوتیپ A و در سه گونه کلمه، ماش و ماهی سفید مشترکاً ژنوتیپ B و در گونه سیم ژنوتیپ C را نشان داد (شکل ۵). قابل ذکر است این آنزیم با ویژگی خود بعنوان نشانگر ژنتیکی منظور نشده است و تنها ۴ آنزیم یاد شده بدلیل آنکه هیچ شباهت الگویی در بین گونه‌ها نشان ندادند و شباهت صد در صد در داخل گونه داشتند و تفاوت صد در صد بین گونه‌ها از خود نشان دادند، بعنوان نشانگر ژنتیکی معرفی می‌شوند.

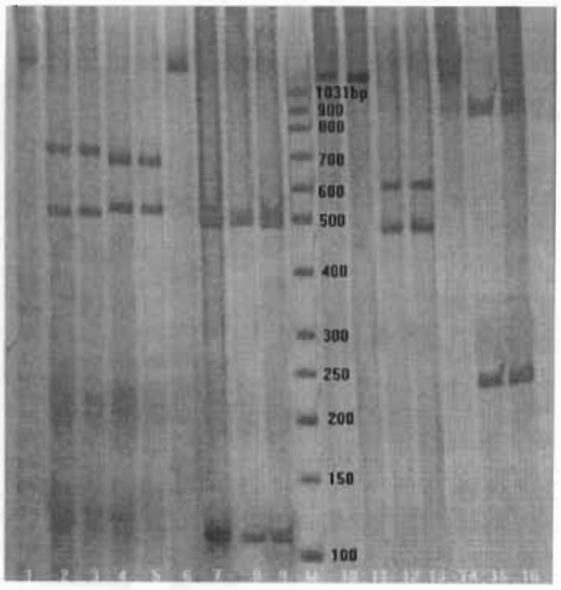
RICEST© RICEST© RICEST©

جدول ۱ : هاپلوتیپ ناشی از هضم آنزیمی روی ۵ گونه از کپورماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر

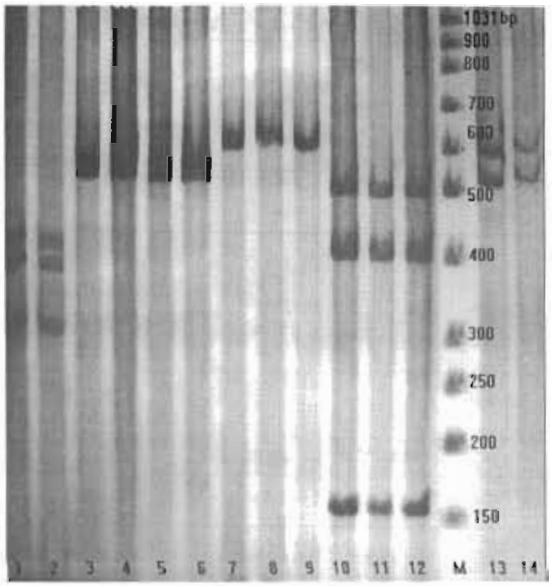
گونه ماهی	هاپلوتیپ	*Hinc II*	*Rsa I*	*Mbo I*	*Hinf II*	*Hha I*
سس بزرگ سر	AAAAA	A	A	A	A	A
کلمه	BBBBB	B	B	B	B	B
سیم	CCCCC	C	C	C	C	C
ماش	DDDDB	B	D	D	D	D
ماهی سفید	EEEEB	B	E	E	E	E

جدول ۲: تعداد و اندازه باندهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR

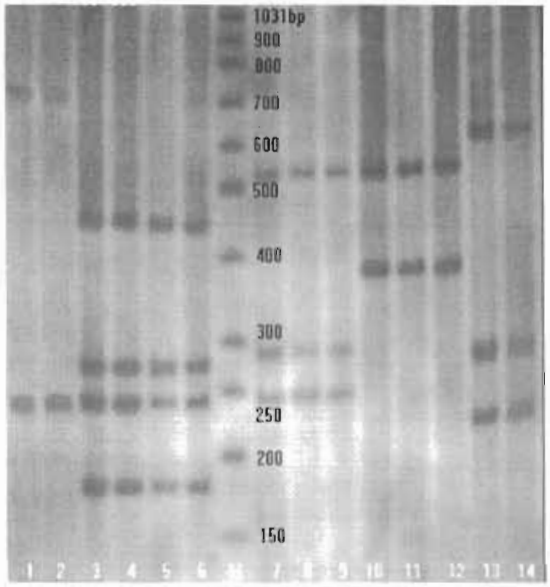
آنزیم	تعداد و اندازه باندها				
	سس بزرگ سر	کلمه	سیم	ماش	ماهی سفید
Hha I	۳۰۰-۳۹۰-۴۲۷	۵۳۵-۵۸۲	۵۰۷-۶۱۰	۱۶۷-۴۲۵-۵۲۵	۵۱۷-۶۰۰
Hinf I	۴۸۷-۶۳۰	۱۱۰-۴۹۵-۵۱۲	۴۵۷-۶۶۰	۲۵۰-۸۶۷	۴۹۵-۶۲۵
Mbo I	۲۴۵-۸۷۲	۱۷۵-۲۳۵-۲۶۵-۴۴۲	۲۵۰-۲۹۰-۵۷۷	۴۲۰-۶۷۹	۲۴۰-۲۹۴-۵۸۳
Rsa I	۱۶۷-۴۱۰-۵۴۰	۲۶۷-۴۰۰-۴۵۰	۴۱۷-۷۰۰	۳۱۷-۳۵۰-۴۵۰	۱۱۱۷
Hinc II	۱۱۷	۶۴-۱۵۳-۹۰۰	۱۵۵-۹۶۲	۱۵۵-۹۶۲	۱۵۵-۹۶۲



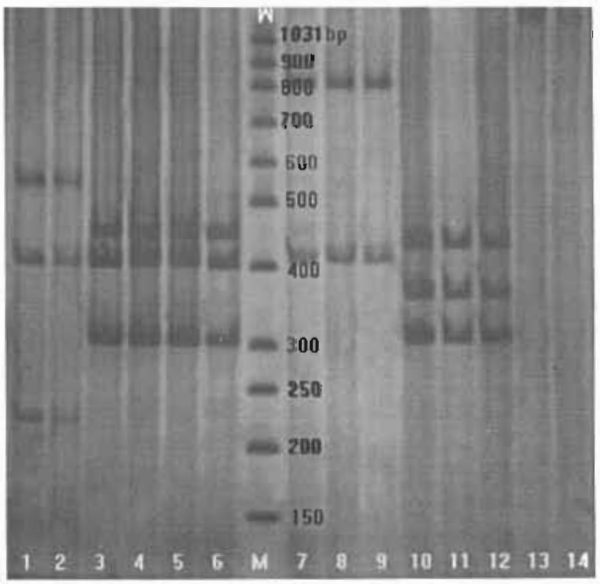
شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR هضم شده توسط آنزیم ***HinfI*** با ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد، ستون ۱ PCR ماهی سس، ستون ۲-۳ ماهی سس، ستون ۴-۵ ماهی سیم، ستون ۶ PCR ماهی سیم، ستون ۷-۹ ماهی کلمه، ستون ۱۰ PCR ماهی کلمه، ستون ۱۱ PCR ماهی



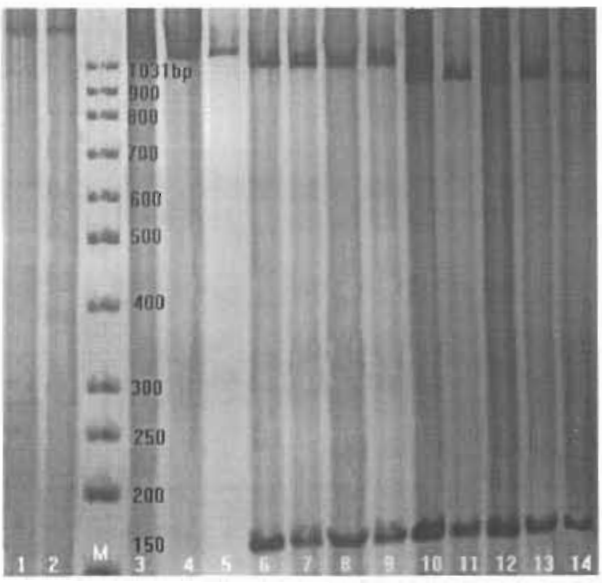
شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR هضم شده توسط آنزیم *HhaI* با ژل پلی آکریل آمید ٦ درصد، ستون ۱-۲ ماهی سس، ستون ۳-٦ ماهی کلمه، ستون ۷-۹ ماهی سیم، ستون ۱۰-۱۲ ماهی ماش، ستون ۱۳-۱٤ ماهی سفید، ستون M مارکر



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR هضم شده توسط آنزیم *MboI* با ژل پلی آکریل آمید ٦ درصد، ستون ۱-۲ ماهی سس، ستون ۳-٦ ماهی کلمه، ستون ۷-۹ ماهی سیم، ستون ۱۰-۱۲ ماهی ماش، ستون ۱۳-۱٤ ماهی سفید، ستون M مارکر



شکل ٤: الکتروفورز محصول PCR هضم شده توسط آنزیم *RsaI* با ژل پلی آکریل آمید ٦ درصد، ستون ۱-۲ ماهی سس، ستون ۳-٦ ماهی کلمه، ستون ۷-۹ ماهی سیم، ستون ۱۰-۱۲ ماهی ماش، ستون ۱۳-۱٤ ماهی سفید، ستون M مارکر



شکل ۵ : الکتروفورز محصول PCR هضم شده توسط آنزیم *HincII* با ژل پلی آکریل آمید ٦ درصد، ستون ۱-۲ ماهی سس، ستون ۳-٦ ماهی کلمه، ستون ۷-۹ ماهی سیم، ستون ۱۰-۱۲ ماهی ماش، ستون ۱۳-۱٤ ماهی سفید، ستون M مارکر

RICEST© RICEST© RICEST©

بحث

در بررسی که توسط Zardoya و Doadrio در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت، رابطه خویشاوندی ۵۲ زیر گونه از کپور ماهیان یونان مطالعه شد. استفاده از توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b، پلی مورفیسم و اختلاف معنی‌داری را بین اجداد کپور ماهیان یونان، دانوب و جنوب مدیترانه نشان داد درحالیکه این ژن قادر نبود نتایج مشابه را در کپور ماهیان اروپا نشان دهد.

استفاده از ژن سیتوکروم b در بررسی جمعیت *Barbus capito* در حوضه جنوبی آبهای دریای خزر توسط لالویی (۱۳۷۹) انجام پذیرفت. این ژن قادر به تمایز جمعیت‌ها در گونه مذکور نبوده است.

علاوه بر این Durand و همکاران (۲۰۰۲) مطالعات فایلوژنی گونه‌هایی از کپور ماهیان شامل سیم، ماش، سس، سیم پرک، سیاه ماهی، سیاه کولی، کپور و سفید رودخانه‌ای را با استفاده از ژن سیتوکروم b در مناطقی از خاور میانه انجام داده‌اند. در این مطالعه ۵۳۴ سایت مورد مطالعه قرار گرفت که تمامی آنها ژنوتیپ‌های متفاوتی را نشان دادند. اختلاف نوکلئوتیدها بین ۰/۴ تا ۲۹ درصد متغیر بود و میانگین نسبت Ts/Tv در کل نوکلئوتیدها ۲/۱۵۱ بود.

رضوانی گیل‌کلائی در سال ۱۳۸۰ با استفاده از ژن سیتوکروم b توانست هاپلوتیپ‌های اختصاصی را در ذخایر میگوی ببری در آبهای خلیج فارس و دریای عمان معرفی نماید و در بررسی دیگر با روش مشابه رضوانی گیل‌کلائی (۱۳۸۰) توانست نشانگرهای ژنتیکی را برای ۳ گونه از میگوی خانواده پنائیده معرفی نماید. در حالیکه بررسی مشابه در گونه‌های لابستر ایران در دریای عمان برای تمایز جمعیت‌ها مفید نبود اما برای تمایز بین گونه‌ها بسیار مفید بوده است (اردلان، ۱۳۸۰؛ محمدی کاشانی، ۱۳۸۱).

بطور کلی روش PCR-RFLP روش مفیدی برای مطالعات سیستماتیک و تعیین گونه شناخته شده است (Chow & Inoue, 1993). آنالیز mtDNA می‌تواند تفاوتهای ژنتیکی را که ممکن است بین گونه‌ها یا جمعیتهای درون یک گونه وجود داشته باشند، را آشکار سازد و بنابراین از توان قابل ملاحظه ای جهت حل تناقص‌های رده‌بندی آبزیان برخوردار می‌باشد (Avise, 2000 ; Nguyer & Ngo, 2001).

در این بررسی نیز چهار آنزیم *Hha I*، *Hinf II*، *Mbo I* و *Rsa I* بدون هر گونه باند مشترک بین ۵ گونه ماهی سس بزرگ سر، کلمه، سیم، ماش و سفید ژنوتیپ A و B و C و D و E را بترتیب در ۵ گونه مذکور نشان دادند. انجام آزمایش هضم آنزیمی با هر یک از آنزیمهای *Hha I*، *Hinf II*، *Mbo I* و *Rsa I* روی محصول PCR ناشی از دو پرایمر مورد استفاده در این تحقیق بطور انفرادی اگر ژنوتیپ A را نشان دهند نمونه مورد آزمایش از بین ۵ گونه ماهی مورد نظر، گونه سس ماهی بزرگ سر و اگر ژنوتیپ B را نشان دهد، گونه کلمه، اگر ژنوتیپ C را نشان دهد گونه سیم، اگر ژنوتیپ D را نشان دهد گونه ماش و اگر ژنوتیپ E را نشان دهد گونه ماهی سفید خواهد بود. حال اگر روی محصول PCR مورد تحقیق چهار آنزیم فوق را بکار ببریم و ژنوتیپ‌های ناشی از هضم آنزیمی در کنار هم قرار دهیم هاپلوتیپ‌های AAAA برای سس ماهی سر بزرگ، BBBB برای ماهی کلمه و CCCC برای ماهی سیم و DDDD برای ماهی ماش و نهایتاً EEEE برای ماهی سفید بعنوان نشانگرهای ژنتیکی بدست خواهد آمد.

آنزیم *Hinc II* بدلیل دارا بودن ژنوتیپ مشترک با دیگر گونه‌ها دارای ارزش نشانگری مشابه چهار آنزیم یاد شده نمی‌باشد هر چند که در بررسی روابط خویشاوندی (فایلوژنی) دارای ارزش زیادی می‌باشد. نتیجه اینکه روش PCR-RFLP و استفاده از ژن سیتوکروم b روش مناسبی در تمایز گونه‌هاست که حتی قادر است دو گونه نزدیک بهم *Rutilus frisii kutum* و *Rutilus rutilus caspicus* را از هم متمایز نماید. اما در بررسی جمعیت گونه *Barbus capito* دریای خزر دارای کارایی کافی نبوده است (لالویی، ۱۳۷۹) و این مطالب با نتایجی که Lin و همکاران در سال ۲۰۰۲ در خصوص قابلیت توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b در شناسایی و تمایز گونه ها بدست آورد کاملاً مطابقت دارد. قابل ذکر است که سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است. ژن‌های rRNA و tRNA نسبت به سایر قسمتها محفوظتر و ناحیه D-loop منطقه‌ای است که بیشترین تغییر را دارا می‌باشد. این ناحیه تنوع کافی با قابلیت تمایز زیاد را در سطح جمعیت نشان می‌دهد (Beckenbach, 1991). همچنین ژن سیتوکروم b دارای محلهای اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی است که از نظر مورفولوژی خیلی بهم نزدیک هستند (Zardoya, 1998). در این تحقیق نیز به اثبات رسیده است که ژن سیتوکروم b، یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌شود و این نتیجه

با آنچه که Meyer و Zardoya در سال ۱۹۹۶ و Rezvani Gilkolaei در سال ۲۰۰۰ بدست آورده‌اند، مطابقت دارد.

لذا پیشنهاد می‌شود این نشانگر روی سایر گونه‌های خانواده کپور ماهیان در ابتدا و سپس روی سایر خانواده‌های ماهیان دریای خزر مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اهمیت این ژن با آنزیمهای مورد استفاده در این تحقیق برای تمایز جمعیت گونه‌های مختلف از خانواده کپور ماهیان دریای خزر و آبهای ایران مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

اردلان، م. ، ۱۳۸۱. مطالعه فیلوژنتیکی گونه‌های لابستر ایران با استفاده از روشهای مورفولوژی و مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران. ۱۲۸ صفحه.

رضوانی گیل کلائی، س. ، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I(COI) به روش RFLP. مجله علمی شیلات، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۰، صفحات ۱۵ تا ۳۰.

شریعتی، الف. ، ۱۳۷۲. ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن. انتشارات فرهنگ و ارشاد اسلامی. صفحات ۴۰ تا ۴۵.

لالوئی، ف. ، ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استانهای گیلان و مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس. ۶۶ صفحه.

محمدی کاشانی، ق. ، ۱۳۸۱. مطالعه جمعیتی شاه میگو گونه *Panulirus homarus* با استفاده از آنالیزهای عددی و مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران.۱۱۲ صفحه.

Avise, J.C. ; Bermingham, E. ; Kessler, G. and Saunders, N.C. , 1984. Characterisation of mitochondrial DNA variability in hybrids warm between subspecies of blue gill, Sunfish (*Lepomis macrochirus*). Evolution. Vol. 38, pp.931-941.

Avis, J.C. , 2000. Phylogeography; The history and formation of species. Harvard University Press. USA. 447P.

Beckenbach, A.T. , 1991. Rapid mtDNA sequence analysis of populations using polymeras chain reaction. Can. J. Fish. Aqua. Sci.Vol.48, pp.125-134.

Berrebi, P. , 1995. Speciation of the genus Barbus in the North Mediterranean basin : recent advances from biochemical genetics. Biological conservation. Vol. 72, pp.237-249.

Bowen, B.W. and Avise, J.C. , 1990. Genetics structure of Atlantic and Gulf of Mexico population of sea bass, menhaden and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life history. Patterns, Mar. Biol. Vol. 107, pp.371-381.

Brown, J.R. ; Beckenbech, A.T. and Smith, M.J. , 1992. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in population of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*).Genetics. Vol. 132, pp.221-288.

Chow, S. and Inoue, S. , 1993. Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus tuna* species. Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish, Enyosuikenho. Vol. 30, pp.207-225.

Cronin, M.A. ; Hilis, S. ; Born, E.W. and Potton, J.C. , 1994. mtDNA variation in Atlantic and Pacific Walruses.Can. J. ZOOL. Vol. 72, pp.1035-1043.

Durand, J.D. ; Tsigenopoulos, C.S. ; Unlu, E. and Berrebi, P. , 2002. Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from Cytochrome b DNA- evolutionary significance of this region. Molecular Phylogenetics and Evolutionol. Vol. 22, No. 1, January, pp.91–100.

Graves, J.E. ; Ferris, S.D. and Dizon, A.E. , 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelasmis*) demons-

RICEST© RICEST© RICEST©

trateed with restriction endonuclease analysis of mtDNA.Mar. Biol. Vol. 79, pp.315-319.

Guenette, S. ; Fortin, R. and Rassart, R. , 1993. Mitochondrial DNA in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and James Bay drainage basins in Quebec,Canada. Can. J. Fish. Aqu. Sci. Vol. 50, pp.659-664.

Hynes, A. ; Ferguson, A. and Mccann, M.A. , 1996. Variation in mtDNA and post-glacial clonisation of northestern Europe by brown trout. Journal of Fish Biology. Vol. 48, pp.54-61.

Lin, Y.S. ; Poh, Y.P. ; Lin, S.M. and Tzeng, C.S. , 2002. Moleculos techniques to ldantify fresh watres eels: RFLP analyses of PCR amplified DNA fragments and Allele-specific PCR from mtDNA. Zoological studies. Vol. 41, No. 4, pp.421–430.

Meyer, A. and Zardoya, R. , 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molec. Bioi. Evol. Vol. 13, pp.933-942.

Nguyan, V.H. and Ngo, S.V. , 2001. Vietnamese freshwaters fish, Cyprinid family. Agriculture Publish House. Hanoi, Vietnam. pp.584-70.

Ovenden, J.K. and White, R.W.G. , 1990. Mitochondrial and Allozyme genetics of incipient speciation in a landlocked population of Galaxias truttaceus (Pices: Galaxiidae). Genetics. Vol. 124, pp.701-716.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetics analysis of s-rgen stocks from the south Caspian Sea. Ph.D. thesis, school of Biological Sciences, University of Wales, Swan Sea. 260P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular Population; Genetic studies of sturgeon species in the South Caspian Sea. Ph.D. thesis. School of Biological Science, Uuniversity of Wales, Swan Sea.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1999. Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequence of mtDNA from ND5/6 gene region in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from Southern Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 1, No. 1, pp.24-34.

Rezvani Gilkolaei, S. , 2000. Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from southern Caspian Sea using RFLP analysis of PCR amplified ND5/6 gene region. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 2, No. 1, pp.13-36.

Smith, P.G. ; Birley, A.J. ; Jamieson, A. and Bishop, C.A. , 1989. Mitochondrial DNA in the Atlantic Cod *Gadus morhua*: Lack of genetic divergence between eastern and western populations. Journal of Fish Biology. Vol. 34, pp.369-373.

Zardoya, R. , 1998. Phyogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implication. Proc.R.Soc.Land. Vol. 265, pp.1365-1372.

Zardoya, R. and Doadrio, I. , 1998. Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: molecular evidence for the Greek cyprinid fauna. Mol. EV. Vol. 11, No. 1, pp.122-131.

Introducing genetic markers to identify and distinguish five species of Cyprinidae in the Caspian Sea using PCR-RFLP

Rezvani Gilkolaei S.[(1)*] ; Laloei F.[(2)] ; Aghilei R.[(3)] and Ebrahimzadeh Mosavi H.A.[(4)]

Rezvani@ifro.ir

1-Iranian Fisheries Research Organization P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

2,3 - Caspian Sea Ecology Research Center P.O.Box: 961 Sari, Iran

4- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran

Received: July 2005 Accepted: May 2006

Keyword: Cyprinidae, Molecular Marke, PCR-RFLP, Caspian Sea

Abstract

Cyprinids are the main and most significant bony fishes found in the Caspian Sea. In this study, 15 specimens of *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901), 10 specimens of *Barbus capito* (Gueldenstaedtii, 1772), 10 specimens of *Bream Abramis brama* (Linnaeus, 1785), 10 specimens of Redlip, *Aspius aspius*, and 15 specimens of Kora volba, *Rutilus rutilus caspius*, were collected from commercial catch stations. DNA from all specimens was extracted using the phenol-chloroform method in 500µl tubes and amplified using PCR method with a pair of primers with cytochrom b gene sequence of Kora volba.

For RFLP analysis, PCR products of cytochorome gene b (1117 bp) from each species were digested with five restriction enzymes under suitable conditions of incubation. DNA bands were visualized by gel electrophoresis (polyacrylamide) and staining with silver nitrate. Five enzyme *Rsa I*, *Hinf I*, *Hha1*, *Hinc II*, and *Mbo I* showed polymorphism. Genotypes obtained from digestion of enzymes *Rsa I*, *Hinf I*, *Hha I* showed haplotypes AAAAA for *Barbus capito*, BBBB for *R. rutilus caspius*, CCCC for *Bream Abramis brama*, DDDD for *Aspius aspius* and EEEE for *R. frisii kutum*. Each of these haplotypes serves as a genetic marker for the species and is of significant importance in distinguishing them.

* **Corresponding author**