magiran.com

بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر بروش *PCR - RFLP*

فرامرز لالونی[۱]، سهراب رضوانی[۲] و محمد پورکاظمی[۳]

laloei@yahoo.com

۱ - بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

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

۳ - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۸۱

چکیده

در این بررسی ۶۰ عدد ماهی از گونه *Barbus capito* از دریا و رودخانه‌های استان مازندران و گیلان جمع آوری گردید. DNA با روش فنل -کلروفرم از بافت باله این ماهی استخراج شد. براساس توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ماهی *Barbus capito* یک جفت پرایمر طراحی گردیده و PCR[۱] با ۶۰ نمونه ماهی و با برنامه مناسب انجام شد که در نتیجه آن محصول PCR، ۱۰۶۲bp از نمونه‌ها بدست آمد. جهت انجام آنالیز RFLP[۲] ازآنزیم‌های *AvaI, HpaII, RsaI, Sau3AI, HaeIII, TaqI, AluI, HinfI, DdeI, HincII* برای هضم محصول PCR استفاده شد. الگوهای هضم آنزیمی با ژل پلی‌اکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید. این الگوها برای تمام نمونه‌ها مشابه بود. براین اساس می‌توان گفت که پدیده پلی‌مورفیسم با استفاده از آنزیم‌های فوق و ژن سیتوکروم b میتوکندری در ماهی *B. capito* قابل مشاهده نبوده و جمعیتی قابل جداسازی تشخیص داده نشد و تمام افراد، از ژنوتیپ هموژن برخوردار بودند.

لغات کلیدی: mtDNA, RFLP, PCR, *Barbus capito*، تنوع ژنتیکی، دریای خزر، ایران

1- Polymerase Chain Reaction

2- Restriction Fragment length polymorphism

magiran.com

مقدمه

اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی‌پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه‌های بومی ، مورد مطالعه قرار گرفته باشند. اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها می‌باشد که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه‌ها حائز اهمیت است.

سس ماهیان از ماهیان اقتصادی ایران می‌باشند که از اهمیت خاصی برخوردار هستند. از این ماهی‌ها تاکنون ۸۰۰ گونه در جهان شناسایی شده است (Howes, 1987) که ۱۵ گونه در ایران یافت می شود (رامین، ۱۳۷۸).

گونه *Barbus capito* در رودخانه های کورا، ارس، سفیدرود، گرگانرود و اترک وجود دارد. ماهی *B. capito* در اندازه‌های متوسط و نسبتاً بزرگ در دریای خزر و تالاب انزلی و رودخانه‌ها صید می‌شود. بعنوان مثال صید آن در سال ۱۳۷۷ در دریا و تالاب انزلی در حدود ۳۰ تن گزارش شده است (رامین، ۱۳۷۸) و نمونه‌هایی با طول ۸۰ سانتیمتر در رودخانه سردآبرود صید شده است (عبدلی، ۱۳۷۳).

مواد ژنتیکی اعم از کروموزومی یا خارج از کروموزومی در معرض تغییرات و جهش‌های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون سلول و یا بیرون از ارگانیسم، در هنگام همانندسازی سبب جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند. ژنوم میتوکندری بعنوان یک نشانگر ژنتیکی بطور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی بکار می‌رود(Hynes *et al.*, 1996 ; Ovenden, 1990)

اندازه mtDNA در اکثر ماهیان حدود ۵۰۰±۱۶۵۰۰ جفت باز می‌باشد (Rezvani Gilkolaei, 1997). در گونه‌های جانوری، ژنوم میتوکندری دارای ۳۷ ژن می‌باشد که عبارتند از ۱۳ ژن رمز دهنده پروتئین، ۲۲ ژن tRNA، ۲ ژن rRNA و یک ناحیه بعنوان آغاز همانندسازی یا D-loop (Rezvani Gilkolaei, 1997). در مطالعات مختلف دو منشاء پدری و مادری برای mtDNA ثابت شده است. هر چند که ژنوم میتوکندری جانوری اغلب منشاء مادری دارد (Avise *et al.*, 1989 ; Gyllensten *et al.*, 1991)، ولی منشاء پدری ژنوم میتوکندری دردروزوفیلا

magiran.com

و موش گزارش شده‌است (Kondo *et al.*, 1990 ; Gyllensten *et al.*, 1991).

باتوجه به اینکه میتوکندری منشأ مادری دارد و نوترکیبی در آن انجام نمی‌گیرد، لذا این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است. از اینرو نشانگر خوبی برای تشخیص گروههایی که برای ۱۰، ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند، می‌باشد (Berrebi, 1996). سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است که ۲ درصد تغییر به ازاء هر میلیون سال می‌باشد.

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 ارتباطات فیلوژنی بین گونه هایی‌است که از نظر مورفولوژی خیلی بهم نزدیک هستند. بنابراین این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌گردد (Zardoya & Myer ,1996 ; Briolay *et al.*, 1998).

PCR یا واکنش زنجیره ای پلی مراز ، تکنیکی است که در آن تکثیر قطعه ای از DNA بطور انتخابی به میزان هزار و یا حتی میلیون برابر امکان پذیر می باشد.

آنالیز RFLP ناشی از توانایی یک آنزیم محدود کننده در بریدن جایگاههای اختصاصی از توالی نوکلئوتیدها در DNA است. اگر جهشی در جایگاه برش آنزیم واقع شود، جایگاه اختصاصی نسبت بعمل آنزیم پوشیده می‌شود و عمل آنزیم الگوی جدیدی از قطعات را ایجاد می‌کند، در اینصورت محل شناسایی در توالی DNA چنان تغییر می‌یابد که برش آن توسط آن آنزیم اختصاصی ممکن نیست. این محلها را تحت عنوان، پلی مورفیسم طولی قطعات محدود (RFLP) نامیده‌اند. از مزیت‌های مهم آنالیز RFLP قدرت تشخیص آن می‌باشد و به همین دلیل بعنوان یک تکنیک مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها توسعه یافته است (Chow & Inoue, 1993 ; Cronin *et al.*, 1994).

هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه *B. capito* در هر یک از مناطق نمونه‌برداری

magiran.com

شده و شناخت ذخایر ژنی این گونه با استفاده از روش PCR-RFLP بوده است.

مواد و روشها

در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه گونهٔ *Barbus capito* از استان مازندران (۱۵ نمونه از دریا و ۵ نمونه از هر یک از رودخانه‌های تجن، شیرود و تنکابن) و ۳۰ نمونه از استان گیلان (۱۵ نمونه از دریا، ۷ نمونه از رودخانه حویق و ۸ نمونه از سفیدرود) جمع‌آوری گردید. جهت استخراج، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از باله ماهی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شده است (Pourkazemi, 1996 ; Rezvani Gilkolaei, 1997).

استخراج DNA باروش فنل-کلروفرم‌انجام‌گردیده است (Fevolden & Pogson, 1997 ; Rezvani Gilkolaei , 1997 : Miler *et al.*, 1988) برای این منظور ابتدا مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از باله ماهی را در یک میکروتیوپ ریخته و مقدار ۵۰۰μl STE[1]، ۳۰μl SDS[2] و ۳۰ μl پروتئیناز K به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴ تا ۵ ساعت در بن ماری ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (بهتر است نمونه‌ها به مدت یک شب در این حالت بمانند). سپس مقدار ۵۰۰ μl فنل به آن اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای اتاق روی همزن قرار گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از دو لایه تشکیل شده، لایه رویی به دقت جدا گردید و در یک لوله دیگر ریخته شد. سپس مقدار ۵۰۰μl کلروفرم به آن اضافه گردید و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مجدداً لایه رویی جدا و مقدار ۴۰ μl استات سدیم و ۸۰۰μl الکل مطلق به آن اضافه شد. محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس الکل رویی را دور ریخته و رسوب تشکیل شده که همان DNA است با الکل ۷۰ درجه شستشو داده شد و برای تبخیر کامل الکل، نمونه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داد شد. به رسوب، مقدار ۵۰μl آب مقطر اضافه شد تا DNA حل گردد. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد و

1- Sodium Chloride, Tris, EDTA

2 - Sodium Dodecyl Sulfat

magiran.com

رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید و نیز اشعه uv استفاده گردید و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه گردید.

کمیت و کیفیت محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و استفاده از مارکر (DNA/*Hind III*) بررسی شد.

برای جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر، مولکول mtDNA مورد PCR قرار گرفت که در انجام آن از جفت پرایمرهای سس ماهی استفاده شده است.

توالی پرایمرهای سس ماهی :

پرایمرها از روی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندری ماهی *B. capito* و با استفاده از نرم‌افزار DNAsis طراحی گردید. با استفاده از توالی فوق، ۵ یکی از پرایمرها باز شماره ۹ و ۵ پرایمر دیگرباز شماره ۱۰۷۰ ژن مورد نظر بوده است. تعداد نوکلئوتیدهای هر یک از پرایمرها ۱۸ نوکلئوتید بوده که ترتیب آن شامل :

پرایمر ۱ : *5´ - C T A C G A A A A C A C A C C C - 3´*

پرایمر ۲ : *5´ - A G G G C T G A T G C A A T T T G T - 3´*

با استفاده از این پرایمر محصول PCR قابل پیش بینی ، ۱۰۶۲ bp می‌باشد.

جهت انجام PCR، ابتدا محلول ذیل آماده گردید:

DNA	۱-۵ μl	غلظت ۵۰-۱۰۰ng
Taq DNA Polymerase	۰/۵ μl	
Buffer PCR	۵ μl	
$MgCL_2$	۳ μl	غلظت ۵۰mM
dNTP *	۰/۵ μl	غلظت ۲ mM
Primer(1)	۱/۵ μl	غلظت ۱۰ ng
primer(2)	۱/۵ μl	غلظت ۱۰ ng
d H_2O	33-37 μl	
	۵۰ μl	

* dNTP (dATP - dGTP - dTTP - dCTP)

magiran.com

پس از آماده سازی، محلول فوق درون دستگاه Thermal cycler قرار گرفته و PCR با برنامه ذیل انجام شده‌است.

مرحله اول	تک رشته شدن- مقدماتی	۹۴ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه
۱ چرخه	(Denaturation)		
مرحله دوم			
۳۰ چرخه	(Denaturation)	۹۴ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
	اتصال پرایمر(Annealing)	۵۵ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
مرحله سوم	سنتز DNA (Extention)	۷۲ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
۱ چرخه	(Extention نهایی)	۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه

برای انجام آنالیز RFLPاز آنزیم‌های *Sau3AI, AvaI, AvaII, HinfI, HincII, HpaII, DdeI, HaeIII, RsaI* و *TaqI* استفاده شد. برای این منظور مقدار ۸ μl محصول PCR، ۱ μl آنزیم و ۲μl بافر آنزیم را در یک میکروتیوپ با آب مقطر به حجم ۲۰μl رسانده و به مدت ۳-۲ ساعت درون بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت .

محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی اکریلی آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره همراه با مارکر DNA - Hind III/ X - 174 DNA - HincII مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم به خوبی انجام شده است. با استفاده از پرایمرهای سنتز شده، ناحیه مورد نظر نیز بوسیله تکنیک PCR تکثیر یافت. استفاده از پرایمر سس ماهی منتج به بروز باند DNA در تمام ۶۰ نمونه مورد نظر گردید که اندازه باند این نمونه‌ها مشابه بوده و در حد bp ۱۰۶۲ بوده‌است. برای هضم آنزیمی ۱۰۶۲ جفت باز محصول PCR نمونه‌ها، تعداد ۱۰ آنزیم، شامل *AvaI, Sau3AI, HaeIII, TaqI, AvaII, HinfI, HincII, HpaII, DdeI, RsaI* مورد استفاده قرار گرفت و الگوهای الکتروفورزی با ژل پلی‌اکریل آمید بدست آمد. شکلهای ۱ و ۲ نمونه‌ای از

magiran.com

قرار گرفت و الگوهای الکتروفورزی با ژل پلی‌اکریل آمید بدست آمد. شکلهای ۱ و ۲ نمونه‌ای از الگوهای هضم آنزیمی و جدول ۱ اندازه قطعات ایجاد شده بر اثر عمل آنزیم‌های محدود کننده بر روی هر نمونه را نشان می‌دهد.

جدول ۱ : تعداد و طول قطعات ایجاد شده براثر هضم آنزیمی محصولات PCR

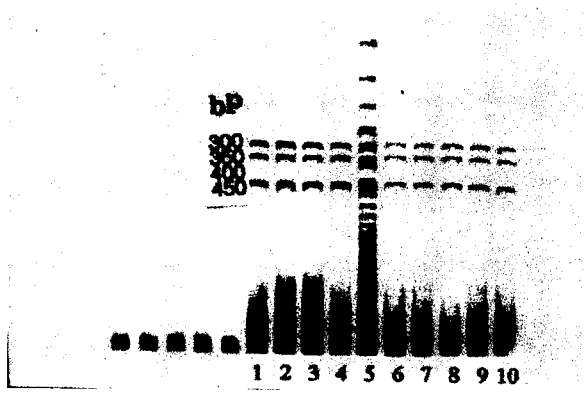
نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات (bp)
Ava I	۳	۲۸۸ ۳۹۲ ۳۸۲
Ava II	۳	۳۴۳ ۴۰۲ ۳۱۷
Dde I	۷	۱۱۲ *۳۰ ۲۷۰ *۷۲ ۱۴۴ ۲۵۸ ۱۷۶
Hae III	۴	۱۳۴ ۱۵۹ ۱۰۵ ۶۶۴
Hinc II	۲	۴۷ ۱۰۱۵
Hinf I	۳	۴۸۰ *۴۲ ۵۴۰
Hpa II	۲	۱۳۲ ۹۳۰
Rsa I	۴	۳۸۶ ۶۳ ۴۴۱ ۱۷۲
Sau3AI	۴	۲۲۶ ۶۱۱ ۱۶۶ *۵۹
Taq I	۲	۶۰۵ ۴۵۷

*** این قطعات بعلت کوچکی در برخی موارد مشاهده نشدند.**

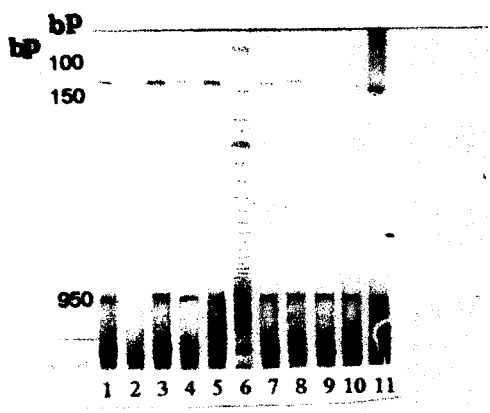
قابل ذکر است که جمع اندازه‌های تمام الگوها برای هر آنزیم bp ۱۰۶۲ می‌باشد.

با توجه به الگوهای هضم آنزیمی، باندهای DNA ایجاد شده برای تمام آنزیمها و برای تمام نمونه‌های DNA مورد استفاده هم اندازه بوده و بیانگر این است که ژن سیتوکروم b مستقر روی mtDNA با این آنزیم‌ها، تنوع ژنتیکی و یا پلی‌مورفیسم بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد بین مناطق مختلف را نشان نمی‌دهد. لذا انجام هر گونه آنالیز آماری برای محاسبه Haplotype diversity یا Nuclutide و رسم درخت خویشاوندی، بین افراد یا گروه‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای اختصاصی برای این منظور مانند برنامه‌های Reap و Phylip امکان‌پذیر نبوده‌است.

magiran.com



شکل ۱: الگوهای هضمی محصول PCR ماهی *Barbus capito* با آنزیم *Ava II* بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید. ستونهای ۱ تا ۴: نمونه‌های رودخانه. ستون ۵: مارکرو ستونهای ۶ تا ۱۰: نمونه‌های دریا



شکل ۲: الگوهای هضمی محصول PCR ماهی *Barbus capito* با آنزیم *Hpa II* بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید. ستونهای ۱ تا ۵: نمونه‌های رودخانه. ستون ۶: مارکرو ستونهای ۷ تا ۱۱: نمونه‌های دریا

magiran.com

بحث

ناحیه‌ای از ژنوم میتوکندری‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفته، ژن سیتروکروم b بوده که هر یک از آنزیم‌ها تنها یک نوع الگوی الکتروفورزی برای تمام نمونه‌ها را نشان دادند و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی مشاهده نگردید. عدم مشاهده پلی‌مورفیسم در نمونه‌های جمع‌آوری شده از چند جهت قابل تفسیر می‌باشد. اول اینکه موانع فیزیکی رودخانه‌ها و دریای خزر و یا موانع زیستی وجود نداشته است که موجب ایجاد تفاوتهای معنی‌داری بین افراد گونه *B. capito* در مناطق مختلف نمونه‌برداری شود و در واقع گروهها از نظر ژنتیکی هموژن و یکنواخت هستند و تفاوتی بین آنها وجود ندارد. البته استفاده از ژنهای دیگر mtDNA و یا استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر و یا تعداد آنزیمهای متنوع‌تر می‌تواند نتیجه دقیق‌تر و شفاف‌تری را نشان دهد. دوم اینکه احتمالاً ژن سیتوکروم b، ژن مناسبی برای بررسی جمعیت سس ماهیان نبوده و نمی‌تواند بخوبی اختلاف بین جمعیت‌ها را نشان دهد. با توجه به اینکه متوسط تعداد نوکلئوتیدهایی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفته است، حدود ۱۱۲bp می‌باشد، در واقع ۹۵ درصد از ژن سیتوکرم b و یا حدود ۱ درصد از کل ژنوم میتوکندری‌ها در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است. به همین منظور جهت اطمینان می‌بایست ناحیه دیگری از ژنوم میتوکندری مثل ناحیه D-loop یا ND5/6 مورد مطالعه قرار گیرد.

Ovenden در سال ۱۹۹۰ مطرح کرد که بطور کلی احتمالاً در ارگانیزمهای دریایی، تنوع mtDNA خیلی کم است و عواملی مانند اثر شرایط نامناسب و محدود و یا مرگ و میرهای فامیلی که به دلایل ویژه‌ای اتفاق می‌افتد، یکی از عوامل بروز اختلافات نوکلئوتیدی می‌باشد (Pourkazemi, 1996).اغلب گزارشات مربوط به آنالیز mtDNA ماهیان، تنوع هاپلوتیپی کمی را نشان می‌دهد و در واقع تعداد هاپلوتیپهایی که وجود دارد، مشتقات جهش یافته می‌باشند (Billington & Hebert, 1991).

استفاده از مولکول mtDNA برای تمایز جمعیت‌های گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر (Rezvani Gilkolaei & Skibinski, 1999 ; Rezvani Gilkolaei, 2000) و یا گونه‌های میگوی خلیج فارس و دریای عمان (رضوانی گیل‌کلایی و همکاران، ۱۳۸۰) دارای نتایج مناسب و قابل قبولی بوده است.

Zardoya و Doadrio در سال ۱۹۹۹ با استفاده از توالی ژن سیتوکروم b ارتباط فیلوژنی ۵۲ زیر گونه از کپور ماهیان یونان را بررسی نمودند و ارتباط فیلوژنی این ماهیان مشخص شده است.

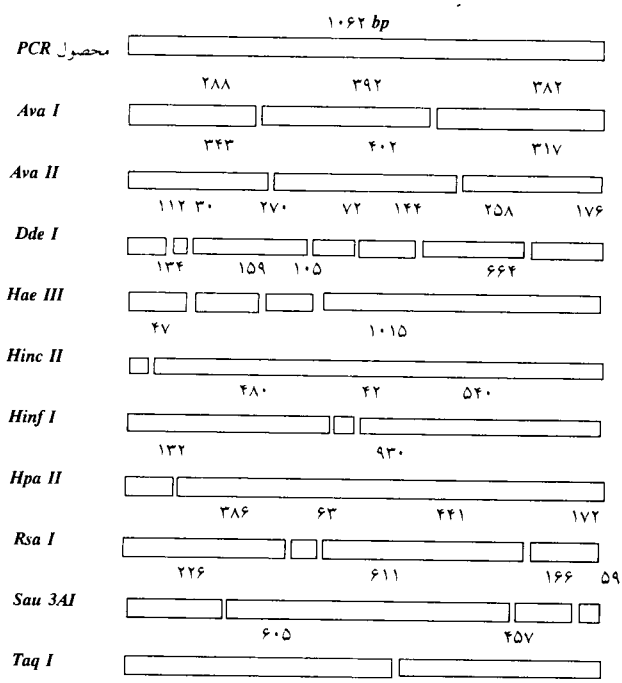
magiran.com

آنها کپور ماهیان را به دو گروه اصلی شامل کپور، goldfish و سس ماهیان و گروه دوم شامل جنسها و گونه‌های :

Leuciscus, Vimba, Tropidophoxinellus, Scardinius, Gobio, Pseudophoxinus, Pachychilon, Alburnus, Chalcalburnus, Leucaspius, Blicca, Abramis, Leuciscus, Rutilus, Phoxinellus, Chondrostoma, Alburnoides species.

در این تحقیق اطلاعات توالی ژن سیتوکروم b برای نشان دادن اختلاف بین اجداد کپور ماهیان یونان، دانوب و جنوب مدیترانه مناسب بوده ولی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b جهت بررسی ارتباط فیلوژنی و ریشه کپور ماهیان اروپا مناسب نبوده و برای این منظور توالی ژنهای دیگر از میتوکندری و ژنهای هسته لازم بود (Zardoya & Doadrio, 1999).

Berrebi در سال ۱۹۹۵ با روش PCR-RFLP و آلوزایم‌ها ۳۱ گونه از باربوس ماهیان شمال مدیترانه را مطالعه و ارتباط بین گونه‌های مختلف را بررسی نمود. قابل ذکر است که گونه *B. capito* در تحقیق فوق مورد بررسی قرار نگرفته است.



شکل ۳: شکل شماتیک تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر روی محصول PCR ماهی *B. capito* توسط آنزیمهای محدود کننده

magiran.com

از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی استاد محترم دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی که با راهنمایی‌های خود و با در اختیار گذاشتن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی موجبات انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر بعمل می‌آید. همچنین از آقای محمد علی افرایی که در نمونه‌برداری ماهیان همکاری نموده‌اند تشکر می‌گردد.

منابع

رامین، م. ، ۱۳۷۸. شناسایی و تعیین پراکنش باربوس ماهیان ایران. پایان‌نامه دکترا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. ۱۷۰ صفحه.

رضوانی گیل‌کلائی، س. ؛ سید علی بابایی، س.ع. و پورکاظمی، م. ، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I بروش RFLP. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال دهم، تابستان ۱۳۸۰، صفحات: ۱۵ تا ۳۰.

عبدلی، الف. ، ۱۳۷۳. هیدرولوژی و هیدروبیولوژی رودخانه سردآبرود. مرکز تحقیقات شیلاتی مازندران. ۴۵ صفحه.

Avise, J.C. ; Helfman, G.S. ; Saunders, N.C. and Heles, L.S. , 1989. Mitochondrial DNA different in North Atlantic eels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 83, pp.4350-4354.

Beckenbach, A.T. , 1991. Rapid mt DNA sequence analysis of populations using the polymerase chain reaction. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol.48,(sappl.1). pp.45-81.

Berrebi, P. , 1996. Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. Biological conservation. Vol. 72, pp.237-249.

Billington, N. and Hebert, P.D.N. , 1991. Mitocondrial DNA diversity in fishes and

magiran.com

Billington, N. and Hebert, P.D.N. , 1991. Mitocondrial DNA diversity in fishes and its implication for introductions. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 48 (supp.1), pp.80-94

Brioly, J. ; Galtiev, N. ; Brito, R.M. and Bouvet, Y. , 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequence. md. phylogenet. Vol.9, pp.100-108.

Chow, S. and Inoue, S. , 1993. Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in Mitochondrial genes of *Thunnus tuna* species. Bull. Nat. Res. Inst. fav sea fish. Vol. 30, pp.207-225.

Cronin, M.A. ; Hilis, S. ; Born, E.W. and Potton, C. , 1994. mtDNA variation in atlantic and pacificwaleruses. Can. 3.200 L.72, pp.1035-1043.

Fevolden, S.E. and Pogson, G.H. , 1997. Genetic divergence at the synaptophysin locus amons Norwegian coastae and noth-east Arctic population of Atlantic cod. Journal of fish Biology. Vol. 51, pp.895-908.

Gyllensten, U. ; Wharton, D. ; Josefsson, A. and Wilson, A.C. , 1991. Patern-alinherilance ofmitochondrial DNA in mice. Nature. Vol. 352, pp.255-257.

Howes, G.J. , 1987. The phylogenetic position of the Yugoslavian Cyprinid fish *Danus gulopyge* Heckel, 1841, with an appraisal of the genus *Barbus* Cuvies and Dopuet, 1816, and thesubfamily cyprinidae. Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. 2ad., Vol. 52, pp.165-96.

Hynes, R.A. ; Ferguson, A. and Mccann, M.A. , 1996. Variation in mtDNA and post-glacialcolonisation of north western Europe by brown trout. Journal of fish

magiran.com

Biology. Vol. 48, pp.54-61.

Kondon, R. ; Satta, Y. ; Matsuura, F.T. ; Ishiwa, H. ; Takahata, N. and Chigusa, S.I., 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in Dtosophila. Genetics. Vol. 126, pp.675-663.

Miller, S.A. ; Dykes, D.D. and Polesky, H.F. , 1988. A simple salting out procedure for entrating DNA from human nuckated cells. Vol. 16, 1215 P.

Ovenden, J.K. and White, R.W.C. , 1990. Mitovhondrial and Allozyme genetics of incipient in a landtocked population of *Galaxias truttaceus* (plces: Galaxidae). Geneics. Vol. 124, pp.701-716.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stock from the south Caspian Sea. School of Biological Scince, University of Wales. 258 P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. School of Biological Sciences, University of Wales. 196 P.

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

Rezvani Gilkolaei, S. and Skibinski, D.O.F. , 1999. Polymerase chain reaction and direct sequencing of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon *Acipenser persicus* from the southern Caspian Sea. Iranian Hournal of Fisheries

magiran.com

Sciences, Vol. 1, No. 1, pp.23-34.

Zardoya, R. and Doadrio, I. , 1999. Moleculas evidence on the evolutionary and biogeraphical patterns of European. J. Mol-Evol. Vol. 4, pp.227-237.

Zardoya, R. and Meyer, A. , 1996. Phylogenetic performan of mitochondrial protein coding genes in resoluing velatioships among vestebrates. Molec. Biol. Evol. Vol. 13, pp.933-942.

Genetic Variation of *Barbus capito* in the Southern Caspian Sea by PCR-RFLP Method

Laloei F.[1] ; Resvani Gilkolaei, S.[2] and Pourkazemi M.[3]

Faloei@yahoo.com

1 - Mazandaran Fisheries Reseach Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

2 - I.F.R.O. P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

3 - International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran

Received : June 2001 Accepted : May 2002

Key words : mtDNA, RFLP, PCR, *Barbus capito*, Genetic variation, Southern Caspian Sea, Iran

ABSTRACT

In this study 60 samples were collected from the southern Caspian Sea and some rivers of Mazandaran and Guilan provinces. Genetic variation and probable population differentiation of *Barbus capito* were studied based on the mitochondrial cytochrom-b gene. The mitochondrial DNA was extracted from fish fin using phenol-chlorophorm method. The specific primers were designed for *B. capito* and the PCR experiments were done on 60 samples. 11 restriction endonuclease enzymes were applied for RFLP analysis (*AluI*, *AvaI*, *AvaII*, *HinfI*, *DdeI*, *HinaII*, *HpaII*, *RsaI*, *Sau3AI*, *HaeIII*, *TaqI*). PCR products (1062 pb) and DNA digests were subjected to agarose and polyacrilamid gel electrophoresis to seperate fragments according to their molecular weight. These patterns were identified similar for all samples. Regarding to this patterns, it can be seen that polymorphysm phenomena cannot be observed by above mentioned enzymes and cytochrome-b gene, and there is no seperate population of *B. capito* in the southern Caspian Sea.