مجله شیلات
سال دوم، شماره سوم، پاییز۸۷

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری (*Neogobius caspius* Eichwald,1831) در حوضه جنوبی خزر به‌روش PCR-RFLP

الهه قطب رزمجو[۱]، سهراب رضوانی[۲]، پرگل قوام مصطفوی[۱]،
سید محمد رضا فاطمی[۱] و محمد پورکاظمی[۳]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم تحقیقات تهران، گروه بیولوژی دریا، [۲]مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، [۳]انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت
*Email:*razmjoo_elahe@yahoo.com

چکیده

گاوماهی خزری منبع غذایی مهمی در دریای خزر می‌باشد. این ماهی غذای عمده ماهیان خاویاری را تشکیل می‌دهد، بدین جهت ساختار ژنتیک جمعیت گاوماهی خزری با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۳۵ نمونه گاو ماهی خزری از ۳ منطقه در طول ساحل حوضه جنوبی دریای خزر که شامل سواحل انزلی، چالوس و بندرترکمن می‌باشد، جمع‌آوری گردید. با استفاده از یک جفت پرایمر که مربوط به توالی نوکلئوتیدهای مجموعه ژن سیتوکروم b، ژن‌های tRNA,2 و ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری که از چند گونه ماهی بدست آمده بود، انتخاب و جهت PCR مورد استفاده قرار گرفت نتایج بدست آمده نشان داد که محصول PCR حدود ۷۰۰bp از نمونه‌ها بدست آمد که جهت انجام آنالیز RFLP از آنزیم‌های ALUI، ALW26، BSeNI، DraI، MboI، RsaI، TasI، HincII، BSURI، Bsh12851، HinII و BSu15I 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. بر این اساس می‌توان گفت که پدیده پلی‌مورفیسم با استفاده از آنزیم‌های فوق در گاوماهی خزری قابل مشاهده نبوده و جمعیتی قابل جداسازی تشخیص داده نشد.

واژه‌های کلیدی: دریای خزر، ژنتیک جمعیت، گاوماهی خزری، PCR، RFLP

مقدمه

تعداد اعضای خانواده گاوماهیان (Gobiidae) تنها اندکی کمتر از کپور ماهیان است. گاوماهیان در سرتاسر جهان هم در آب شیرین و هم آب شور یافت می‌شوند به رغم انتشار وسیع و وفور گونه‌ها به راحتی قابل تشخیص هستند (۳).

در دریای خزر ۱۹ گونه و زیر گونه یافت می‌شود که به ۵ جنس از گاو ماهیان تعلق دارند، ولی بیشتر گونه‌ها از جنس Neogobius هستند، که حدود ١٤ گونه متعلق به این جنس می‌باشند. از جمله گونه متعلق به این جنس، *Neogobius caspius* است (۲) که بومی دریای خزر است و یکی از مهمترین گونه‌های کفزی این دریاچه به شمار می‌رود. همچنین این گونه ساکن آب لب شور می‌باشد و وارد آب شیرین نمی‌شود. از گاوماهیان، ماهیان تجاری با ارزش نظیر تاسماهیان، ماهی سوف و سایرین تغذیه می‌کنند. تاسماهی و فیل ماهی در میان ماهیان خاویاری بیش از سایر گونه‌ها از گاوماهیان تغذیه می‌کنند. زمانی که تاس‌ماهی بطول ۵۰ تا ۹۰ سانتی‌متر می‌رسد، گاوماهیان ۳۸ تا ۷۰ درصد غذای آنها را از لحاظ وزنی تشکیل می‌دهند (۷). همچنین براساس گزارش Grinm (۱۸۷۸)، خزندگانی که زندگی آنها به دریای خزر ارتباط دارد به‌ویژه مارهای آبی نیز از گاوماهیان تغذیه می‌کنند (۱). در خزر میانی و جنوبی در هنگام صید ماهیان اقتصادی نمونه‌های بزرگ گاوماهی صید می‌شوند که برای تولید آرد ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲).

توسعه نشانگرهای ژنتیکی، انقلابی بزرگ در بررسی ژنتیک جانوران بوجود آورده است. با استفاده از نشانگرهای DNA کشف تنوع ژنتیکی در ژنوم جانوران

Archive of SID
www.SID.ir

امکان پذیر شد. نشانگرهای ژنتیک جمعیت در جامعه آبزیان شامل:

ALLozymes، Mitochondrial DNA، RFLP، RAPD، AFLP، Microsatellite و SSCP می‌باشد (۱۵). استفاده از نشانگرهای DNA در تحقیقات آبزیان، تنوع ژنتیکی، همخونی، تعیین والد، تعیین هویت و ترسیم نقشه ژنتیکی را برای گونه‌های آبزیان امکان پذیر ساخت (۱۵). نشانگر RFLP یا پلی‌مورفیسم طولی قطعه محدود شونده در واقع یکی از تکنیک‌های مولکولی مورد استفاده می‌باشد.

آنالیز RFLP براساس توانایی اندونوکلئازهای محدودکننده در شناسایی توالی خاص DNA بنا نهاده شده است. یک جهش نقطه‌ای درون توالی موجب عدم توانایی شناسایی آنزیم و قطع نشدن رشته DNA در آن نقطه می‌گردد (٤).

از مزیت‌های مهم آنالیز RFLP قدرت تشخیص آن می‌باشد و به همین دلیل به‌عنوان یک تکنیک مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها توسعه یافته است. DNA میتوکندریایی در یوکاریوت‌ها در خارج از هسته و درون میتوکندری یافت می‌شود (۹) که به سبب دارا بودن ۵ تا ۱۰ برابر متاسیون در مقایسه با DNA هسته‌ای به‌مولکول ساعت تکامل معروف است و در بررسی‌های خویشاوندی و جمعیت‌شناسی کاربرد وسیع دارند. mtDNA در مهره‌داران حدود ۳۷ ژن را حمل می‌کند که حاوی ۲۲ ژن tRNAs، ۲ ژن rRNAs و ۱۳ ژن mRNAs که کد کننده پروتئین‌ها می‌باشند (۱۱).

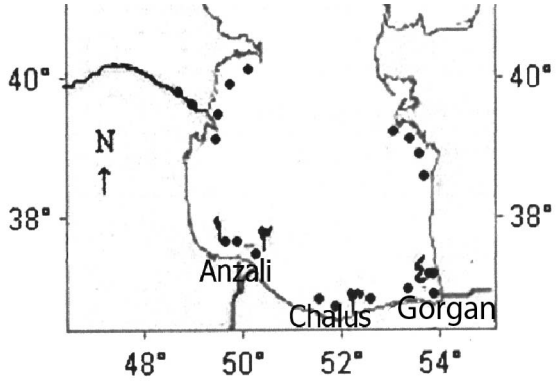
هدف تحقیق حاضر، بررسی ساختار ژنتیک جمعیت گونه *N.caspius* (گاو ماهی خزری) در طول سواحل مناطق گیلان (بندر انزلی)، مازندران (چالوس) و گلستان (بندرترکمن) در حوضه جنوبی دریای خزر به‌روش PCR-RFLP می‌باشد، یا به عبارتی بررسی تفاوت بین جمعیت این گونه در مناطق ذکر شده می باشد.

مواد و روش‌ها

۱۳۵ نمونه گاوماهی خزری صید شده طی بهار ۱۳۸۵ تا تابستان ۱۳۸٦ از سواحل جنوبی دریای خزر در استان‌های گلستان (۳۵ نمونه) مازندران (۵۰ نمونه) و گیلان (۵۰ نمونه) به وسیله چندین ابزار صید که شامل تور پره، تور سالیک و تور ترال بوده است جمع‌آوری شدند (شکل ۱).

سپس نمونه‌ها جهت انجام مراحل آزمایش در الکل اتانل ۹٦ درصد قرار داده شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی خزر واقع در ساری منتقل گردید. در این بررسی، استخراج DNA از روش فنل کلروفروم (١٤)، از باله گاوماهی خزری استفاده شد.

در این روش باله در بافر استاندارد STE (سدیم دو دسیل سولفات) به همراه پروتئیناز K به‌مدت ٢٤ ساعت هضم و سپس خالص‌سازی با استفاده از فنل و کلروفرم انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، در آب مقطر حل گردید.



شکل ۱- حوزه جنوبی دریای خزر و موقعیت مناطق‌نمونه‌برداری نشان داده شده است

Archive of SID

www.SID.ir

کمیت و کیفیت DNA استخراجی به‌ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Biophotometr) (در طول موج ۲٦۰ تا۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز افقی ژل آگارز تعیین گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: جهت تعیین تنوع ژنتیکی در گاوماهی خزری از یک جفت پرایمر برگرفته از مقاله (۱۰) که مربوط به توالی نوکلئوتیدهای مجموعه ژن سیتوکروم b، ۲ ژن tRNA و ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری که از ماهی‌های زیر طراحی شده بودند استفاده شد.

۱- *Crossostoma lacustre* (Tzeng, 1992)، از خانواده سگ ماهیان می‌باشد و در جویبارهای تند آسیای جنوبی سازگاری یافتند.

۲- *Cyprinus carpio* (Cheng, 1994)، کپور معمولی از کپور ماهیان.

۳- *Oncorhynchus mykiss* (Zardoya, 1995)، قزل‌آلای رنگین کمان از خانواده آزاد ماهیان.

٤- *Polypterus ornatipinnis* (Naok, 1996)، بیچرها، از شعاع بالگان می‌باشند.

توالی جفت پرایمر مورد نظر عبارت است از:

R: D2 (5'-CCGGAGTATGTAGGGCA TTCTCAC-3')
F: CY1(5'-YYTAACCRRGACYAATGACTTGA-3')

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتری دستگاه ترموسایکلر Qntabiotec، مدل (Ato-q-Server) در سیکل‌های دمایی، ۹٤ درجه برای ۵ دقیقه (واسرشته شدن اولیه)، ۹٤ درجه ٤۵ ثانیه (واسرشته شدن)، ٥٤ درجه ٤۵ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه ٤۵ ثانیه با تعداد ۳۰ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه برای گونه گاوماهی خزری انجام گرفت. شرایط آزمایشگاهی استفاده شده شامل غلظت $MgCl_2$ مصرفی ۳ mM، dNTP، ۰/٤ mM، 2U Taq DNA polymerase، غلظت هر پرایمر ۰/٤μM، Mm PCR Buffer(1x) ۵DNA و میزان غلظت DNA نمونه ۱۰۰ng بوده است. قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای انجام آنالیز RFLP با استفاده از ٤۷ آنزیم DNA آز مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند، (که تنها ۱۲ آنزیم مطابق جدول ۱)، بر روی محصول PCR محل برش داشته‌اند). برای این منظور مقدار ٤μl محصول PCR، ۱μl آنزیم و۳μl بافر آنزیم را در یک میکروتیوپ با آب مقطر به حجم ۲۰μl رسانده و به مدت ۱٦ ساعت درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول PCR هضم شده روی ژل پلی اکریل آمید ٦ درصد (۲۹:۱ اکریل‌آمید. بیس - اکریل آمید و بافر TBE TX) غیر دناتوره در الکتروفورز عمودی بارگیری و سپس ژل آماده شده با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. ژل در ولتاژ ۱٤۵ و به‌مدت ٤ ساعت بارگیری شد. تصویر ژل مورد نظر با استفاده از دستگاه ژل داکیو منتیشن (مدل HOEFER-UVIF20) تهیه (شکل ۲ و ۳) و اندازهٔ قطعات با استفاده از نرم‌افزار UVIDoc محاسبه گردید (جدول ۱).

نتایج

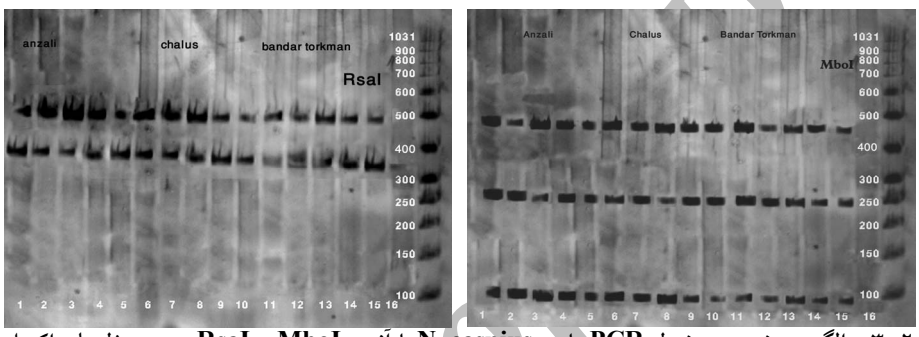
DNA استخراج شده پس از بررسی مقادیر کمی و کیفی آن جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مناسب بوده است. در این بررسی از ٤۷ آنزیم DNA آز استفاده شده تنها ۱۲ آنزیم (جدول ۱)، در توالی ژنوم مورد مطالعه محل شناسایی داشته و موجب هضم گردیدند. از میان ۱۲ آنزیم هضم‌کننده، هیچ یک در نمونه‌های مورد استفاده الگوهای متفاوت نشان ندادند. در واقع اندازه محصول PCR هضم شده در تمام نمونه‌ها یکسان بود (شکل ۳ و ۲) و بیانگر این است که ژن سیتوکروم b, ۲ ژن tRNA, و ناحیه D-loop مستقر روی mtDNA با آنزیم‌های مورد استفاده، تنوع ژنتیکی و یا پلی مورفیسم بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد مناطق مختلف را نشان نمی‌دهد، بنابراین انجام هر گونه آنالیز آماری برای محاسبه Haplotype Diversity و رسم درخت خویشاوندی بین افراد یا گروه‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار اختصاصی امکان پذیر نبوده است. اما نتیجه قابل توجه در این بررسی این بود که بر طبق آنچه که پرایمر بر گرفته شده از مقاله Chang (۲۰۰۵) بیان می‌داشت، می‌بایست اندازه محصول PCR حدود ۲۱۲٦-۲۱۲٤ جفت باز مشاهده می‌گردید، اما در این بررسی اندازه محصول PCR در تمام نمونه‌های گاوماهی خزری مناطق مورد بررسی حدود ۷۰۰ جفت باز به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تعداد قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصولات PCR

نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات (bp)
ALUI	۵	۷۰، ۱۱۰، ۱۸۰،۱٤۰، ۲۰۰
ALW26I	٤	٦٤،۱۰۰، ۱۲٦، ٤۱۰
BSENI	۳	۱٤۰، ۱٦۰، ٤۰۰
DRAI	٤	۱۲۵، ۱٤۵، ٤۳۰
MBOI	٤	٦٦، ۱۸٤، ۲۵۰،۲۰۰
RSAI	۳	۱۵۰، ۲۱۰، ۳٤۰
TASI	۲	۱۸۰، ۵۲۰
HINCII	۲	۲٦۰، ٤٤۰
BSURI	۳	۱۲۲، ۲٤۰، ۳۱۸
BSH 1285	۳	۸۰، ۱۳۵، ٤۸۵
HIN1I	۲	۳۱۰، ۳۹۰
BSU15I	۳	۱۷۷، ۲۱۸، ۳۰۵



شکل ۲ و۳- الگوی هضمی محصول PCR ماهی N. caspius با آنزیم MboI , RsaI بر روی ژل پلی اکریل آمید.
ستون‌های ۱ تا ۵ : نمونه‌های منطقه انزلی، ستون ٦ تا ۱۰ : نمونه های منطقه چالوس و ستون ۱۱ تا ۱٦ : نمونه های منطقه بندر ترکمن

بحث

بر اساس کنواسیون ۱۹۹۲ ریو (کنفرانس ملل متحد در زمینه مطالعه زیست و توسعه) تنوع زیستی عبارت است از تفاوت بین موجودات زنده در یک مجموعه اکولوژیک و شامل تنوع درون گونه‌ای درون یک اکوسیستم می‌باشد (۱۳).

اتحادیه بین‌المللی حفاظت از گونه و منابع طبیعی (IUCN) تنوع ژنتیکی را به‌عنوان یکی از سه عامل ضروری حفاظت از گونه‌ها بیان کرده است (۱٦).

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌نماید. یکی از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیت‌ها می‌باشد. شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می‌باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای، سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها می‌باشد (۱۸). اندازه محصول PCR (با استفاده از پرایمر استفاده شده در این بررسی) برای گونه *Rinogobius maculafasciatus*، حدود ۲۱۲٦-۲۱۲٤ جفت باز می‌باشد، در صورتی که وزن محصول PCR برای گونه *N.caspius* با استفاده از همان پرایمر حدود ۷۰۰ جفت باز می‌باشد (۱۰). این تفاوت ممکن است به علت وجود Tandom repeads در ژن مورد مطالعه در گونه *R.maculafasciatus* اتفاق افتاده که باعث افزایش طول ژنوم گردیده است و یا بر عکس در گونه *N.caspius* در مقایسه با گونه یاد شده بخش‌هایی از ژنوم در مسیر تکامل حذف گردیده است و موجب کوچکتر شدن اندازه ژنوم شده است و یا احتمالا اشکالات فنی در مسیر استفاده از پرایمرها پیش آمده که این تفاوت را موجب شده است که تعیین توالی محصول PCR ناشی از این تحقیق و مقایسه آن با توالی‌های مشابه در دیگر گونه‌ها در Gene bank می‌تواند باعث شفافیت موضوع شود. در این بررسی ناحیه‌ایی از ژنوم میتوکندری گاوماهی خزری، که مورد مطالعه قرار گرفت، ژن سیتوکروم b، ناحیه D-loop و tRNA,۲ بوده است که هر یک از ۱۲ آنزیم‌های هضمی مورد استفاده تنها یک نوع الگوی الکتروفورزی برای تمام نمونه‌ها را نشان دادند

Archive of SID

www.SID.ir

و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی مشاهده نگردید، به‌عبارت دیگر این قسمت از ژنوم mtDNA در گاو ماهی خزری به‌طور کامل حفاظت شده است. Ovenden و white (۱۹۹۰) دریافتند که به‌طورکلی در موجودات دریایی، تنوع mtDNA خیلی کم است و فاکتورهایی مثل اثر شرایط نامناسب و محدود و یا مرگ و میرهای فامیلی که به دلایل ویژه‌ای اتفاق می‌افتد، یکی از عوامل بروز اختلاف نوکلئوتیدی می‌باشد (۱۷). از آنجا که تعداد بازهایی که در این بررسی به طور مستقیم مورد مطالعه قرار گرفتند، ۱۰۲ جفت باز می‌باشد و با احتساب تعداد جفت بازهای مجموع ژن سیتوکروم اکسید از I،۲ ژن tRNA, و ناحیه D-loop، N.caspius (۷۰۰ bp) تقریباً ۱۵ درصد از مجموع ژن‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفته است و تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده نشد. لالوئی (۱۳۸۲) جمعیت *Barbus capito* را در دریای خزر را با روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار داده است و متوسط تعداد نوکلئوتیدهایی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفته است حدود ۱۱۲ bp می‌باشد، در واقع ۹۵ درصد از ژن سیتوکروم b و یا حدود ۱ درصد از کل ژنوم میتوکندری در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت و هیچ تنوعی دیده نشده، در حالی‌که طی نتایج بدست آمده جهت بررسی جمعیت‌های *N.melanostomus* در دریاچه گریت و دریای سیاه با استفاده از روش mtDNA، حاکی از وجود اختلاف ژنوتیپ‌های mtDNA ما بین جمعیت‌های این گونه در دو منطقه مورد مطالعه بوده است در صورتی که تصور بر این بوده است که با توجه به اینکه *N.melanostomus* حدود ۱۰ سال است که به‌عنوان یک گونه غیر بومی وارد دریاچه گریت شده است، منشاء آن از دریای سیاه باشد (۱۲). همچنین بررسی سکانسینگ ژن سیتوکروم b در ژنوم mtDNA گونه، *N. melanostomus* دریای خزر تنوع ژنتیکی پایینی را نشان داده است (۹ و ۱۹). نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی هستند. هر یک از این نشانگرها توانایی‌های متفاوتی دارند و جنبه‌های مختلفی از ساختار ذخایر را آشکار می‌کنند بنابراین بسیاری از محققین به‌وسیله تکنیک‌های مختلف مولکولی ساختار ذخایر را بررسی می‌کنند.

Pourkazemi (۱۹۹۶)، ساختار ژنتیکی تاسماهیان سواحل جنوبی دریای خزر از جمله جمعیت ماهی ازون برون را بوسیله آلوزایم‌ها، RFLP و DNA میتوکندریایی بررسی کرد، اما عدم تفاوت معنی‌دار در فراوانی الل‌ها بین ٤ منطقه جغرافیایی و پراکنش هاپلوتیپ‌ها در تشخیص جمعیت به علت جریان بالای ژنی بین جمعیت‌ها، حساسیت پایین روش به‌کار رفته، تعداد کم نمونه و مناسب نبودن ژن مورد مطالعه عنوان کرد. به نظر وی اختلافات کم در توالی ناحیه D-loop شاید به‌دلیل این است که مولکول mtDNA بسیارحفاظت شده است و برای مطالعه فیلوژنتیکی مناسب نمی‌باشد. مطالعه تعیین توالی قسمتی از ژن ND5/6 میزان بالایی از تنوع توالی را در بین ۵ گونه تاس ماهی نشان می‌دهد و ممکن است این قسمت برای مطالعات جمعیتی و فیلوژنتیکی مناسب باشد. شعبانی (۱۳۸٤) با بررسی دو ناحیه D-loop و ND5/6 در روی میتوکندری توانست ازون برون ولگا و حوضه جنوبی خزر را از هم جدا کند، ولی اختلاف معنی‌داری در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده در نواحی مختلف بخش جنوب دریای خزر مشاهده نکرد. دلیل این امر را می‌توان به نبودن مانع جغرافیایی جهت جداسازی مناطق جنوبی از یکدیگر، تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی شده و صید ماهیان محدوده رودخانه تجن از دریا نسبت داد (۸).

از آنجایی که با استفاده از آنزیم‌های هضمی مورد استفاده در این تحقیق الگوهای پلی مورفیسم یا چند شکلی مشاهده نگردید، نشان‌دهنده این حقیقت است که اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌های *N.caspius* درطول سواحل سه منطقه انزلی، چالوس و بندر ترکمن واقع در حوضه جنوبی خزر وجود نداشته و تمام ذخایر *N.caspius* موجود در مناطق مورد نظر از یک جمعیت واحد تشکیل شدند. همچنین این گونه که در زمان لاروی دارای زندگی پلاژیک می‌باشد و به علت، نبود موانع فیزیکی و زیستی در دریای خزر (مثل سد و غیره) ممکن است باعث انتقال جمعیت این لاروها به مناطق مختلف دریای خزر توسط امواج شده باشد، از سوی دیگر نمونه‌های به بلوغ رسیده این گونه هیچگونه مهاجرتی در سال نداشته و تنها حرکت آن جهت یافتن غذا و یا مهاجرت عمودی که فاصله حدود ۵۰-۲۰ متری

Archive of SID

www.SID.ir

را در جهت تغییرات فصلی و آب و هوا طی می‌کنند و همچنین صید این گونه به‌صورت ضمنی در جریان فعالیت‌های صید و بهره‌برداری سایر گونه‌های آبزیان دریای خزر صورت می‌گیرد. می‌توان عدم مشاهده پلی‌مورفیسم در نمونه‌های جمع‌آوری شده را از چند جهت تفسیر کرد. استفاده از ژن‌های دیگر mtDNA و یا استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر و یا تعداد آنزیم‌های متنوع‌تر می‌تواند نتایج شفاف‌تری را نشان دهد، همچنین مکن است ژن مورد بررسی، ژن مناسبی برای بررسی جمعیت گاوماهی خزری نبوده و توالی مورد استفاده دچار هیچ‌گونه موتاسیون در طی دوران تکاملی خود نگردیده است و چه بسا ژن‌های دیگر نتایج متفاوتی را نشان دهند.

اگر چه این ژنوم قابلیت تفکیک جمعیت ذخایر گونه گاوماهی خزری را از خود نشان نداده است، اما نتیجه بارز این تحقیق تفاوت فاحش اندازه طول توالی ژن مورد PCR قرار گرفته با نتیجه منتشر شده توسط Cheng (۲۰۰۵)، را نشان داد که نتیجه قابل توجهی برای بررسی‌های بعدی و تکمیلی خواهد بود. همچنین ممکن است به‌دلیل شرایط اکولوژیکی دشواری که در دریای خزر در دو دهه اخیر پیش آمده و اعمال فشار صید و صیادی بر ذخایر دریای خزر توسط کشورهای حاشیه خزر، موجب حذف افراد جمعیت با ژنوتیپ‌های متفاوت گردیده و ژنوتیپ موجود به‌دلیل شرایط و ویژگی خاص خود قادر به بقا و ادامه حیات در خزر باقی مانده است.

منابع

۱- پیری، ح.، ۱۳۷۹. بررسی سیستماتیک، پراکنش و برخی از اختصاصات زیستی گاوماهیان (Gobiidae) سواحل جنوبی دریای خزر (آب‌های استان گیلان)، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی- دانشگاه آزاد اسلامی، تهران شمال. ۱۹۵ ص.

۲- رحیم‌اف، د.ب.، ۱۹۹۱. گاو ماهیان دریای خزر (سیستماتیک، اکولوژی و اهمیت آن) خلاصه رساله علمی برای دریافت درجه علمی دکترای علوم بیولوژی، انتشار به زبان روسی ۱۹۹۱، ترجمه مرکز تحقیقات شیلات گیلان (مترجم یونس عادلی).

۳- ستاری، م.، ۱۳۸۲. ماهی‌شناسی (۲) (سیستماتیک) انتشارات حق‌شناس. ۵۰۳ ص.

٤- شاه‌حسینی، م.ح.، ۱۳۸٤. واکنش زنجیرهای پلیمراز، ناشر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، شهریار/شهر قدس. ١٦٥ ص.

۵- شعبانی، ع.، ۱۳۸٤. مقایسه جمعیت‌های مولدین ماهی اوزون برون (*Acipenser stellatus*) در بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی دریای خزر با روش‌های مولکولی (PCR-RFLP) مورفولوژیکی و برخی از نرماتیوهای تکثیر آن. پایان‌نامه دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۲۰ ص.

٦- لالوئی، ف.، رضوانی، س. و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۲. بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آب‌های حوضه جنوبی دریای خزر به‌روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، سال ۱۲/ شماره اول/بهار، صفحات ۱۳۰-۱۱۷.

۷- مائی سیوفیلاتووا، ۱۹۸۵. جانوران و تولیدات زیستی دریای خزر مترجم ابوالقاسم شریعتی، ۱۳۷۳. ناشر موسسه تحقیقات آموزش شیلات ایران.

۸- نوروزی، م.، ۱۳۸٦. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ماهی ازون برون *Acipenser Stellatus* دریای خزر با استفاده از روش مولکولی مایکروستلایت. پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ۱۷۳ ص.

9.Brown, W.M., 1989. Genetics: a molecular approach. London: Van Nostrand Reinhold (International). GB. 467 pp. (QH 442 .B7).

10.Cheng, H., Huang, SH., Lee, S., 2005. Morphologleal and molecular variation in *Rhinogobius rubromaculatus*. (pisces Gobiidaes in Taiwan zoological stuolies 44(1): 119-129.

11.Cronin, M.A., Hilis, S., Born, E.W., and potton, C., 1994. mtDNA variation in Atlantic and Pacific waler uses.can. 30200 L. 72, pp. 1035-1043.

12.Dougherty. J., Moore, W., and Ram, J., 1995. Mitochondrial DNA analysis of round goby (*Proterorhinos marmoratus*) in the great lakes basin. Can. J. fish. Aquat. Sci. 53: 474-480.

13.Gray, John, S., 1997. Marine Biodiversity: patterns, threats and Conservation needs, GESAMP.

14.Hillis, D.M., and Mortiz, C., 1990. An overview of applications of molecular systematic. Molecular Systematics, Sinauer Associates, Inc., pp. 502-515.

15.Liu, Z.J., Cordes., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238, pp. 1-37.

16.Mcneely, J.A., Miller, K.R., 1990. Conserving the world's biological diversity. Washington, DC. Iuc. N, world Resources Institute, Conservation International, WWF- US and the world Bank.

17.Pourkazemi, M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of Sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D. Thesis, school of biological sciences, University of Wales, Swansea.

18.Rezvani Gilkolaei, S., 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian sea. Ph.D. Thesis School of biological Sciences, university of Wales, Swansea. U.K.

19.Stepien, C.A., and Tumeo, M.A., 2006. Invasion genetics of ponto-caspian gobies in the Great Lakes: A "cryptic" species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. Bilogical Invasions. (Springer). 8(1):61-78.

Archive of SID

www.SID.ir

Population Genetic Structure of Neogobius caspius (Eichwald, 1831) in the South Caspian Sea using PCR-RFLP Marker

E.Gothb Razmjoo[1], S. Rezvani[2], S.M. R. Fatemi[1], P. Ghavam mostafavi[1] and M. purkazemi[3]

[1]Dept. of Marine Biology-Graduate School of Marine science and Technology Islamic Azad University, Sciences and Research Branch, Tehran, Iran, [2]Iranian Fisheries Research Organization (IFRO), Tehran, Iran, [3]International Sturgeon Research Institute, Iran

Email: razmjoo_elahe@yahoo.com

Abstract

Neogobius caspius is a small benthic fish that is native of the Caspian Sea. The importance of this fish is because of its role as a main food resource of the Sturgeon fish. The genetic diversity of *N.caspius* population in the Caspian Sea was studied using PCR-RFLP technique. A total of 135 samples of *N.caspius* were collected from costal line in the north Caspian Sea, including specimens from costal of Anzali and Chalus. Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method and then was amplified using a pair primer of cytochrom b gene, 2 tRNA gene and the control region sequences by a thermal cycler.

R: D2(5'-CCGGAGTATGTAGGGCATTCTCAC-3')

F: CY1(5'-YYTAACCRRGACYAATGACTTGA-3')

12 restriction enzyme were used to digest the target gene region including: AluI - Alw26I(BsmAI) - BSeNI(BSRI) -DraI -MboI -RsaI – TasI – HincII -BsuRI(HaeIII) - Bsh1285I - Hin1I- Bsu15I.

Digested PCR products were observed by silver staining method followed by polyacrilamid gel electrophoresis (PAGE). The results showed the same pattern among the species. There was no polymorphism and no differentiation in population in the *Neogobius caspius* fish in the southern coast of Caspian Sea.

Keywords: Caspian Sea; Genetic population; *Neogobius caspius*; PCR; RFLP

Archive of SID

www.SID.ir