Archive of SID

بررسی تنوع ژن 18s rRNA در جمعیت ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش PCR-RFLP

رضا نهاوندی[۱] ؛ سهراب رضوانی گیل کلایی[۲] ؛ غلامحسین وثوقی[۳] و بهرام کاظمی[۴]

r_Nahavandi2003@yahoo.com

۱ و ۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۶۱-۱۴۱۵۵

۳ - گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۳۳-۱۴۱۵۵

۴ - مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران صندوق پستی: ۱۹۳۹۵

تاریخ ورود: آذر ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۴

چکیده

این تحقیق به منظورشناسایی جمعیت ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) در ۱۵ ایستگاه نمونه‌برداری در خلیج فارس و دریای عمان و به روش مولکولی صورت گرفت. نمونه‌برداری به روش ترال کف از مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان انجام شد که در نهایت ۲۰ تا ۴۰ نمونه از گونه *S. pharaonis* در هر یک از ایستگاههای مختلف جمع‌آوری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام گرفت. یک جفت آغازگر براساس توالی نوکلئوتیدی ژن 18s rRNA طراحی شد و برای مطالعه تنوع جمعیتی ماهی مرکب از تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از هضم ژن 18s rRNA که با تکنیک PCR تکثیر شده بود استفاده گردید. محصول PCR به طول ۵۰۲ جفت باز برای تمامی نمونه‌ها بدست آمده و با استفاده از ۸ آنزیم برشی شامل : *Alu* I-*Taq* I-*Mnl* I-*Rsa* I- *Hind* III-*Dra* I- *Pvu* II-*Hae*III مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. الگوی باندهای DNA در تمام نمونه‌های هضم شده توسط این آنزیمها، مشابه بوده وچند شکلی در بین نمونه‌ها مشاهده نگردید. باتوجه به نتایج فوق می‌توان نتیجه گیری نمود که امکان جداسازی جمعیتهای مختلف در گونه ماهی مرکب مورد بررسی با استفاده از ژن ریبوزومال RNA وجود نداشته است.

لغات کلیدی: PCR-RFLP، ماهی مرکب، *Sepia pharaonis*، ژن ریبوزومی، خلیج فارس و دریای عمان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در آبهای جنوب کشور تا کنون ۸ گونه ماهی مرکب از دو جنس *Sepiella* و *Sepia* شناسایی شده که کلیه آنها متعلق به خانواده Sepiidae می‌باشند. از جنس *Sepia* هفت گونه و از جنس *Sepiella* فقط یک گونه تاکنون گزارش شده‌اند (Boletzky , 1999).

ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*)(Ehrenberg, 1831) از رده سرپایان گونه غالب سرتاسر آبهای جنوب کشور بوده و در سرتاسر محدوده تمام هشت کشور حوضه جنوبی خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد که ضرورت یک مطالعه مشترک و همزمان را طلب می‌نماید. از میزان کل صید استحصالی در دریای عمان، ۳ درصد از کل صید را سرپایان بالاخص ماهی مرکب و اسکوئید تشکیل می‌دهند. در آبهای استان هرمزگان ذخایر ماهی مرکب از اهمیت کمتری نسبت به استانهای همجوار خود برخوردار است (ولی‌نسب، ۱۳۷۸).

تاکنون روشهای متعددی برای شناسایی ذخایر آبزیان بکار رفته، ولی آنچه که امروزه بعنوان یک روش قابل اعتماد می‌توان از آن یاد کرد، استفاده از روشهای مولکولی جهت تفکیک جمعیتها و یا ذخایر آبزیان برحسب گونه و یا زیر گونه است. آگاهی از اینکه ماهیان مرکب (*S. pharaonis*) در دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای عمان دارای ساختار ژنتیکی واحد بوده و متعلق به یک جمعیت می‌باشند یا دارای جمعیتهای متفاوتی هستند، در برنامه‌ریزی مدیریت شیلاتی برای بهره‌برداری از ذخایر دریایی و نیز در امر بازسازی ذخایر حائز اهمیت می‌باشد.

اگرچه تا سال ۱۹۹۳ در مقایسه با سایر مهره‌داران، مطالعات مولکولی روی گونه‌ها و جمعیتهای آبزیان محدود بوده است (Meyer, 1993) اما در سالهای اخیر با مطالعه مولکولی روی ماهی Blue gill (*Lepomis macrochirus*) (Avise *et al.*, 1984) بتدریج بکارگیری روشهای مولکولی در بررسیهای فیلوژنیک و جمعیتی آبزیان بعنوان یک روش دقیق و مطمئن افزایش یافته است. تعیین نوکلئوتیدی mt DNA در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط Chang و همکارانش در سال ۱۹۹۴ و در مورد ماهی کاد اقیانوس اطلس توسط Johansen و همکارانش در سال ۱۹۹۴ منتشر شد و نیز روشهای مولکولی در بررسی جمعیت گونه‌هایی از آزاد ماهیان (Pourkazemi,1996;Bermingham *et al.*, 1991) (Rezvani Gilkolaei, 1997, 1999,2000) و لابستر (Ovenden *et al.*, 1992)، صورت پذیرفته که نشانگر اختلاف ژنتیکی زیاد در بین گونه‌ها و یا افراد داخل گونه بوده است.

هدف از این بررسی وجود یا عدم وجود جمعیتهای مختلف درون گونه‌ای ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) آبهای خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از نشانگرهای هسته‌ای می‌باشد.

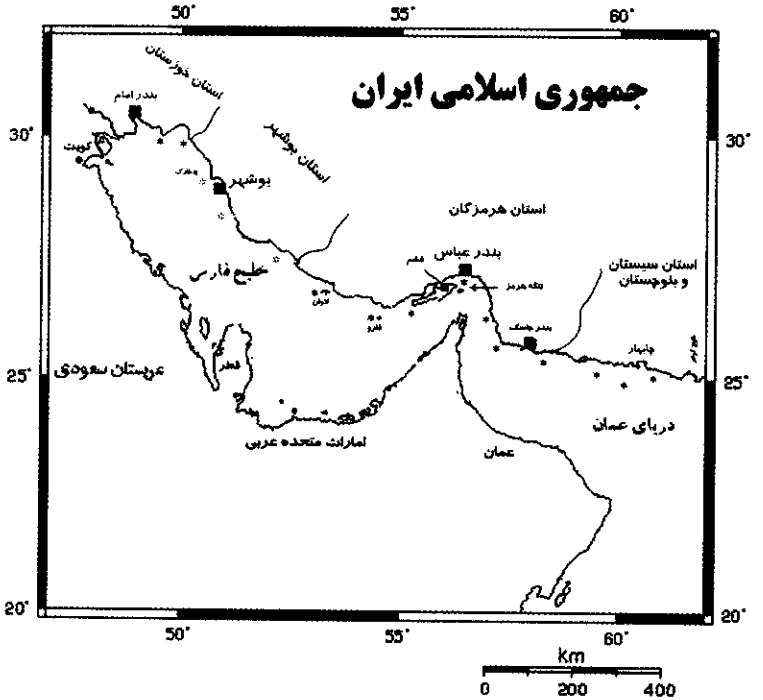
مواد و روش کار

تعداد ۲۰ تا ۴۰ ماهی مرکب از گونه *S. pharaonis* از هر یک از ۱۵ ایستگاه مختلف آبهای خلیج فارس و دریای عمان به روش ترال کف جمع‌آوری گردیدند (شکل ۱). سپس تکه‌هایی از بافتهای مختلف (بازوها، بادکشها، قلابها، عضلات، دو شاخک و باله‌ها) در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید و

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های تثبیت شده برای انجام آزمایشات مولکولی به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران منتقل شدند.



شکل ۱: ۱۵ منطقه مورد بررسی (۳ منطقه در آبهای استان سیستان و بلوچستان، ۷ منطقه در آبهای استان هرمزگان، ۳ منطقه در آبهای استان بوشهر و ۲ منطقه در آبهای استان خوزستان) جهت نمونه‌برداری در آبهای خلیج فارس و دریای عمان

DNA ژنومی با استفاده از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافتهای مذکور به روش فنل- کلروفرم (Hills & Moritz, 1990) استخراج گردید و ۱۰ میکرولیتر از DNA هرنمونه همراه با بافر (Loading buffer) LB روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. بعد از مشاهده DNA با کیفیت مطلوب، نمونه‌های DNA برای انجام آزمایشات بعدی در یخچال معمولی (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند.

برای تکثیر قطعه‌ای از ژن 18s rRNA از یک جفت آغازگر که براساس اطلاعات بدست آمده از جستجو در اینترنت (ACCESSION AF369117) طراحی شده بودند استفاده گردید (بر گرفته از: سایت اینترنتی NCBI).

Sepi F 5' - GTC TCT CTG TAT TTA TTA AAT AGA G -3

www.SID.ir

Archive of SID

Sepi R 5`-A AAG TTT TAA AAA TCG AAC AGA TTT-3`

آغازگرها توسط شرکت Primm کشور کره جنوبی سنتز شدند.

واکنش PCR شامل ۱۰۰نانوگرم DNA، ۴۰ پیکومول از هریک ازآغازگرهای روبه جلو و رو به عقب و یک میکرولیتر dNTP (10mM)، بافر PCR (1X)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ (50 mM) و آب مقطر استریل تا حجم ۵۰ میکرولیتر بود. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل Primus شرکت MWG آلمان با برنامه زیر استفاده گردید:

مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشته‌سازی اولیه و در ادامه ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل : ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد (Denaturation) ، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگر (Annealing) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای بسط (Extention). محصول PCR هریک از نمونه‌ها با استفاده از ۸ آنزیم برشی شامل :

*Hae*III , *Alu* I , *Pvu* II , *Mnl* I , *Dra* I , *Hind* III , *Rsa* I , *Taq* I

هضم گردیدند.

محلول واکنش آنزیمی حاوی ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR (تقریبا ۲ میکروکرم)، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۰/۵ تا ۱ میکرولیتر از آنزیم‌های مختلف (۲/۵ تا ۵ واحد) و آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر بود. نمونه‌ها برای تمام آنزیمها، بجز *Taq* I (که در ۶۵ درجه سانتیگراد فعالیت می‌کند) در ۳۷ درجه سانتیگراد بیش از سه ساعت انکوباتور قرار گرفتند. واکنش هضم آنزیمی همراه با بافر الکتروفورز TBE (10X) در کنار مارکر 100 pb DNA ladder (Fermentas) روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد الکتروفورز شدند. قابل ذکر است که به منظور سنجش کیفیت DNA استخراجی از روش الکتروفورزی استفاده گردید. بطوریکه با الکتروفورز نمونه DNA می‌توان از روی شدت وضوح باند به کیفیت و تا حدودی به کمیت آن پی برد. برای این منظور مقدار مشخصی از DNA خالص شده (۵ میکرولیتر) همراه با ۲ تا ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده (Loading buffer) بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و سپس از الکتروفورز سیستم PAGE (ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد) جهت جدا سازی بهتر نوارهای DNA و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (برای مشاهده باندهای مورد نظر زیر دستگاه UV) استفاده شده است.

نتایج

استخراج DNA نمونه‌های ماهی مرکب (*S. pharaonis*) آبهای خلیج فارس و دریای عمان با روش فنل–کلروفرم بخوبی انجام شد و قطعه DNA مورد نظر با استفاده ازآغازگرهای مذکور با تکنیک PCR تکثیر یافت. طول قطعه تکثیر شده ۵۰۲ جفت باز بود که این اندازه در تمام نمونه‌ها مشابه بود. جهت انجام آنالیز RFLP از ۸ آنزیم برشی شامل:

Taq I-*Mnl* I-*Rsa* I-*Hind* III-*Dra* I-*Pvu* II-Hae *Alu* I

استفاده گردید و الگوهای الکتروفورزی آنها روی ژل پلی اکریل آمید با هم مقایسه شد. در جدول ۱ طول قطعات ایجاد شده بعد از هضم آنزیمی محصول PCR با هر یک از ۸ آنزیم مورد نظر نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: طول قطعات ایجاد شده بعد از هضم آنزیمی محصول PCR با هریک ازآنزیمها

نام آنزیم	موقعیت برش روی محصول PCR	طول قطعات بعد از برش با آنزیم(جفت باز)
Alu I	۵۷ ، ۱۸۶ ، ۲۲۳ ، ۴۶۵	۳۷، ۳۷، ۵۷، ۱۲۹ ، ۲۴۲
Dra I	۱۹۷ ، ۴۹۲	۱۰، ۱۹۷ ، ۲۹۵
Hae III	۳۱	۳۱، ۴۷۱
Hind III	۴۶۴	۳۸، ۴۶۴
Mnl I	۱۰۳ ، ۴۲۹	۷۳، ۱۰۳، ۳۲۶
Pvu II	۵۶	۵۶، ۴۴۶
Rsa I	۷۵	۷۵، ۴۲۷
Taq I	۴۳۱ ، ۴۸۶	۱۶، ۵۵، ۴۳۱

آنزیم *Alu* I دارای ۴ جایگاه شناسایی (AG ↓ CT) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر تعداد ۵ قطعه با اندازه‌های ۳۷، ۳۷، ۵۷، ۱۲۹ و۲۴۲ جفت باز ایجاد می‌کند.

آنزیم *Dra* I دارای ۲ جایگاه شناسایی (AAA ↓ TTT) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۳ قطعه با اندازه‌های ۱۹۷، ۲۹۵ و ۱۰ جفت باز ایجاد می‌کند.

آنزیم *Hae* III دارای یک جایگاه شناسایی (GG↓CC) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۲ قطعه با اندازه‌های ۳۱ و ۴۷۱ جفت باز ایجاد می‌کند.

آنزیم *Hind* III دارای یک جایگاه شناسایی (AAG↓CTT) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۲ قطعه با اندازه‌های ۳۸ و ۴۶۴ جفت باز ایجاد می‌کند.

آنزیم *Mnl* I $\begin{cases} CCTCN & ۷ \downarrow ۳' \\ GGAGN & ۴ \downarrow ۵' \end{cases}$ دارای ۲ جایگاه شناسایی روی محصول PCR می‌باشد.

که بعد از تاثیر ۳ قطعه با اندازه‌های ۷۳، ۱۰۳ و ۳۲۶ جفت باز ایجاد می‌کند.

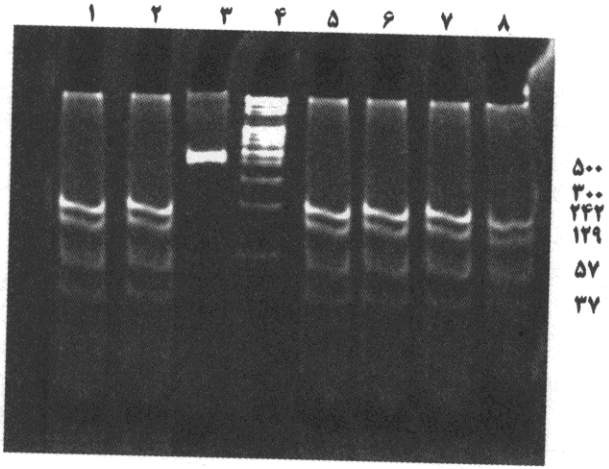
آنزیم *Pvu* II دارای یک جایگاه شناسایی (CAG↓CTG) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۲ قطعه با اندازه‌های ۵۶ و ۴۴۶ جفت باز ایجاد می‌کند.

آنزیم *Rsa* I دارای یک جایگاه شناسایی (GT↓AC) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۲ قطعه با اندازه‌های ۷۵ و ۴۲۸ جفت باز ایجاد می‌کند.

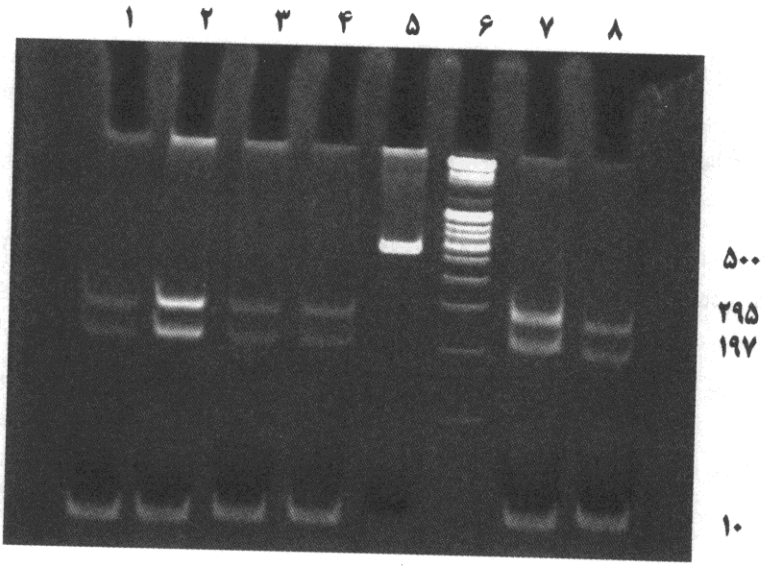
آنزیم *Taq* I دارای ۲ جایگاه شناسایی (T↓CGA) روی محصول PCR می‌باشد که بعد از تاثیر ۳ قطعه با اندازه‌های ۱۶، ۵۵ و ۴۳۱ جفت باز ایجاد می‌کند (اشکال ۲ تا ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



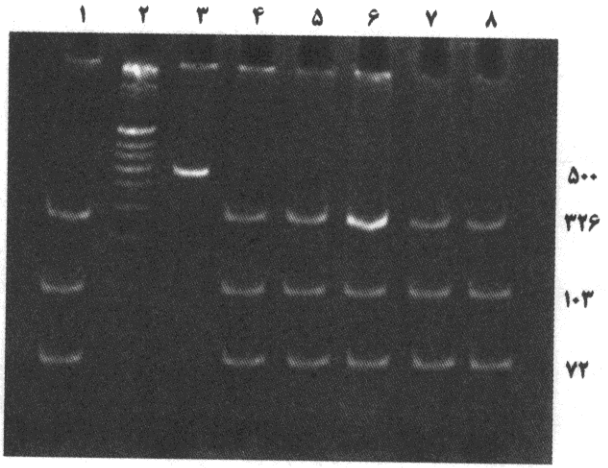
شکل ۲: : الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده ازآنزیم *Alu* I روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۳: محصول PCR ستون ۴: مارکر ۱۰۰bp ستون۶: نمونه منطقه بوشهر، ستون ۷: نمونه منطقه هرمزگان، ستون ۸: نمونه منطقه سیستان و بلوچستان



شکل ۳ : الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم ۱ *Dra* روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۲: نمونه منطقه بوشهر، ستونهای ۳ و ۴: نمونه‌های منطقه هرمزگان، ستون ۵: محصول PCR ، ستون ۶: مارکر ۱۰۰bp، ستونهای ۷ و ۸: نمونه‌های منطقه سیستان و بلوچستان

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده ازآنزیم *Mnl* I روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد
ستون ۱: نمونه منطقه خوزستان، ستون ۲: مارکر ۱۰۰bp، ستون۳ : محصول PCR، ستون ۴: نمونه‌های منطقه خوزستان، ستونهای ۵ و۶: نمونه‌های منطقه هرمزگان، ستون ۷ و ۸: نمونه‌های منطقه سیستان و بلوچستان

بحث

گوناگونی ژنتیکی بعنوان صفات ماندگار یک گونه با مرگ جاندار ناپدید نمی‌شود بلکه به نسلهای بعد منتقل می‌گردد و بعنوان عوامل پایدار و اسناد محکمی در مطالعات رده‌بندی محسوب می‌شوند.

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌نماید. یکی از راههای بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیتها بوده و شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره‌برداری می‌باشد. امروزه هدف اصلی آزمایشات ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای سیستماتیک و طبقه‌بندی آنها می‌باشد (رضوانی گیل‌کلایی، ۱۹۹۷؛ Lu, 1998).

در زمینه ژنتیک مولکولی و تکنیک های مربوط به آن می توان به Allozyme,RFLPS,RAPDS و AFLPS اشاره نمود که بوسیله آنها می‌توان در صورت عدم ثبت مشاهدات مورفولوژیک بین گونه‌ها بعنوان شاخص تفکیکی بین جمعیتها و روابط ژنتیکی موجود بین گونه‌ها بکار برد (Badaracco *et al.*, 1998).

از معمول‌ترین روشها در اکثر آزمایشات مولکولی در جهت دستیابی به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا در مطالعات ژنتیک جمعیت، استفاده از روش فنل-کلروفرم می باشد.

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم به دلیل مزیت جداکنندگی فنل و کلروفرم در مقابل پروتیین، یکی از روشهایی است که در آن نسبت به بقیه روشها احتمال استخراج DNA خالص بیشتر وجود

www.SID.ir

دارد ولی در روش جوشاندن به دلیل آنکه پس از لیز شدن بافت توسط گرما و هیدروکسید پتاسیم، مواد زاید از عصاره حاصل شده، جدا نمی‌گردند، نتایج مطلوبی پس از الکتروفورز بر روی ژل مشاهده نمی‌شود و باندها به صورت ضعیف ظاهر شده و تشخیص موقعیت باندها نسبت به یکدیگر مشکل می‌باشد (Bonnaud *et al*., 1997).

قابل ذکر است که پلی مورفیسم ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای بعنوان یک شاخص ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی می‌باشد (Taggart & Hynes, 1998) و از آنجاییکه آنزیمها فرآورده‌های ژنها می‌باشند و نشان دادن تغییرات الکتروفورزی در آنها بر روی ژل انعکاس مستقیمی از اختلاف ژنتیکی آنهاست، برای بررسی تغییرات ژنوم میتوکندری از مکانهای عمل آنزیمهای برشی استفاده می‌شود.

محل یک آنزیم اختصاصی بر روی ژل الکتروفورز شده به صورت یک باند یا باندهای رنگ آمیزی شده غیرمحلول آشکار می‌شود و مسافتی که آن آنزیمها بر اثر جریان الکتریکی از قطب منفی به قطب مثبت بر روی ژل پیموده‌اند بیانگر اندازه و شکل مولکولی آنهاست که این روش در حقیقت یک ارزیابی غیرمستقیم از تنوع DNA می‌باشد (Willson *et al*., 1997 ; Piertney *et al*., 2003).

آنالیز mtDNA بوسیله روش مستقیم توالی نوکلیوتیدها و روش غیرمستقیم با آنالیز RFLP صورت می‌پذیرد که روش پیشرفته‌ای برای تشخیص جمعیتها می‌باشد (Nicholas *et al*., 1997).

بررسی RFLP ژن ریبوزومال RNA بعنوان نشانگر مولکولی می‌تواند در مورد گونه‌های مختلف سرپایان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به تعداد آنزیمهای هضم‌کننده می‌توان از دامنه وسیعتری از این آنزیمها استفاده نمود تا درصد بازهای بیشتری از توالی این ژن در این آبزیان مورد بررسی قرار گیرد. جهت تخمین دقیقتر زمان تفرق بین گونه‌ای می‌توان از روشهای مولکولی قابل اعتمادتری نظیر تعیین توالی ژن به همراه توجه دقیق به داده‌های زیست‌شناسی دنیای قدیم استفاده نمود. البته باید در نظر داشت که در این زمینه ابهامات فراوانی وجود دارد، زیرا این جانوران به دلیل فقدان پوسته با ضمایم آهکی بندرت بصورت فسیل درمی‌آیند، در نتیجه اطلاعات چندانی راجع به گذشته این آبزیان در دست نمی‌باشد. همچنین با بررسی تعداد گونه‌های بیشتر سرپایان می‌توان به بررسی حالتهای مونوفایلی و پلی‌فایلی در این گروه از جانوران که همواره مورد بحث بوده است پرداخت (Lee, 1983 ; Clarke, 1988 ; Çarlini *et al*,. 1999).

در این بررسی از ژن 18s rRNA استفاده گردید که دارای محلهای اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی است که از نظر مرفولوژی خیلی بهم نزدیک هستند، لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌گردد (Hansen & Loeschcke, 1996).

این انتخاب بدلیل انجام مطالعات قبلی بر روی این ژن توسط محققین و گزارشات مبتنی بر مفید بودن این ژن‌جهت بررسیهای نسبتهای خویشاوندی‌در بیشترگونه‌های بندپایان (Bonnaud *et al*., 1994, 1997, 1996) و همچنین کارایی بالای تکنیک PCR-RFLP جهت جداسازی ژنوتیپها و هاپلوتیپ‌های موجود در گونه *P. semisolcatus* بوده است (رضوانی گیل کلائی و همکاران، ۱۳۸۰).

www.SID.ir

Archive of SID

در اجـرای ایـن پـروژه از تکنـیک PCR-RFLP بدلـیل دارا بـودن قابلیـت اعتماد بالا استفاده گردید. آنالـیزهای RFLP ژن 18s rRNA بصـورت مارکر اختصاصی گونه‌ها مفید بوده و بعنوان یک ابزار معین جهت تولیدات اقتصادی هر گونه کاربرد داشته است.

در این بررسی نشان داده شد که الگوی الکتروفورز هضم آنزیمی هریک از نمونه‌های ماهی مرکب (*S. pharaonis*) آبهای خلیج فارس و دریای عمان با هرکدام از آنزیمها فوق یکسان می‌باشد و تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های بررسی شده مشاهده نمی‌شود، لذا انجام هر گونه آنالیز آماری برای محاسبه تنوع ژنتیکی و سایر فاکتورهای ژنتیکی امکان پذیر نبود. با نتیجه‌ای که از این تحقیق بدست آمد می‌توان ادعا نمود که نمونه‌های آنالیز شده ماهی مرکب (*S. pharaonis*) از مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از ژن ریبوزومالRNA احتمالاً مربوط به یک جمعیت بوده و در ژن 18s rRNA با هم شباهت دارند.

در پایان پیشنهاد می‌شود آنالیز RFLP با بکارگیری تعداد بیشتری آنزیم اندونوکلئاز محدود کننده روی رشته DNA صورت گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به عدم چند شکلی با استفاده از ژن 18s rRNA اظهار نظر نمود. همچنین می‌توان برای اثبات تعلق این نمونه‌ها به یک جمعیت واحد از نشانگرهای دیگری نظیرAFLP و SSR و همچنین از سایر ژنهای مستقر در mtDNA استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از موسسـه تحقـیقات شـیلات ایران برای تامین اعتبار و آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌گردد.

منابع

رضـوانی گـیل‌کلایـی، س. ؛ سـید علی بابایی، س.ع. و پورکاظمی، م. ، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیـت میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سـیتوکروم اکسـیداز I(COI) بـروش RFLP. مجلـه علمـی شیلات ایران، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۰، صفحات ۱۵ تا ۱۹.

ولی‌نسب، ت. ، ۱۳۷۸. بررسی تنوع جمعیتی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) آبهای خلیج فارس و دریای عمان. پایان نامه دکترا دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۷۳ صفحه.

Avis, J.C. ; Bermingham, E. ; Kessler, G. and Sanders, N.C. , 1984. Characterisation of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Evolution. Vol.38, pp.931-941.

Badaracco, G. ; Bellorini, M. and Landsberger, N. , 1998. Phylogenetic Study of cephalopoda. Journal of Molecular Evolution. Vol. 42, 152P.

Bermingham, E. ; Forbes, S.H. ; Friedland, K. and Pla, C. , 1991. Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using

www.SID.ir

Archive of SID

restriction analysis of mtDNA. Canadian Journal of Fish. Aquat. Sci. Vol.48, No.5, pp.884-893.

Boletzky, S.V. , 1999. A brief outline of the classification of recent Cephalopods. Bull. Soc. Zool. Fr. Vol. 124, No. 3, pp.271-278.

Bonnaud, L. ; Boucher-Rodoni, R. and Monnerot, M. , 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16SrDNA nucleotide sequences. C. R. Acad.Sci. Vol. 317, No. 6, pp.581-588.

Bonnaud, L. ; Boucher-Rodoni, R. and Monnerot, M. , 1996. Relationship of some coleoid cephalopods established by 3' end of the 16SrDNA and cytochrome oxidase III gene sequence comparison.Am. Malacol. Bull. Vol. 12, pp.87-90.

Bonnaud, L. ; Boucher-Rodoni, R. and Monnerot, M. , 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. Vol. 7, No. 1, pp.44-54.

Carlini, D.B. ; Graves, J.E. and Kuzniar, P.A. , 1999. Phylogenetic analysis of 18s rRNA sequences to determine. High-level relationships Cephalopods. Bull. Mar. Sci. Vol. 64, No. 1, pp.57-78.

Chang, Y.S. ; Huang, F.L. and Lo, T.B. , 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. Journal of Mol. Evol. Vol. 38, No. 2, pp.138-155.

Clarke, M.R. , 1988. Evolution of recent Cephalopods-A brief review. *In*: F.W. Harrison and A.J. Kohn, The mollusca, Vol. 12. Paleontology and neontology of cephalopods. San Diego, Academic Press. pp.331-340.

Hansen, M.M. and Loeschcke, V. , 1996. Genetic differentiation among Danish brown trout population as detected by RFLP amplified mtDNA segments. Journal of fish Bio. pp.422-439.

Hillis, D.M. and Moritz, C. , 1990. Molecular Taxonomy. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA. 236P.

Johansen, S. ; Berg, T. and Moum, T. , 194. Variability and evolution of mitochondrial DNA sequences from marine animals. *In*: Third International Marine Biotechnology Conference, Tromso, Norway, 133P.

Lee, F.X. , 1983. Study on cephalopod fauna in Taiwan Strait. Journal of Oceano-graphy in Taiwan Strait. Vol. 1, pp.103-107.

www.SID.ir

Archive of SID

Lu, C.C. , 1998. Diversity of cephalopoda from the waters around Taiwan. Phuket Marine Biological Center Special Publication , Vol. 18, No. 2, pp.331-340.

Meyer, A. , 1993. Evolution of mitochonderial DNA in fishes. *In*: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2 molecular biology frontiers. Ed. Hochachka. pp.1-33.

Nicholas, K.B. ; Nicholas, H.B. Jr. and Deerfield, D.W. , 1997. Gene Doc: Analysis and visualization of genetic variation, EMBNEW. NEWS 4, 14P.

Ovenden, J.R. ; Brasher, D.J. and White, R..G. , 1992. Mitochondrial DNA analyses of the red rock Lobster (*Jasus edwardsii*) supperts an apparent absence of population subdivision throughout Australia. Mar. Biol., Vol. 112, No. 31, pp.119-326.

Piertney, S.B. ; Hudelot, C. ; Hochberg, F.G. and Collins, M.A. , 2003. Phylogenetic relationships among cirrate octopods (Mollusca:Cephalopoda) resolved using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. Vol. 27, pp.348-353.

Proukazami, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences, University Wales, Swansea. 260P.

Rezavani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the southern Caspian Sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences University of Wales, Swansea. 196 P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1999. Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequence of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from the 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 regions. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol.2, No. 1, pp.13-36.

Taggart, J.B. and Hynes, R.A. , 1998. A simplified protocol for routine total DNA isolation from fishes. Journal of fish biology, Vol. 42, pp.628-639.

Willson, A.C. ; Cann, S.M; George, M. ; Gyllensten, U.B. ; HelmBychowsk, K.M. ; Higuchi, G. ; Palunbie, S.R. ; Prager, E.M. ; Sage, R.D and Stoneking, M. , 1997. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. Vol. 26, pp.375-400.

www.SID.ir

Archive of SID

Gene 18s rRNA variation of cuttlefish population (*Sepia pharaonis*) in the Persian Gulf and the Oman Sea using PCR-RFLP method

Nahavandi R.[1] ; Rezvani, S. [2] ; Vosoughi, Gh. [3] and Kazemi B. [4]

r_Nahavandi2003@yahoo.com

1,2- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

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

4- Cellular and Molecular Biology Research Center, Medical Science Faculty, Shahid Beheshti University, P.O.Box: 19395 Tehran, Iran

Received: December 2004 Accepted: May 2005

Keywords: PCR-RFLP, Cuttlefish, rRNA , Persian Gulf, Oman Sea

Abstract

We used PCR-RFLP method to identify cuttlefish (*Sepia pharaonis*) populations in the Persian Gulf and the Sea of Oman. Bottom trawling method was used to collect a range of 20 to 40 specimens from each 15 stations in the study area. Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method and one pair primer was designed for the analysis based on 18s rRNA gene nucleotide sequences. A PCR product with 502 pair bases in length was obtained for all specimens and subjected to digestion by eight restriction enzymes *Alu*I, *Taq*I, *Mnl*I, *Rsa*I, *Hind*III, *Dra*I, *Pvu*II and *Hae*III. DNA banding patterns in all specimens were similar and no polymorphism was detected among them. We conclude that cuttlefish populations cannot be isolated using 18s rRNA gene extracts in the area of study.

www.SID.ir