Archive of SID

معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی چهار گونه از خانواده گیش ماهیان خلیج‌فارس و دریای عمان به روش PCR-RFLP

سورنا ابدالی[1]*؛ سهراب رضوانی[2]؛ غلامحسین وثوقی[3] ومحمد پورکاظمی[4]

Surena_2004@yahoo.com

۱- دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۹۳۶-۱۹۵۸۵

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

۳ – واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

۴ – انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان ، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۶

چکیده

به منظور معرفی نشانگرهای ژنتیکی چهارگونه از خانواده گیش ماهیان، ۳۲۶ نمونه شامل ۷۸ عدد حلوا سیاه (*Parastromateus niger*)، ۸۵ عدد سارم دهان بزرگ (*Scomberomorus comersoniannus*)، ۷۸ عدد پرستوی هندی (*Trachionotus mookalee*) و ۸۵ عدد گیش ریز (*Caranx para*) جمع‌آوری گردید و DNA آنها به روش فنل-کلروفرم استخراج گردید. سیتوکروم b به کمک دستگاه Thermal cycler (PCR) تکثیر و محصول نهایی ۱۱۰۵Pbp تعیین گردید. در این تحقیق از ۲۷ آنزیم DNAase برای هضم استفاده شد که ۸ آنزیم *Bam HI*، *Alw 26I*، *Rsa I*، *Mbo I*، *Alu I*، *Hinf I*، *Dpn I* و *Dde I* برای قطع محلهای روی ژن استفاده شدند و از بین آنها آنزیمهای *Alu I*، *Hinf I* و *Mbo I* تفاوتهای ژنتیکی بین گونه‌ای (Polymorphism) را نشان دادند و سایر آنزیمها الگوی مشابهی را به نمایش گذاشتند. انواع هاپلوتیپ در چهار گونه مورد مطالعه عبارتند بودند از برای حلوا سیاه هاپلوتیپ BAA، پرستو هندی هاپلوتیپ AAB ، گیش‌ریز هاپلوتیپ ABA و سارم دهان بزرگ هاپلوتیپ ACA بدست آمد و تبارنگار نیز این چهار گونه را کاملاً از هم جدا نشان داده است به نحوی که می‌توان هر یک از هاپلوتیپ‌های مذکور را بعنوان نشانگر ژنتیکی برای شناسایی آنها معرفی نمود.

لغات کلیدی: گیش ماهیان، ،سیتوکروم b، PCR-RFLP، خلیج فارس و دریای عمان، ایران

* نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاکنون ۱۴۰ گونه از خانوادهٔ گیش ماهیان در جهان (Randall & Anderson, 1995) و در آبهای خلیج فارس و دریای عمان ۴۵ گونه شناسایی شده است. این ماهیان دارای ارزش اقتصادی هستند (صادقی، ۱۳۸۰).

با توجه به اینکه میتوکندری منشاء 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 این رو برای تشخیص گروههایی که برای ۱۰، ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند نشانگر خوبی می‌باشد (Berrebi, 1996).

میزان جهش نوکلئوتیدها در mtDNA مهره‌داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است که میزان آن ۲ درصد تغییر به ازای هر یک میلیون سال می‌باشد. (Cronin *et al.*, 1994).

تعدادی از محققین معتقدند که ژن سیتوکروم b یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات تبار شناختی محسوب می‌گردد (Zardoya & Meyer, 1996; Briolay *et al.*, 1998; Danzman *et al.*, 2002).

از مزیت‌های مهم روش RFLP قدرت تشخیص آن می‌باشد و به همین دلیل بعنوان یک روش مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها بکار می‌رود (Chow & Inoue, 1993; Billington & Hebert, 1997; Cronin *et al.*, 1994; Beckenbach, 1991). ماهی Blue gill اولین گونه ماهی بود که جمعیت‌های آن با استفاده از mtDNA و بوسیله روش RFLP مورد بررسی قرار گرفت (Avise, 2000). همچنین پژوهشگرانی نظیر Graves و همکاران در سال ۱۹۸۴ و Bartlett & Dawidson در سال ۲۰۰۱، برای ارزیابی جمعیت‌های تون ماهی اقیانوس اطلس و همچنین Pourkazemi, 1996; Resvani Gilkolaei & Skibinski, 1999; Resvani Gilkolaei, 1997,200 نیز برای تعیین ساختار جمعیتی تاسماهی دریای خزر از این روش استفاده کردند.

Reed و همکاران در سال ۲۰۰۱، مطالعه‌ای روی روابط خویشاوندی گونه‌های متعلق به خانواده گیش ماهیان انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که چهار زیر خانواده Scomberoidini، Carangini، Naucratini و Trachionotini بادقت ۱۰۰ درصد با یکدیگر ارتباط نزدیک خویشاوندی داشته و تمام قبایل حالت تک نیایی از خود نشان می‌دهند. البته این تحقیق براساس آزمون Beyesian Analysis انجام گرفته است و همچنین بررسی‌های Kjima و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی روابط خویشاوندی جنس این گونه‌ها نشان داد که زیر خانوادهٔ Scomberoidini از این قاعده مستثنی است و نیمه حالت تک حیاتی از خود نشان می‌دهند.

هدف از این تحقیق بررسی و معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای چهار گونه از خانوادهٔ گیش ماهیان شامل: حلوا سیاه، سارم دهان بزرگ، گیش ریز و پرستوی هندی بود.

مواد و روش کار

در این بررسی، ۳۲۶ نمونه از چهار گونه متعلق به خانوادهٔ گیش ماهیان (حلوا سیاه؛ سارم دهان بزرگ، گیش ریز و پرستوی هندی) به کمک کشتی‌های فردوس ۱ و لاور ۲ که مجهز به تور ترال‌کف بودند، از ایستگاههای مربوطه جمع‌آوری و نمونه‌برداری‌شدند (جداول ۱ و ۲ و شکل ۱).

حدوداً ۲۰۰ میلی‌گرم از باله‌های هر یک از چهار گونه ماهی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (ساری) منتقل شده است.

استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل- کلروفرم انجام گردیده است (Hillis & Mortiz, 1990). در این روش مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت باله را درون یک میکروتیوپ قرار داده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر STE، ۵۰ میکرولیتر SDS و ۴ میکرولیتر پروتئیناز K (10mg /ml ,Roche) به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۳ تا ۴ ساعت در حمام آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اینکه بافت باله بخوبی حل گردید، مقدار µl ۵۰۰ فنل به آن اضافه و سپس بمدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها در rpm ۱۳۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس لایه رویی را بدقت جدا و به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر منتقل گردید. مقدار µl ۵۰۰ کلروفرم به آن اضافه شد و سپس بخوبی تکان داده و ۲۰ دقیقه همزن و سپس بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد (rpm ۱۳۰۰۰). پس از آن مجدداً لایه روئی را جدا کرده و مقدار µl ۴۰ استات سدیم و حدود ۲ برابر حجم برداشت شده (حدود µl ۸۰۰) الکل مطلق به آن اضافه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. سپس نمونه‌ها پس از چند تکان آرام به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. رسوب شیری رنگ تشکیل شده را با الکل ۷۰ درجه شستشو و پس از خشک کردن مقدار ۵۰µl آب مقطر استریل به آن اضافه شد و بمدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده تا DNA حل گردد.

برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و نیز اشعه UV استفاده گردید و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که فرمول آن به شرح زیر است:

غلظت DNA در محلول (میکروگرم بر میلی لیتر) = میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر × ضریب رقت × ۵۰

نسبت جذب نوری OD260/OD280 در نمونه‌های بین ۱/۷۵ تا ۲ قرار داشت که نشانگر کیفیت خوب DNA نمونه‌هاست. کمیت و کیفیت محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و استفاده از نشانگر (DNA bladder ۵۰ bp plus) بررسی شد.

آغازگر از روی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکرم b ژنوم میتوکندری ماهی گیش ژاپنی *Trachiorus. Japanicus* طراحی گردید (برگرفته شده از: www.ncbi.nlm.nih.gov).

طبق محاسبات محصول عمل PCR با نرم‌افزار Geldodumention ۱۱۰۵جفت باز تخمین زده شد. تعداد نوکلئوتیدهای هر یک از آغازگرها ۱۸ نوکلئوتید بوده که ترکیب آن شامل:

Forward

5′–CTC – CGT – AAA – ACC – CAC – CCC – 3′

OD 260 = 24 µl/ml mw = 5333 length = 18bp

GC Contant 61%

Reverse

5′–CTC – ATC – CTG – CTA – GAG – GCG – 3′

DB 260 = 23 µl/ml mw = 5475 length = 18b

GC Contant-61%

حجم و غلظت‌های مورد استفاده برای انجام PCR عبارتند از:

10xbuffer PCR 6µl, T*aq* DNA polymerase 0.5µl, dNTP 0.5µl, MgCl2 2µl, Pr1 3µl, Pr2 3µl

و حجم با توجه به غلظت DNA بوسیله آب مقطر به ۵۰µl رسانده شد.

بعد از آماده‌سازی، محلول فوق درون دستگاه Thermal cycler قرار گرفته و واکنش PCR با برنامه زیر انجام گرفت. برای جداسازی و تکثیر ژن سیتوکروم b از total DNA با استفاده از جفت آغازگر طراحی شده، ژن مورد نظر از بین ژن‌های استخراج شده از نمونه‌ها تکثیر و ازدیاد پیدا کردند.

مرحله اول : Denaturation (واسرشته سازی) اولیه: در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و در زمان ۵ دقیقه و یک چرخه انجام گرفت.

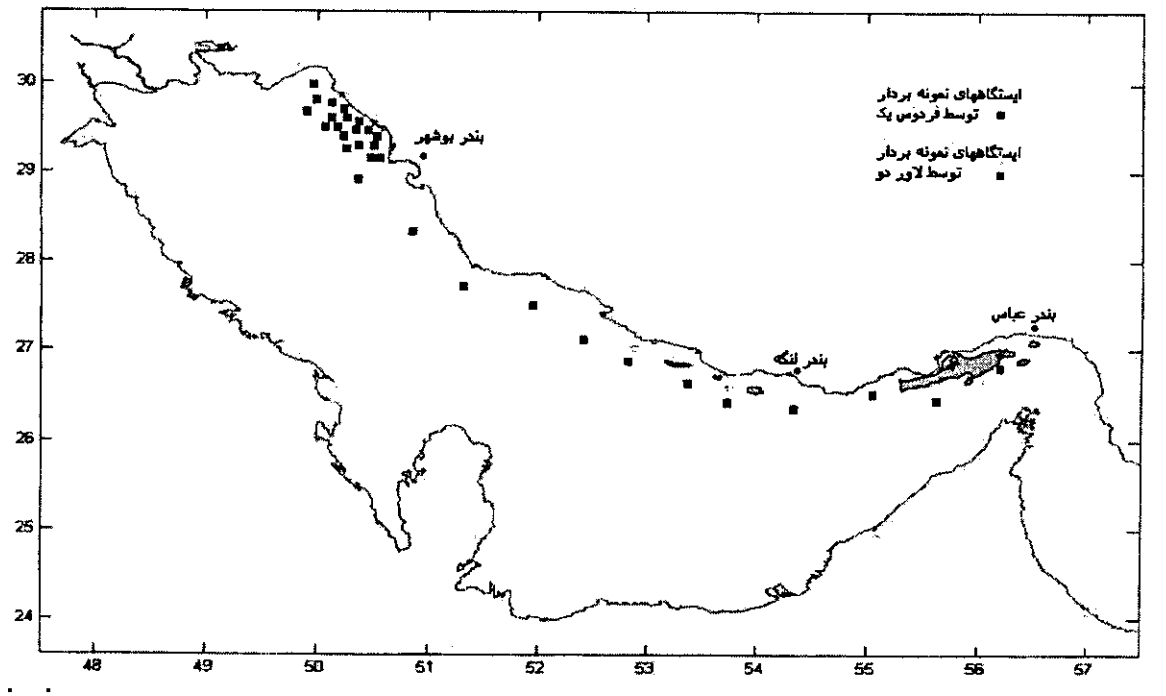
مرحله دوم:

- Denaturation مجدد (واسرشته سازی) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و در زمان ۱ دقیقه، ۳۰ چرخه
- Anealling (اتصال) در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد و در زمان ۵۰ ثانیه، ۳۰ چرخه
- Extension (بسط) در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در زمان ۱ دقیقه، ۱ چرخه

برای انجام آنالیز RFLP و هضم آنزیمی محصول PCR از ۲۷ آنزیم موجود در آزمایشگاه استفاده شد و مشخص گردید که فقط ۸ مورد از آنزیمها در توالی ژن مورد نظر دارای محل قطع بودند که شامل: *Mbo I, Rsa I, Alw 26 I, Alu I, Dde I, Bam H I, Hinf I, Dpn I* می‌باشند. برای این منظور مقدار ۸ میکرولیتر محصول PCR، ۱ میکرولیتر آنزیم و ۲ میکرولیتر بافر آنزیم را در یک میکروتیوب با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و در طول شب درون بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره همراه با نشانگر DNA bladder 50 bp plus مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: نقشه ایستگاههای نمونه‌برداری کشتی فردوس ۱ و لاور ۲ در آبهای خلیج فارس

نتایج

روش فنل- کلروفرم برای استخراج DNA در ۴ گونه ماهی از خانواده گیش ماهیان خلیج‌فارس و DNA استخراجی دارای کیفیت مناسب بود (شکل ۲).

آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن سیتوکرم b برای ماهیانی نظیر پرستوی هندی، حلوا سیاه، سارم و گیش ریز دارای توالی مناسب برای ازدیاد ژن مذکوردر تمام ۴ گونه بوده و برای ۴ گونه اندازه ژن ۱۱۰۵bp بوده است.

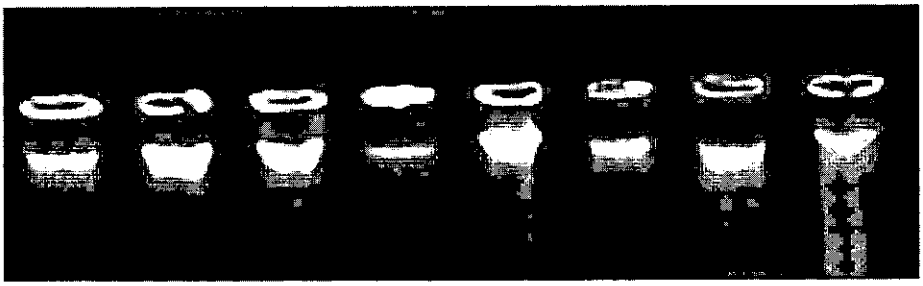
در این تحقیق برای انجام آنالیز RFLP و هضم آنزیمی محصول PCR ابتدا از ۲۷ آنزیم موجود در آزمایشگاه استفاده شد و مشخص گردید که فقط ۸ آنزیم در توالی ژن مورد نظر دارای محل قطع بودند که شامل: *Alw 26 I ،Alu I ،DdeI* *Bam H I ،Hinf I ،Dpn I ،Mbo I ،Rsa I* می‌باشند و از آنها برای هضم آنزیمی محصول PCR ژن هدف استفاده گردید که آنزیم‌های *AluI* و *HinfI* و *MboI* تفاوت‌های ژنتیکی بین‌گونه‌ای (Polymorphism) را نشان دادند و سایر آنزیم‌ها الگوی مشابهی را به نمایش گذاشتند (شکلهای ۳، ۴ و ۵).

آنزیم *Alu I* در هضم نمونه‌های ژن سیتوکرم b در ۴ گونه از ماهی مورد بررسی دو نوع ژنوتیپ را نشان دادند بطوریکه برای حلوا سیاه ژنوتیپ B و برای سایر گونه‌ها ژنوتیپ A. آنزیم *MboI* نیز در این بررسی ۳ نوع ژنوتیپ را از خود نشان داد. بطوریکه حلوا سیاه و پرستوی هندی ژنوتیپ A و گیش ریز ژنوتیپ B و سارم ژنوتیپ C را نشان دادند (جدول ۴).

پس به دلیل این که آنزیمهای فوق 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 و همینطور استفاده از برنامه نرم افزاری Piup افراد هر گونه را در یک گروه و خوشه‌های واحد و مجزا از سایر گونه‌ها قرار داده است (شکلهای ۶ و ۷).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده چهار گونه مورد مطالعه

جدول ۳ : جدول داده‌های ملکولی مورد استفاده در آنالیز کلادیستیک چهار گونه گیش ماهی مورد مطالعه

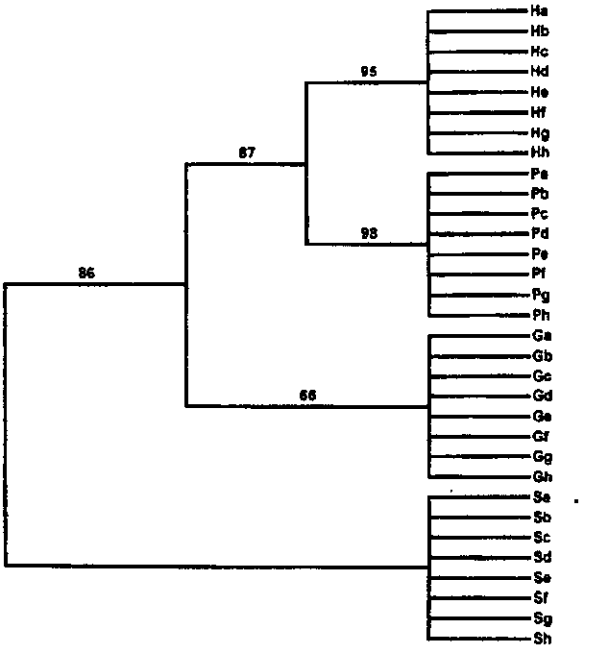
	Alu I	*Mbo I*	*Rsa I*
Parastromateus niger	۱۰۱۰	۰۱۰۱۱۰	۰۱۱۱۰
Trachionotus mookalee	۰۱۱۱	۰۱۰۱۱۰	۱۰۰۱۱
Caranx para	۰۱۱۱	۰۰۱۱۱۱	۰۱۱۱۰
Scomeroides commersonianus	۰۱۱۱	۱۰۰۰۱۱	۰۱۱۱۰

جدول ٤ : انواع هاپلوتیپ‌های بدست آمده در چهار گونه مورد مطالعه و نمونه‌های مختلف مربوط به هرگونه

	Alu I	*Mbo I*	*Rsa I*	هاپلوتیپ
Parastromateus niger	B	A	A	BAA
Trachionotus mookalee	A	A	B	AAB
Caranx para	A	B	A	ABA
Scomeroides commersonianus	A	C	A	ACA

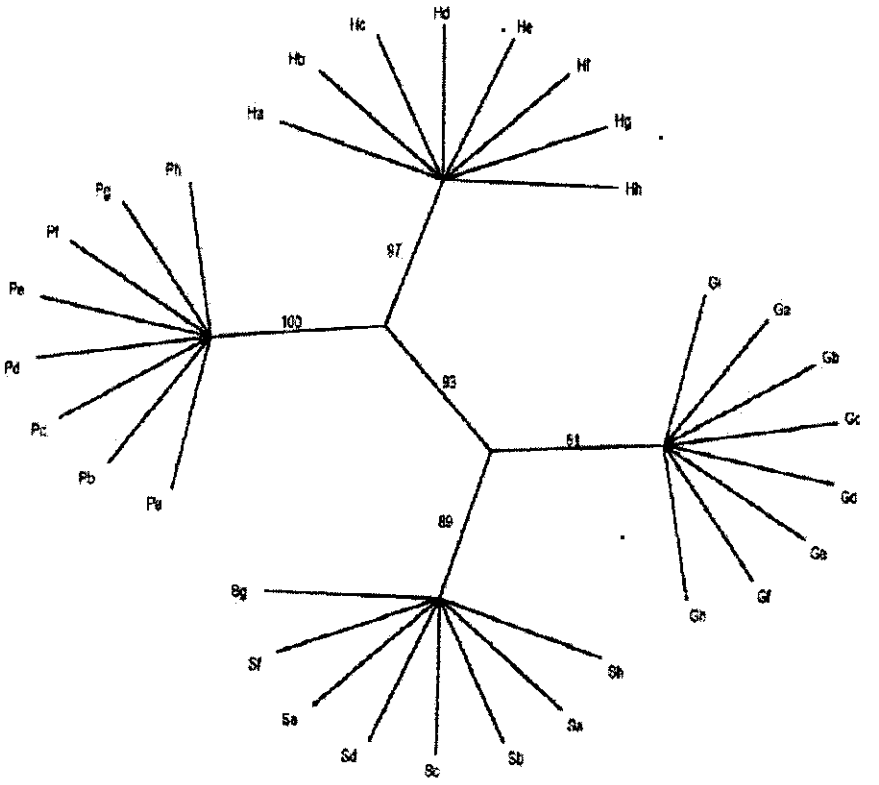
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦: تبارنگار حاصل از انالیز داده‌های مولکولی بوسیله نرم‌افزار **Piup** که ماهی سارم برون گروه فرض شده است.

H: نماینده گونه حلوا سیاه،**P**: نماینده گونه پرستوی هندی، **S**: نماینده گونه سارم و **G** : نماینده گونهٔ گیش ریز می‌باشد.



شکل۷: تبارنگار حاصل از آنالیز داده‌های مولکولی بوسیلهٔ نرم‌افزار **Piup** که بصورت بی‌ریشه رسم شده است.

H: نماینده گونه‌حلوا سیاه، **P**:نماینده گونه پرستوی هندی، **S**: نماینده گونه سارم و **G**: نماینده‌گونه گیش ریز می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در بررسی‌هایی که Reed و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی رابطه خویشاوندی گونه‌های متعلق به خانواده گیش ماهیان (۱۸ گونه) انجام دادند، نشان دادند ژن سیتوکرم b می‌تواند نشانگر ژنتیکی مناسبی باشد. همچنین تک نیایی بودن گونه‌ها را نیز به اثبات رسانده‌اند. استفاده از این ژن توسط Kjima و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام پذیرفت که تقریباً نتایج مشابهی را بدست آوردند.

در مطالعات سیستماتیک و مرفولوژی گونه‌های گیش ماهیان نشان داده شده است که گونه‌هایی نظیر حلوا سیاه، گیش ریز، سارم و پرستوی هندی نمونه‌ها از هم جدا هستند. بدین معنا که تفکیک گونه‌ای انجام شده و متعلق به جنس‌های مختلف می‌باشند (ابدالی، ۱۳۸۳).

رضوانی گیل کلائی در سال ۱۳۸۰ با استفاده از ژن سیتوکرم b توانست هاپلوتیپ‌های اختصاصی را در ذخایر میگوی ببری در آبهای خلیج فارس و دریای عمان معرفی نماید. نتایج مشابهی را پژوهشگرانی نظیر اردلان، ۱۳۸۱ و محمدی کاشانی، ۱۳۸۱ بر روی تمایز گونه‌ای گونه‌های لابستر توسط ژن سیتوکرم b انجام دادند. بطور کلی PCR-RFLP روش مناسبی برای مطالعات سیستماتیک و تاکسونومی است (Chow & Inoue, 1993) و از طرفی تجزیه و تحلیل mtDNA می‌تواند تفاوتهای ژنتیکی را که ممکن است بین گونه‌ها یا جمعیت‌های درون یک گونه وجود داشته باشد، آشکار سازد و از توان قابل ملاحظه‌ای برای حل تناقض رده‌بندی آبزیان برخوردار می‌باشد (Avise, 2000 ;Ngvyan & Ngo, 2001).

در این بررسی از ۲۷ آنزیم مورد استفاده، ۸ آنزیم (*Bam Dde I DpnI Hinf I Alu I MboI Rsa I Alw26 I HI*) برای هضم آنزیمی محصول PCR ژن هدف دارای محل قطع بوده که فقط آنزیم‌های *Hinf I Alu I* و *Mbo I* تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌ای (Polymorphism) را نشان دادند و سایر آنزیم‌ها الگوی مشابهی را به نمایش گذاشتند که از سایر آنزیم‌ها می‌توان برای روابط خویشاوندی استفاده نمود.

سه آنزیم مذکور باعث بروز هاپلوتیپ‌های اختصاصی در تمام افراد هر گونه گردیده است. بنحوی که هاپلوتیپ هر گونه نشانگر ژنتیکی آن گونه است و تشابهی با گونه‌های دیگر ندارد. این هاپلوتیپ‌ها عبارتند از: برای حلوا سیاه BAA، پرستوی هندی هاپلوتیپ AAB، گیش ریز هاپلوتیپ ABA و سارم دهان بزرگ هاپلوتیپ ACA که می‌توان ادغان نمود که هر یک از هاپلوتیپ‌های مذکور را بعنوان نشانگر ژنتیکی برای هر یک از گونه‌ها می‌توان استفاده نمود (رضوانی گیل کلایی و همکاران، ۱۳۸۵). درخت خویشاوندی با برنامه Piup بیانگر این نظریه است که گونه‌های مختلف در شاخه‌های مجزا قرار می‌گیرند و هیچ یک از افراد هر گونه در گونه دیگری مشاهده نمی‌شوند.

سایر آنزیمها همانطور که بیان شد ارزش نشانگری نداشته ولی برای مطالعه روابط خویشاوندی دارای ارزش زیادی می‌باشند. این مطالب با نتایجی که Lin و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مورد قابلیت توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکرم b در شناسایی و تمایز گونه‌ها بدست آوردند کاملاً مطابقت دارد. قابل ذکر است که سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است 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 تبار شناختی (خویشاوندی) بین گونه‌هایی است که از نظر مرفولوژی خیلی بهم نزدیک هستند (Zardoya & Meyer, 1996).

در این بررسی نشان داده شد که ژن سیتوکرم b یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات تبار شناختی (خویشاوندی) محسوب می‌شود و تبار شناختی حاصل از نرم‌افزار piup نشان داد که گونه‌ها از هم جدا هستند و روابط تبار شناختی (خویشاوندی) آنها را نیز بخوبی نمایان ساخت. این نتایج با آنچه که Zardodya و Meyer در سال ۱۹۹۶ و Rezvani Gilkolaei در سال ۲۰۰۰ بدست آوردند، مطابقت دارد.

از این رو پیشنهاد می‌شود آنالیز RFLP با بکارگیری تعداد بیشتر آنزیم اندو نوکلئاز محدودکننده روی رشته DNA این چهار گونه صورت گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به عدم وجود چند شکلی با استفاده از ژن سیتوکروم b و برای اثبات تعلق این نمونه‌ها به یک جمعیت اظهار نظر کرد. همچنین باید برای اثبات تعلق این نمونه‌ها به یک جمعیت واحد، از نشانگرهای دیگر و سایر ژنهای مستقر در mtDNA استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

Introducing genetic markers for four species of Carangidae fishes of Persian Gulf and Oman Sea (Iran) Using PCR-RFLP method

Abdali, S.[(1)*]; Rezvani Gilkolaei, S.[(2)]; Vosoughi, Gh. [(3)] and Pourkazemi, M. [(4)]

Surena_2004@yahoo.com

1- Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, P.O.Box: 19585-936 Tehran, Iran

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

3- Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 14155-4933

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

Received: November 2005 Accepted: November 2007

Keywords: Carangidae, Cytochrome b, PCR-RFLP, Persian Gulf, Oman Sea, Iran

Abstract

In order to introduce genetic markers for four species of fishes, 326 specimens of each species including *Parastrornateus niger* (78), *Scomberomorus comersoniannus* (85), *Trachionotus mookalee* (78) and *Caranx para* (85) were collected. The DNA of the specimens were extracted using phenol-chloroform method. The target gene (cytochrome b) was amplified by Thermal cycle (PCR) and the PCR product size estimated 1105 bp. Out of 27 DNAase enzymes which were used for PCR product enzyme digesting, 8 enzymes (*Bam HI, Alw 26I, Rsa I, Mbo I, Alu I, Hinf I, Dpn I, Dde I*) had cut side on target DNA and three enzymes *Alu I, Hinf I* and *Mbo I* showed polymorphism and genetic differences while other enzymes displayed similar patterns. Variation of haplotypes in the four species were recorded as BAA for *P. niger*, AAB for *T.mookalee*, ABA for *C. para*, and ACA for *S. comersonianus*. We conclude that each of these haplotypes be used as genetic markers for the identification and separation of the species.

* Corresponding author

www.SID.ir