بررسی فیلوژنتیک ۳ گونه از سوف‌ماهیان دریای خزر با استفاده از توالی‌یابی ژن 12s rRNA میتوکندریایی

*مهتاب قریب‌خانی[۱]، محمد پورکاظمی[۲]، لیلا عزیززاده[۲]، کیوان عباسی[۳] و مصطفی تاتینا[۴]

[۱]گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، ایران، [۲]انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران،

[۳]پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی، ایران، [۴]گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۲۸

چکیده

خانواده سوف‌ماهیان یکی از متنوع‌ترین خانواده‌های ماهیان آب شیرین محسوب می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های سیستماتیک قبلی که جنس‌ها و گونه‌های مختلف خانواده سوف‌ماهیان را مورد بررسی قرار می‌دادند بیش‌تر بر پایه خصوصیات ظاهری متکی بوده‌اند. اما امروزه از داده‌های مولکولی به‌طور گسترده‌ای برای این منظور استفاده می‌شود. هدف از این بررسی تعیین روابط فیلوژنی و خویشاوندی ۳ گونه از سوف‌ماهیان دریای خزر شامل: سوف سفید (*Sander lucioperca*)، سوف حاجی‌طرخان (*Perca fluviatilis*) و سوف دریایی (*Sander marinum*) با توالی‌یابی ژن 12s rRNA میتوکندریایی می‌باشد. به این منظور، تعداد ۳ عدد نمونه بالغ از هر یک از گونه‌های سوف سفید و سوف حاجی‌طرخان از تالاب انزلی و ۳ عدد نمونه بالغ سوف دریایی از دریای خزر جمع‌آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید. DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای DNA نمونه‌های موردنظر با استفاده از یک جفت آغازگر ژن 12s rRNA میتوکندریایی انجام گرفت. پس از الکتروفورز، محصول PCR همراه با پرایمرهای موردنظر برای توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. برای تمایز ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنی توالی‌های ژن 12s rRNA میتوکندریایی نمونه‌های ماهیان ذکر شده از نرم‌افزار Mega4 استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که نمونه‌های سوف سفید و سوف دریایی هر دو در یک کلاستر قرار گرفته‌اند و فاصله تکاملی نمونه‌های این ۲ گونه بسیار کم است. نمونه‌های ماهی سوف حاجی‌طرخان نیز با دارا بودن فاصله ژنتیکی قدری بیش‌تر، بر روی کلاستر مجزایی قرار دارند. از سوی دیگر تمامی این سه گونه با فاصله تکاملی زیاد از گونه کپور معمولی قرار گرفته‌اند که این امر می‌تواند تأییدکننده وجود جد مشترک برای این ۳ گونه و به‌عبارت دیگر قرار داشتن آن‌ها در یک خانواده مشترک باشد. از این‌رو نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از روش توالی‌یابی ژن 12s rRNA روشی مناسب و قابل اعتماد در تمایز گونه‌های سوف‌ماهیان دریای خزر است.

واژه‌های کلیدی: سوف ماهیان، فیلوژنتیک، ژن 12s rRNA میتوکندریایی، دریای خزر

مقدمه

خانواده سوف‌ماهیان از ۱۰ جنس و ۱۹۵ گونه از ماهیان آب شیرین تشکیل شده است که همگی ساکن نیم‌کره شمالی کره زمین هستند. از این تعداد بیش از ۱۸۰ گونه متعلق به آمریکای شمالی بوده و تنها ۱۴ گونه در اوراسیا یافت شده‌اند (Nelson، ۱۹۹۴). تاکنون مطالعات مختلفی بر روی روابط فیلوژنیک

* مسئول مکاتبه: m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir

سوف‌ماهیان انجام شده است. این تجزیه و تحلیل‌های سیستماتیک که گونه‌های وابسته به یک نسل و روابط درون‌گونه‌ای خانواده سوف‌ماهیان را مورد بررسی قرار می‌دادند بیش‌تر بر پایه خصوصیات ظاهری متکی بوده‌اند (Page، ۱۹۸۵؛ Wiley، ۱۹۹۲). Collette و Banarescu (۱۹۷۷) اولین افرادی بودند که فرضیه فیلوژنتیک را در سوف‌ماهیان بر پایه خصوصیات ظاهری و داده‌های استخوان‌شناسی مطرح کردند. اما امروزه داده‌های مولکولی به ابزار قدرتمندی برای آشکار کردن روابط تاکسونومیک و مشخص کردن حدود گونه‌ها در گروه‌های بسیار متنوع و حتی ظاهراً مشابه سوف‌ماهیان تبدیل شده است (Zhang و Hewitt، ۲۰۰۳). مواد ژنتیکی از جمله کروموزومی یا خارج از کروموزومی در معرض تغییرات و جهش‌های دایمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون و یا بیرون ارگانیسم در هنگام همانندسازی، سبب جابه‌جایی در ترکیب نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند. در بیش‌تر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود و از آن‌جایی‌که چنین داده‌هایی کم‌تر تحت‌تأثیر انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنی واقعی را نمایان سازند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک براساس ترسیم درخت ژنی ملاکی برای جداسازی جمعیت‌های خاص و تشخیص گونه‌های نیازمند به حفاظت است (Zhang و Hewitt، ۲۰۰۳).

ژنوم میتوکندری به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی به‌کار می‌رود (Arbogast و همکاران، ۲۰۰۲). از این‌رو آنالیز mtDNA می‌تواند تفاوت‌های ژنتیکی را که ممکن است بین گونه‌ها یا جمعیت‌های درون یک گونه وجود داشته باشد، آشکار سازد، بنابراین از توان قابل‌ملاحظه‌ای برای حل تناقض‌های رده‌بندی آبزیان برخوردار است (Briolay و همکاران، ۱۹۹۸). DNA میتوکندریایی (mt DNA) در بسیاری از مطالعات فیلوژنتیک و تاکسونومیک به‌عنوان یک نشانگر مناسب ژنتیکی محسوب می‌شود زیرا میزان جهش در آن بالا بوده و نوترکیبی در آن اتفاق نمی‌افتد (Na-Nakorn و همکاران، ۲۰۰۶). سرعت جایگزینی نوکلئوتیدهای mtDNA در مهره‌داران عالی تقریباً ۱۰–۵ برابر سرعت تعویض در ژنوم هسته است که موجب افزایش قدرت تفکیک در سطح مطالعات جمعیتی شده و حساسیت آن نسبت به کاهش تنوع ژنتیکی در تنگناهای ژنتیکی بیش‌تر است. در mtDNA برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی که از نظر مورفولوژی خیلی به یکدیگر نزدیک می‌باشند از ژن‌های 12s rRNA و 16s rRNA که سرعت تکاملی کند دارند، استفاده می‌شود (هالرمن، ۱۳۸۴).

از آنجایی‌که امروزه توالی‌یابی ژن 12s rRNA میتوکندریایی یکی از بهترین روش‌ها در مطالعات فیلوژنتیک است (Douzery و Catzeflis، ۱۹۹۵؛ Kjer، ۱۹۹۵؛ Lavergne و همکاران، ۱۹۹۶؛ Ledje و Arnason، ۱۹۹۶؛ Douzery و Catzeflis، ۱۹۹۷)، مطالعات مختلفی با استفاده از این روش در زمینه روابط فیلوژنیک گونه‌های مختلف ماهیان در جهان انجام شده است (Simons و Mayden، ۱۹۹۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۱؛ Wang و Lee، ۲۰۰۲؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۴؛ Shivraman و همکاران، ۲۰۰۹؛ Dudu و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به این‌که ماهی سوف دریایی (*Sander marinum*) در هیچ‌یک از مطالعات پیشین مورد بررسی قرار نگرفته است بنابراین این مطالعه برای اولین بار است که با استفاده از توالی‌یابی ژن 12s rRNA میتوکندریایی به‌منظور مطالعه جایگاه گونه سوف دریایی و همچنین بررسی ارتباط فیلوژنتیک سوف‌ماهیان دریای خزر انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳ عدد نمونه بالغ از هر یک از گونه‌های سوف سفید و سوف حاجی‌طرخان از تالاب انزلی و ۳ عدد نمونه بالغ سوف دریایی از دریای خزر جمع‌آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در جوار سد سنگر رشت منتقل شد. DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها به روش استات آمونیوم (چکمه‌دوز قاسمی، ۱۳۸۳) استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای DNA نمونه‌های موردنظر با استفاده از یک جفت آغازگر ژن 12s rRNA به شماره ثبت L14724F و H15918R در NCBI انجام گرفت (Springer و همکاران، ۱۹۹۵). توالی آغازگر Forward و Reverse به‌شرح زیر بود:

Forward primer: 5/ GTG ACT TGA AAA ACC ACC GTT G 3/

Reverse primer: 5/ CTC CAT CTC CGG TTT ACA AGA C 3/

برای آماده کردن مواد مورد نیاز برای PCR ابتدا بافر و محلول‌های dNTP پس از خروج از فریزر در شرایط دمایی اتاق در زیر هود لامینار قرار داده شد تا از حالت انجماد خارج شود. برای یکسان شدن مخلوط، مواد به‌مدت نیم دقیقه ورتکس شد. برای هر نمونه یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید. سپس ترکیبات ضروری برای انجام PCR روی یخ با مقادیر مشخص به ویال‌ها افزوده شد. محتویات ویال‌ها توسط سمپلر خوب به‌هم زده شد و سپس ویال‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند تا محتویات آن‌ها در ته آن‌ها جمع شود. برای بهینه کردن PCR در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به‌دست آمد و در مرحله بعد برای ظاهر شدن خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) غلظت $MgCl_2$، DNA ژنومی و dNTPs بهینه‌سازی گردید. به این منظور برای هر نمونه یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری استریل انتخاب و ترکیبات موردنظر شامل ۳-۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز با غلظت ۵ u/µ، ۱/۲ میکرولیتر DNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر PCR Buffer با غلظت ۱۰X و ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بر روی یخ با افزایش آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر با چرخه‌های حرارتی مشخص شامل ۱ چرخه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی اولیه و در ادامه ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴-۶۲ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط و در نهایت ۱ چرخه به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور مشاهده تک‌باند به‌دست آمده از محصول PCR ژن 12s rRNA میتوکندریایی از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. برای این کار پس از تهیه ژل و قرار دادن آن داخل تانک الکتروفورز، برای هر یک از نمونه‌های ماهی مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۳ میکرولیتر بافر لودینگ داخل هر یک از چاهک‌ها ریخته شد و در یکی از چاهک‌های دیگر به‌منظور تعیین اندازه باندی هر یک از نمونه‌ها از مارکر مولکولی به وزن ۱۰۰ bp استفاده

گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR، طول باند تکثیر شده ۱۰۵۰ جفت باز تعیین گردید. سپس محصول PCR همراه با پرایمرهای موردنظر برای توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. برای تمایز ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنی توالی‌های ژن 12s rRNA میتوکندریایی نمونه‌های ماهیان ذکر شده از نرم‌افزار Mega 4 (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷) استفاده گردید.

نتایج

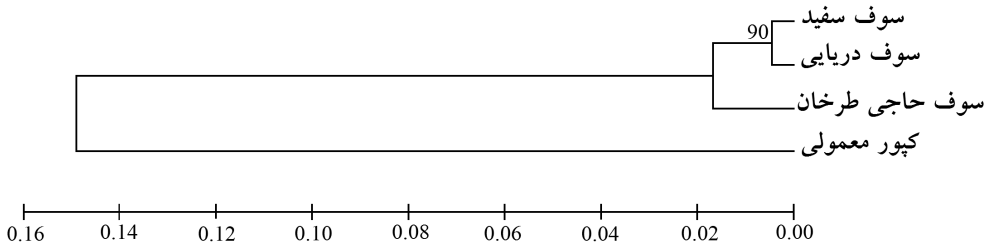
برای مقایسه فراوانی نوکلئوتیدی ژن 12s rRNA در این ۳ گونه ماهی، فراوانی هر یک از بازهای تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 محاسبه گردید (جدول ۱). نتایج به‌دست آمده از بررسی تاریخچه تکاملی نمونه‌های این ۳ گونه ماهی با استفاده از روش رابطه خویشاوندی (Saitou و Nei، ۱۹۸۷) و با در نظر گرفتن بیش‌ترین شباهت ژنتیکی (Tamura و همکاران، ۲۰۰۴) در شکل ۱ ترسیم گردیده است. توالی ژن 12s rRNA ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با شماره ثبت NC-001606 در بانک ژن به‌عنوان گروه خارجی[1] در نظر گرفته شده است. این نمودار نشان می‌دهد که نمونه‌های سوف سفید و سوف دریایی هر دو در یک کلاستر قرار گرفته‌اند و فاصله تکاملی نمونه‌های این دو گونه به‌دلیل طول شاخه ناچیزی که از آن‌ها مشتق می‌شود، بسیار کم است. نمونه‌های ماهی سوف حاجی‌طرخان نیز با دارا بودن فاصله ژنتیکی قدری بیش‌تر، بر روی کلاستر مجزایی قرار دارند. از سوی دیگر تمامی این ۳ گونه با فاصله تکاملی زیاد از گونه کپور معمولی قرار گرفته‌اند که این امر می‌تواند تأییدکننده وجود جد مشترک برای این ۳ گونه و به‌عبارت دیگر قرار داشتن آن‌ها در یک خانواده مشترک باشد. در این شکل مجموع طول کل شاخه‌ها (SBL) که بیانگر مقدار کلی فاصله تکاملی می‌باشد با توجه به مقیاس نشان داده شده در پایین شکل، ۰/۳۲۰ محاسبه شده است.

نتایج به‌دست آمده از بررسی تاریخچه تکاملی این ۳ گونه سوف‌ماهی با استفاده از روش حداکثر رابطه خویشاوندی (Eck و Dayhoff، ۱۹۶۶) و الگوریتم تبادل نزدیک (Nei و Kumar، ۲۰۰۰) نیز در شکل ۲ ترسیم گردیده است. توالی ژن 12s rRNA ماهی کپور معمولی با شماره ثبت NC-001606 در بانک ژن به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. این شکل نیز بیانگر آن است که منشأ این ۳ گونه سوف‌ماهیان مشترک بوده و این گونه‌ها دارای یک جد مشترک در زمان‌های بسیار دور بوده‌اند. همچنین تمامی این گونه‌ها از نظر تاریخچه تکاملی با گونه کپور معمولی فاصله بسیاری دارند.

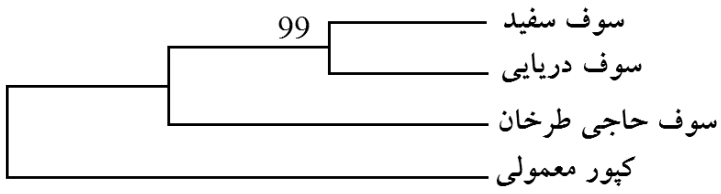
جدول ۱- درصد فراوانی بازهای تیمین (T)، سیتوزین (C)، آدنین (A) و گوانین (G) در توالی‌های به‌دست آمده برای ۳ گونه از سوف‌ماهیان ایران خزر

گونه ماهی	G	A	C	T
سوف سفید	۲۱/۶	۳۱/۰	۲۶/۶	۲۰/۹
سوف دریایی	۲۱/۷	۳۰/۶	۲۶/۳	۲۱/۴
سوف حاجی‌طرخان	۲۲/۰	۳۰/۷	۲۶/۷	۲۰/۶

1- Outgroup



شکل ۱- دندوگرام رابطه خویشاوندی (Neighbor-Joining) براساس روش (Saitou و Nei، ۱۹۸۷) بین نمونه‌های سوف‌ماهیان و کپور معمولی (به‌عنوان Outgroup) با ۵۰۰ بار تکرار (عدد کنار شاخه، درصد تکرار در آزمون bootstrap است)



شکل ۲- دندوگرام حداکثر رابطه خویشاوندی (Maximum Parsimony) براساس روش (Nei و Kumar، ۲۰۰۰) بین نمونه‌های سوف‌ماهیان و کپور معمولی (به‌عنوان Outgroup) با ۵۰۰ بار تکرار

بحث

سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است (Beckenbach، ۱۹۹۱) و ژن 12s rRNA یکی از ژن‌هایی است که برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی که از نظر مورفولوژیکی خیلی به‌هم نزدیک هستند، مناسب می‌باشد (Zardoya، ۱۹۹۸). بنابراین این ژن، یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌شود. در این بررسی ترکیب نوکلئوتیدهای به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن 12s rRNA گونه‌های مختلف سوف‌ماهیان بیانگر درصد بالای نوکلئوتید A نسبت به ۳ نوکلئوتید دیگر (C، G و T) بود. چنین الگویی از ترکیب نوکلئوتیدی در سایر گونه‌های ماهیان نیز به‌طور وسیع گزارش گردیده است (Moyer و همکاران، ۲۰۰۴؛ Liu، ۲۰۰۴). از سوی دیگر نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از روش توالی‌یابی ژن 12s rRNA روش مناسبی در تمایز گونه‌ها است، به‌طوری‌که حتی قادر است دو گونه نزدیک به هم یعنی ماهی سوف سفید و سوف دریایی را از هم متمایز نماید و این مطلب با نتایج مشابهی که در خصوص قابلیت توالی نوکلئوتیدهای ژن 12s rRNA در شناسایی و تمایز گونه‌ها به‌دست آمده است (Simons و Mayden، ۱۹۹۸؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۱؛ Wang و Lee، ۲۰۰۲؛ Shivraman و همکاران، ۲۰۰۹؛ Dudu و همکاران، ۲۰۱۱) کاملاً مطابقت دارد. شکل‌های ۱ و ۲ هر دو بیانگر ارتباط نزدیک گونه‌های ماهی سوف سفید و سوف دریایی می‌باشند. مطالعات سیستماتیک این دو گونه ماهی براساس خصوصیات ریخت‌شناسی نیز نشان‌دهنده این است که هر دو آن‌ها متعلق به زیر جنس *Sander* می‌باشند (کیوانی، ۱۳۸۷). بنابراین نتایج به‌دست آمده از مطالعات ژنتیکی این بررسی با نتایج به‌دست آمده از مطالعات مورفولوژیکی پیشین کاملاً تطابق دارد. پیش از این روابط فیلوژنیک ۲۱ گونه از خانواده سوف‌ماهیان با توالی‌یابی ژن

سیتوکروم b میتوکندریایی توسط Song و همکاران (۱۹۹۸) مورد بررسی قرار گرفت. این اولین بررسی انجام شده بر روی فیلوژنی و تنوع سوف‌ماهیان با استفاده از روش‌های مولکولی بود. آن‌ها ۳ زیرخانواده Percinae (شامل جنس *Perca* و *Gymnocephalus*)، Lucioperсinae (شامل جنس‌های *Sander*، *Zingel* و *Romanichthys*) و Etheostominae (شامل جنس‌های *Ethostoma*، *Percina*، *Ammocrypta* و *Crystallaria*) را برای گونه‌های خانواده سوف‌ماهیان مشخص نمودند. Sloss و همکاران (۲۰۰۴) بار دیگر برای حل کردن مشکلاتی که تقسیم‌بندی Song و همکاران (۱۹۹۸) داشت با استفاده از توالی‌یابی ژن‌های Cyt b و 12s rRNA میتوکندریایی درخت فیلوژنی جدیدی برای ۵۴ گونه از خانواده سوف‌ماهیان ترسیم نمودند که قدری با درخت‌های فیلوژنی پیشین تفاوت داشت. آن‌ها به ۴ شجره تکاملی اولیه شامل زیرخانواده Etheostominae (شامل جنس‌های *Ethostoma*، *Percina*، *Ammocrypta* و *Crystallaria*)، جنس *Perca*، زیرخانواده Lucioperсinae (شامل جنس‌های *Sander*، *Zingel* و *Romanichthys*) و جنس *Gymnocephalus* پی بردند. با این وجود آن‌ها باز هم درخت فیلوژنیک ترسیم شده توسط Song و همکاران (۱۹۹۸) را ترجیح دادند و از پیشنهاد درخت فیلوژنیک جدید خودداری نمودند. نمودارهای فیلوژنتیک به‌دست آمده در این مطالعه نیز شباهت زیادی با درخت فیلوژنتیک به‌دست آمده توسط Song و همکاران (۱۹۹۸) داشت.

در مجموع نتایج به‌دست آمده از این بررسی تا حد زیادی بیانگر یافته‌های پیشین و کارایی بالای ژن 12s rRNA میتوکندریایی در مطالعات مربوط به فیلوژنتیک گونه‌های مختلف سوف‌ماهیان ایران و به‌خصوص گونه سوف دریایی که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بود، می‌باشد.

منابع

۱- چکمه‌دوز قاسمی، ف.، ۱۳۸۳. مقایسه روش‌های استخراج DNA در آبزیان و دستورالعمل کاربردی آن. پایان‌نامه کارشناسی، مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک‌خان (رشت). ۵۳ صفحه.

۲- کیوانی، ی.، ۱۳۸۷. خلاصه رده‌بندی فیلوژنتیکی ماهی‌ها. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحات ۷۵-۷۴,

۳- هالرمن، ا.، ۱۳۸۴. اصول و روش‌های مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول و دوم)، ترجمه ایرج هاشم‌زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر، تهران.

4.Arbogast, B.S., Edwards, S.V., Wakeley, J., Beerli, P., and Slowinski, J.B., 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 33, 707-740.

5.Beckenbach, A.T., 1991. Rapid mtDNA sequence analysis of populations using polymerase chain reaction. Can. J. Fish. Aquac. Sci. 48, 125-134.

6.Briolay, J., Galtier, N., Brito, R.M., and Bouvet, Y., 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 9, 100-108.

7.Collette, B.B., and Banarescu, P., 1977. Systematic and zoogeography of the fishes of the family Percidae. J. Fish. Res. Board Canada. 34, 1450-1463.

8.Douzery, E., and Catzeflis, F.M., 1995. Molecular evolution of the mitochondrial 12S rRNA in Ungulata (Mammalian). J. Mol. Evol. 41, 622-636.

9.Dudu, A., Georgescu, S.E., Popa, O., Dinischiotu, A., and Costache, M., 2011. Mitochondrial 16S AND 12S rRNA sequence analysis in four Salmonid species from Romania. Acta. Zool. Hung. 57 (3), 233-246.

10.Eck, R.V., and Dayhoff, M.O., 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
11.Kjer, K.M., 1995. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. Mol. Phylogenet. Evol. 4, 314-330.
12.Lavergne, A., Douzery, E., Stichler, T., Catzeflis, F.M., and Springer, M.S., 1996. Interordinal mammalian relationships: evidence for paenungulate monophyly is provided by complete mitochondrial 12S rRNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 6, 245-258.
13.Ledje, C., and Arnason, U., 1996. Phylogenetic relationships within Caniform carnivores based on analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. J. Mol. Evol. 43, 641-649.
14.Liu, H., 2004. Phylogenetic relationships of the Cypriniformes tested by mtDNA 12S rRNA sequence variations. Acta Genetica Sin. 31, 137-142.
15.Moyer, G.R., Burr, B.M., and Krajewski, C., 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. Zool. J. Linn. Soc-Lond. 140, 551-575.
16.Na-Nakorn, U., Sukmanomon, S., Nakajima, M., Taniguchi, N., Kamonrat, W., Poompuang, S., and Nguyen, T.T.T., 2006. MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1913) and closely related species: implications for conservation. Ani. Conserv. 9, 483-494.
17.Nei, M., and Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
18.Nelson, J.S., 1994. Fishes of the World. 3 rd edi. John Wiley & Sons Inc., New York.
19.Page, L.M., 1985. Evolution of reproductive behaviors in percid fishes. *IL* Nat. Hist. Surv. Bull. 33, 275-295.
20.Saitou, N., and Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
21.Shivraman, G.K., Barat, A., Kapila, R., Nagappa, K., and Mahanta, P.C., 2009. Molecular phylogeny of cyprinid fishes of India using 12s rRNA gene sequences. IUP J. Gen. Evol. 2 (4), 43-53.
22.Simons, A.M., and Mayden, R.L., 1998. Phylogenetic relationships of the western North American phoxinins (Actinopterygii: Cyprinidae) as inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 9, 308-329.
23.Sloss, B.L., Billington, N., and Burr, B.M., 2004. A molecular phylogeny of the percidae (Teleostei, Perciformes) based on mitochondrial DNA sequence. Mol. Phylogenet. Evol. 32, 545-562.
24.Song, C.B., Near, T.J., and Page, L.M., 1998. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b DNA sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. 10 (3), 343-353.
25.Springer, M.S., Hollar, L.J., and Burke, A., 1995. Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. Mol. Biol. Evol. 12, 1138-1150.
26.Tamura, K., Nei, M., and Kumar, V. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101, 11030-11035.
27.Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., 2007. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA). Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute, Arizona State University. 229p.
28.Wang, H.Y., and Lee, S.C., 2002. Secondary structure of mitochondrial 12S rRNA among fish and Its phylogenetic applications. Mol. Phylogenet. Evol. 19 (2), 138-148.
29.Wang, H.Y., Tsai, M.P., Dean, J., and Lee, S.C., 2001. Molecular phylogenetic relationships of gobiid fishes based on analysis of the mitochondrial 12S rRNA Sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 20, 390-408.

30. Wang, J.P., Lin, H.D. Huang, H., Pan, C.H., Chen, X.L., and Chiang, T.Y., 2004. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes Mol. Phylogenet. Evol. 31, 1143-1156.
31. Wiley, E.O., 1992. Phylogenetic relationships of the percidae (Teleostei: Perciformes): A preliminary hypothesis. In: Mayden, R.L. (Ed.), Systematic, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes. Stanford University Press, Stanford, CA, pp. 247-267.
32. Zardoya, R., and Meyer, A., 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Mol. Biol. Evol. 13, 933-942.
33. Zhang, D.X., and Hewitt, G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Mol. Ecol. 12, 563-584.

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 7, No. 1, April 2013

Phylogeny of 3 species of Caspian Sea Percids inferred from mitochondrial 12s rRNA gene

***M. Gharibkhani[1], M. Pourkazemi[2], L. Azizzadeh[2], K. Abbasi[3] and M. Tatina[4]**
[1]Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Astara Branch, Iran, [2]International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran, [3]Bony Fishes Research Center of the Caspian Sea, Bandar Anzali, Iran, [4]Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Bandar Anzali Branch, Iran

Abstract

The family Percidae is one of the most diverse families of freshwater fishes. Previous systematic analysis (that study the genus and species of Percidae) were mainly based on morphological characters. But nowadays molecular data are used for these purposes extensively. The main objective of this study is determining phylogenetic relationships of 3 species of Caspian Sea Percids including: *Sander lucioperca*, *Perca fluviatilis* and *Sander marinum* inferred from mitochondrial 12s rRNA gene sequencing. For this purpose, 3 adult pike perches were collected from Anzali wetland and 3 adult *Sander marinum* from Caspian Sea. 2 g of each specimen's dorsal fin was removed and stored in 96% ethyl-alcohol. Genomic DNA was extracted and Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted on the target DNA using one pair of 12s rRNA primer. After electrophoresis, PCR product and primers were sent to Genfanavaran Corp. for sequencing. The phylogenic relationships were assessed with Mega 4. The results of this study showed that both *S. lucioperca* and *S. marinum* are located in the same cluster and evolutionary distance of these two species is very low. *P. fluviatilis* with a little more evolutionary distance was located in a distinct cluster. On the other hand, all these three species were located in a separate cluster from *Cyprinus carpio* which confirm the common ancestor for these three species. As a conclusion, the results of this study showed that sequencing mitochondrial 12s rRNA gene is a reliable method to investigate phylogenetic relationships among Caspian Sea percids.

Keywords: Percidae; Phylogeny; 12s rRNA gene; Caspian Sea

* Corresponding Authors; Email: m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir