تفکیک دو سویه‌ی تجاری ماهی قزل‌آلای ایرانی و فرانسوی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

سمیه ایرجی[۱]، رامین مناف‌فر[۲]، ابوالقاسم اسماعیلی‌فریدونی[*۳] و صمد زارع[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۹

چکیده

به منظور شناسایی چندشکلی (پلی‌مورفیسم) موجود در ژن هورمون رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تعداد ۲۰ نمونه‌ی مختلف از دو نژاد ایرانی و فرانسوی تهیه و استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر قطعه‌ی ۱۸۲۵bp ژن هورمون رشد انجام و قطعه‌ی تکثیر شده با استفاده از آنزیم‌های شاخص (*Tag* I، *Hinf* I، *Mbo* 1، *Alu* I، *Hin* III، *Hpa* II و *Nde* I) تحت هضم آنزیمی و الکتروفورز با ژل آگارز ۳ درصد قرار گرفت. در بررسی برش آنزیمی محصول PCR، دو آنزیم *Tag* I و *Alu* I توانستند چندشکلی در الگوی برش آنزیمی در ناحیه‌ی ۴۵۰bp و ۶۰۰bp در آنزیم *Alu* I و ۵۰۰ bp در آنزیم *Tag* I مابین جمعیت ماهیان ایرانی و فرانسوی را نمایان سازند. بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد که آنزیم‌های *Alu*I و *Tag* I می‌توانند به عنوان مارکرهای مولکولی مناسب برای شناسایی این دو جمعیت استفاده شده و در صنعت آبزی‌پروری برای تشخیص دو جمعیت قزل-آلای وارداتی و بومی مفید واقع گردند.

کلمات کلیدی: ژن هورمون رشد، PCR-RFLP، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

شناسایی گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها در برنامه‌های بهره‌برداری از ذخایر آبزیان دریایی، آبزی‌پروری و اصلاح‌نژاد دارای اهمیت زیادی است (Lin et al. 2002). در سال‌های اخیر، پیشرفت علم ژنتیک و نشانگرهای ژنتیکی به روش و ابزاری قابل اعتماد در مطالعات تنوع ژنتیکی و ژنتیک جمعیت بدل شده است؛ به طوری که استفاده از تفاوت در توالی‌های DNA از جمله دقیق‌ترین روش‌ها در طبقه‌بندی موجودات می‌باشند (Hedrick 1999). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گروه‌های مختلف ماهیان مهاجر به رودخانه ممکن است از ساختار ژنتیکی متفاوتی برخوردار بوده که این امر در آزادماهیان متعددی از جمله قزل‌آلای سرفولادی (*Onchorhynchus irdeus*) (Hendry et al. 2002)، ماهی آزاد چام (*O. keta*) (Phelps et al. 1994)، ماهی آزاد سیاه (*O. tschawytscha*) (Adams et al. 1994)، ماهی آزاد صورتی (*O. gorbuscha*) (Smoker et al. 1994) و قزل-آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (Spruell 1994) به اثبات رسیده است. اگرچه رابطه‌ی مثبتی بین رشد لاروها و اندازه‌ی تخم در آزادماهیان به اثبات رسیده و رشد در شروع تغذیه فعال (و تا چهار هفته بعد از شروع تغذیه فعال) به میزان زیادی متأثر از نوع غذا، شدت تغذیه و شرایط محیطی می‌باشد (Moksness et al. 2004)، ولی روند رشد لاروی پس از سپری شدن این دوره تا حد زیادی تحت تأثیر شرایط محیطی و ژنتیکی است. نتایج

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه

[۲] استادیار پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه

[*۳] استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری E-mail: a.esmaeili@sanru.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۴] استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه

Metcalfe و همکاران در سال ۱۹۹۲ در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) نشان داد که تفاوت رشد لاروی علی‌رغم مشابه بودن اندازه‌ی اولیه لارو و شرایط محیطی یکسان، احتمالاً به میزان فعالیت متابولیکی، سن مهاجرت بچه ماهی به دریا و عوامل ژنتیکی مرتبط است.

امروزه جهت بررسی و شناسایی ژنوتیپ گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف از تکنیک‌های مبتنی بر PCR از قبیل RAPD (Williams et al. 1990)، ماکروستلایت‌ها و مینی‌ستلایت‌ها، RFLP (Cronin et al. 1994) و تعیین توالی نوکلئوتیدها استفاده می‌شود. اگرچه روش مستقیم و تعیین توالی DNA توانسته که بسیاری از مشکلات را مرتفع نماید؛ ولی این روش گران‌قیمت و وقت‌گیر بوده و به همین دلیل روش آنالیز RFLP نسبت به شناسایی توالی DNA اقتصادی‌تر و برای قضاوت بر اساس صفات مرفولوژیک موفق‌تر می‌باشد، به طوری که در سال‌های اخیر آنالیز RFLP روش مطمئنی برای مطالعات سیستماتیک و تعیین مارکرهای ژنتیکی گونه‌ها و آنالیز جمعیت‌ها محسوب شده است (Cronin et al. 1994, Rezvani Gilkolaei 2000).

علاوه بر ژنوم هسته‌ای، ژنوم میتوکندری در مطالعات ژنتیک جمعیت و تکامل به دلیل تعداد کپی بالا، سادگی جدا شدن از ژنوم، اندازه‌ی کوچک آن (۱۶۵۰۰±۵۰۰bp) و انبوهی از موتاسیون‌ها دارای اهمیت است (Billington and Hebert 1998). برای تشخیص گونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان و سالمون آتلانتیک، تکنیک PCR-RFLP برای ژن *CO* II میتوکندریایی به کار می‌رود که در مقایسه با تکنیک‌های دیگر مثل سکانس مستقیم محصولات PCR یا آنالیز معمولی mtDNA، PCR-RFLP روش مفیدی برای آنالیز تعداد زیادی از گونه‌ها محسوب می‌گردد (Carrera et al. 1999). Burgener و Hubner در سال ۱۹۹۸ پرایمرهایی را طراحی کردند که ژن سیتوکروم b میتوکندریایی را بسط داده و با استفاده از آنالیز RFLP موجب تشخیص طیف وسیعی از ماهیان (تن، سالمون و کفشک) گردید.

امروزه صنعت آبزی‌پروری به استفاده از گونه‌های سریع‌الرشد با درصد بازماندگی و کیفیت بالا نیاز داشته و به همین دلیل جمعیت‌های سریع‌الرشد اهمیت اقتصادی و تجاری زیادی را به خود اختصاص دادند، بنابراین شناسایی جمعیت‌های سریع‌الرشد پیش از آغاز یک دوره‌ی مولدگیری و پرورش آبزیان بسیار اقتصادی و مهم می‌باشد. در یک دهه‌ی اخیر چند جمعیت از قزل‌آلای رنگین‌کمان با سرعت رشد و بازماندگی بهتر در مقایسه با جمعیت‌های بومی به صنعت آبزی‌پروری کشور وارد شدند که امکان شناسایی مرفولوژیک این جمعیت‌ها حتی با استفاده از اختلاف جزئی در رنگ‌بندی آن‌ها تقریباً غیرممکن به نظر می‌رسد. زیرا، بسیاری از این اختلافات ظاهری کاملاً وابسته به نوع تغذیه و شرایط اقلیمی پرورش می‌باشند. از سویی، با توجه به مسأله تقلب یا اشتباه احتمالی (به صورت عمدی یا تصادفی) در جای‌گذاری و فروش یک گونه یا جمعیت ماهی با سرعت رشد بالا با گونه یا جمعیتی با سرعت رشد پایین، اهمیت شناسایی جمعیت‌های این ماهیان به منظور معرفی جمعیتی با شرایط رشدی بهتر به شدت احساس می‌گردد (Carrera et al. 1999). استفاده از تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر بررسی‌های الکتروفورزی پروتئین و DNA احتمالاً بتواند به عنوان راهکاری مناسب جهت مرتفع کردن این معضل به شمار رود. در تکنیک PCR-RFLP، برخی تفاوت‌های مولکولی مرتبط با ژن هورمون رشد (Growth hormone) به عنوان دلیل سرعت رشد بیش‌تر، بازماندگی و سازگاری اسمزی بالاتر در برخی از جمعیت‌های ماهیان است (Mc Cormick 2001, Gomez et al. 1998). هورمون رشد در محور هیپوفیز سنتز شده و دارای یک زنجیر پلی‌پپتیدی با دو باند دی سولفید درون مولکولی است (Din et al. 2008). این هورمون به عنوان یک عامل محرک رشد در افزایش رشد و نمو عمومی بدن و بسیاری از عملکردهای متابولیکی ماهیان در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌گردد (Zohar et al. 1989). با توجه به اهمیت ژن هورمون رشد، در این مطالعه چندشکلی (پلی‌مورفیسم)

موجود در این ژن در دو نژاد ایرانی و فرانسوی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان مارکر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارتباط با صفات رشدی بررسی گردید.

مواد و روش کار

در این مطالعه، ۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلا از دو نژاد ایرانی و فرانسوی (۱۰ قطعه به ازای هر نژاد) بررسی شدند. این نمونه‌ها در وزن یکسان ۲۰±۲۰۰ گرم، طول کل ۴±۲۷ سانتی‌متر و شکل مرفولوژیک و ظاهری کاملاً یکسان بودند. از هر ماهی حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بخش‌های نرم بافت عضله برداشته و سپس DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle 1990). پس از خشک شدن DNA، حدود ۳۵ میکرولیتر بافر TE به آن اضافه و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید. جهت سنجش کمیت و کیفیت DNA از روش بیوفتومتری استفاده شد. برای بسط و تکثیر ژن GH از پرایمرهای اختصاصی ژن GH استفاده شده که توالی جفت بازهای آن به صورت زیر است (Gross and Nilsson 1999):

Forward: (5' -atg-gga-caa-ggt-aag-cct - 3')
Reverse: (5' -gaa-gct-cag-cga-cct-caa- 3')

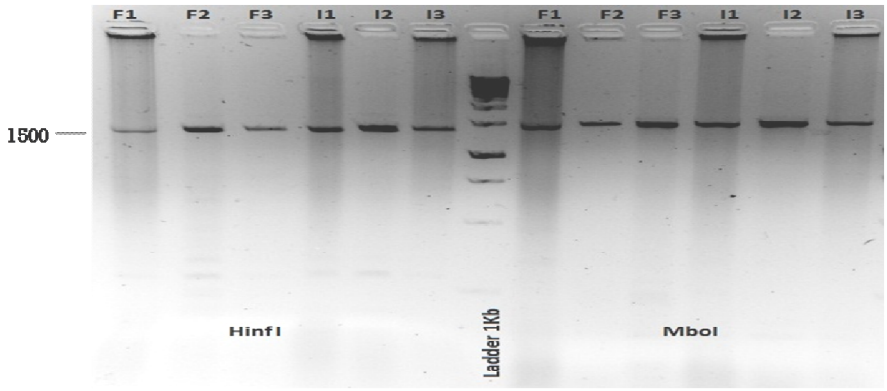
تکثیر جایگاه‌ها توسط واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵ میلی-مولار)، یک میکرولیتر بافر پی‌سی‌آر (X ۶)، ۰/۸ میکرولیتر نوکلئوتیدها (۲/۵ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Tag و آب دیونیزه تا رسیدن به حجم در دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (مرحله‌ی واسرشت شدن اولیه)، ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته شدن)، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (بسط) و یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (Gross and Nilsson 1999). محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد جداسازی و پس از تهیه تصویر با دستگاه ژل داک، از تکثیر ژن اطمینان حاصل گردید.

جهت نشان دادن پلی‌مورفیسم در فراگمنت ۱۸۲۵bp، تعداد ۵ آنزیم *Hpa II* ، *Hinf I* ،*Mbo I* ،*IAlu* ،*ITag* که باعث به وجود آمدن برش کامل در قطعه‌ی مورد نظر می-شوند به کار رفت (Gross and Nilsson 1999). برای به کارگیری هر یک از این آنزیم‌ها تمام نمونه‌های مربوط به هر جمعیت که قبلاً PCR شده بودند آماده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با غلظت اشاره شده در برگ راهنمای هر نمونه به کار گرفته شدند.

مواد مذکور به انکوباتور جوش (حمام آبی) منتقل و جهت هضم آنزیمی در ۴ آنزیم *Hinf* I، *Mbo* I، *Alu* I و *Hpa* II، دما روی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت و در آنزیم *Tag* I، دما روی ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت تنظیم گردید. جهت جلوگیری از تبخیر مواد، درب میکروتیوب‌ها با پارافیلم محکم گردید. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر، مقدار ۴-۳ میکرولیتر محلول لودینگ به هر یک از نمونه‌ها اضافه و بر روی ژل ۳ درصد الکتروفورز شدند. باندهای به دست آمده بعد از انجام عمل الکتروفورز روی ژل مورد نظر در زیر اشعه‌ی UV بررسی شدند.

نتایج

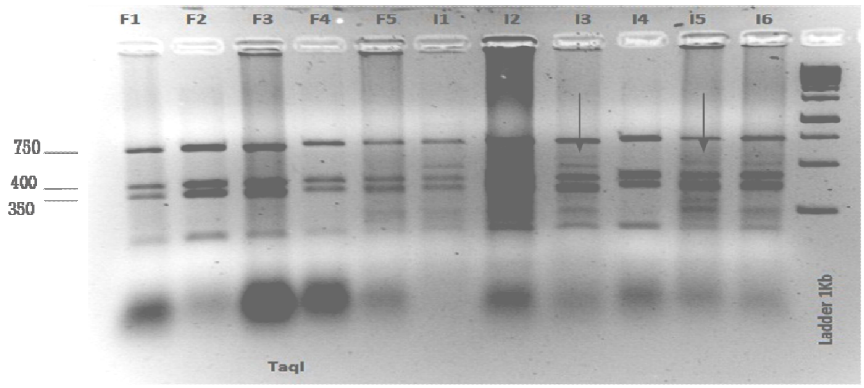
بعد از تکثیر قطعه‌ی ۱۸۲۵bp ژن هورمون رشد، برش آنزیمی توسط آنزیم‌های شاخص (*Tag* I، *Hinf* I، *Mbo* I، *Alu* I، *Hpa* II) انجام و سپس رنگ‌آمیزی و عکس-برداری شد (اشکال ۴-۱). برش آنزیمی با دو آنزیم *Hinf 1* و *Mbo* 1 اختلافی را نشان نداد و هیچ‌گونه برشی انجام نگرفته بود (شکل ۱).



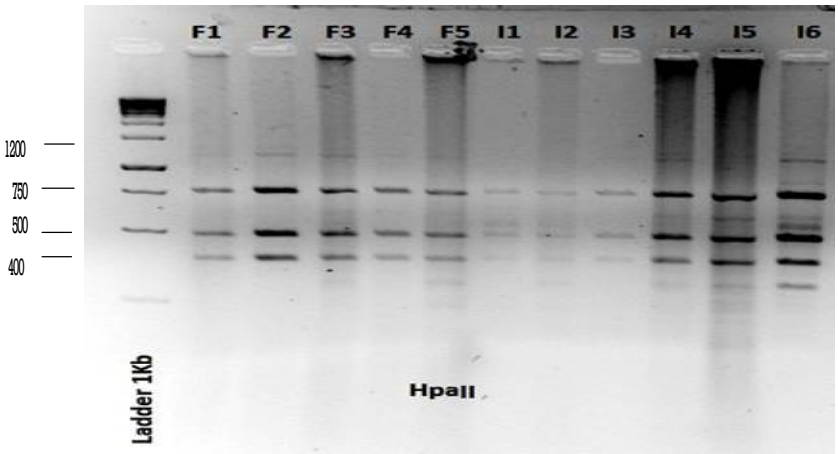
شکل ۱: الکتروفورز محصول برش آنزیمی ژن هورمون رشد ماهی قزل‌آلا، با دو آنزیم *Mbo* 1 و *Hinf* 1. نمونه‌های F1-F3 مربوط به قزل‌آلای نژاد فرانسوی و نمونه‌های I1-I3 مربوط به نژاد ایرانی این ماهی می‌باشند.

برش آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *Tag* 1 روی محصول PCR اختلاف الگوی برشی در ناحیه‌ی 500bp در نژاد ایرانی را نشان داد.

در برش با آنزیم‌ها *Hpa* II مشخص شد که الگوی برشی یکسانی در تمام نمونه‌ها وجود داشته و اختلافی مشاهده نگردید.

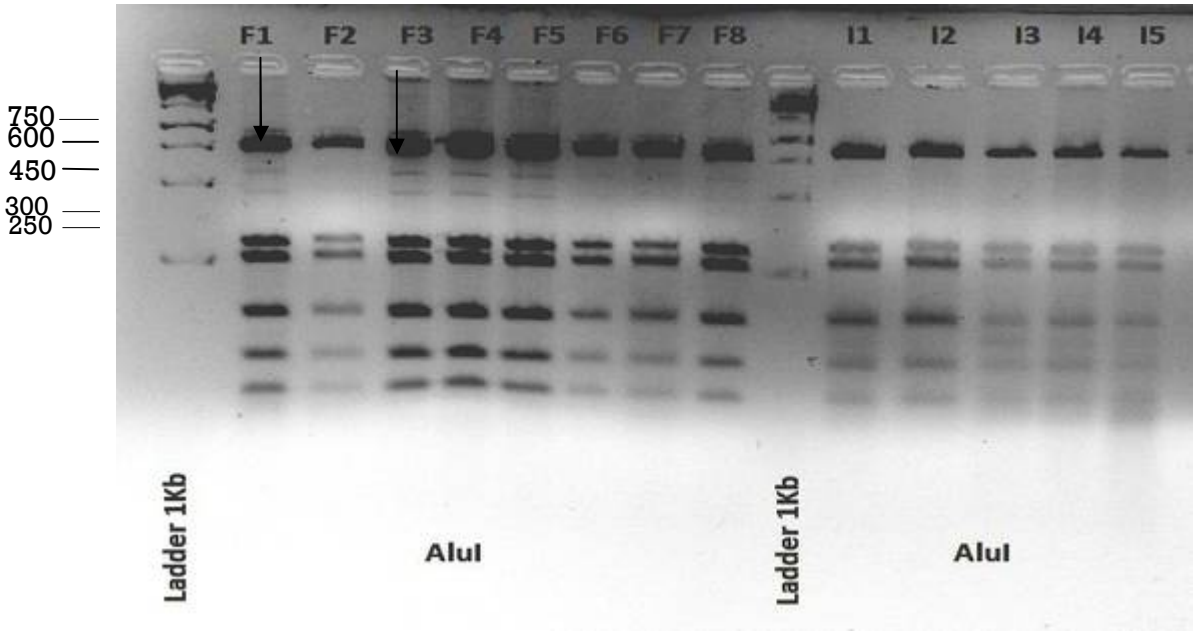


شکل ۲: الکتروفورز محصول برش آنزیمی ژن هورمون رشد ماهی قزل‌آلا، با آنزیم *Tag* I.به ترتیب نمونه‌های F1-F5 مربوط به نژاد فرانسوی ماهی قزل‌آلا و نمونه‌های I1-I6 مربوط به نژاد ایرانی این ماهی می‌باشند. نوک فلش نمایانگر اختلاف موجود بین دو نژاد می‌باشد.



شکل ۳: الکتروفورز محصول برش آنزیمی ژن هورمون رشد ماهی قزل‌آلا با آنزیم *Hpa* II. نمونه‌های F1-F5 مربوط به نژاد فرانسوی ماهی قزل‌آلا و I1-I6 مربوط به نژاد ایرانی این ماهی می‌باشند.

برش آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *Alu* I بر روی قطعه مورد نظر با وزن ۱۸۲۵bp نشان داد که برش آنزیمی به خوبی در تمام نمونه‌ها انجام گرفته و دو باند به اندازه ۴۵۰bp و ۶۰۰bp در نژاد فرانسوی مشاهده گردید که بیانگر اختلاف بین نمونه‌های دو جمعیت ایرانی و فرانسوی می‌باشد.



شکل ۴: الکتروفورز محصول برش آنزیمی ژن هورمون رشد ماهی قزل‌آلا، با آنزیم *Alu*I به ترتیب نمونه‌های F1-F8 مربوط به نژاد فرانسوی و I11- I15 مربوط به نژاد ایرانی ماهی قزل‌آلا می‌باشند. نوک فلش نمایانگر اختلاف موجود بین دو نژاد می‌باشد.

اثرات کلی هر ۵ آنزیم مورد مطالعه نشان می‌دهد که آنزیم *Alu* I در دو جایگاه ۴۵۰bp و ۶۰۰bp و آنزیم *Tag* 1 در جایگاه ۵۰۰bp از توانایی تفکیک بیش‌تری نسبت به سایر آنزیم‌ها برخوردار هستند.

بحث

اهمیت حفاظت از گونه‌های بومی در صنعت در حال گسترش پرورش مصنوعی موجودات از دغدغه‌های محققین است. از طرفی شناسایی موجودات سریع‌الرشد پیش از آغاز پروسه‌ی مولدگیری و پرورش صنعتی موجودات نیز اهمیت اقتصادی فراوانی را به خود اختصاص می‌دهد.

تکنیک RFLP علاوه بر توانایی تشخیص گونه‌های ماهیانی که فرآیندهای طولانی را متحمل شده و احتمالاً در اثر این پروسه تجزیه شدند، دارای توانایی تشخیص چندین گونه در یک محصول نیز می‌باشد (Rehbein 1990). در مطالعه‌ی حاضر، سویه‌های مختلف بر اساس پلی‌مورفیسم ژن هورمون رشد تشخیص داده شده به طوری که این ژن به عنوان یک مارکر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارتباط با صفات رشد استفاده شد. DNA استخراج شده از دو جمعیت به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافته و برش با استفاده از آنزیم‌های برش‌گر نشان داد که از بین آنزیم‌های محدودکننده، آنزیم *Alu*I و آنزیم *Tag* I قادر به شناسایی تفاوت‌های دو جمعیت هستند. مطالعه‌ی Kocour و Kohlman در سال ۲۰۱۱ در بررسی پلی‌مورفیسم ژن هورمون رشد در لای ماهی (*Tinca tinca*) با دو روش PCR_RFLP و همسان‌سازی اختلاف موجود در ساختار ژنتیکی ژن هورمون رشد در ۱۷ نمونه از ۱۲ جمعیت مختلف نشان داد که در مجموع ۱۳ هاپلوتیپ مختلف در جمعیت‌های گوناگون مشاهده شده و بر این اساس کل جمعیت‌های لای ماهی را به دو کلاس اروپای شرقی و

اروپای غربی تقسیم نمودند. Alumy و همکاران در سال ۲۰۰۰ با توالی‌یابی و آنالیز ژن هورمون رشد در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) مینی‌ستلایت‌هایی را شناسایی کردند که در جایگاههای ۴۰۵، ۴۲۴، ۶۳۶ و ۷۲ قرار داشته که این چندشکلی‌ها باعث ایجاد تنوع در اندازه‌ی قطعات تکثیری گردید. لذا نتایج مطالعه‌ی حاضر مبنی بر وجود تفاوت‌های فاحش در ژن GH در جمعیت‌های مختلف از گونه‌های ماهی با نتایج محققین فوق‌الذکر مطابقت دارد که موجب تمایز و تشخیص جمعیت‌های مختلف ماهی می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر، آنزیم محدودالاثر *Tag* I باعث ایجاد پلی‌مورفیسم در ژن GH در قزل‌آلای رنگین‌کمان شده که از این نظر با یافته‌های Gross و Nilsson در سال ۱۹۹۹ در ماهی سالمون آتلانتیک بر روی ژن GH با استفاده از تکنیک PCR_RFLP و استفاده از آنزیم محدودالاثر *Tag* I مطابقت دارد.

آنزیم‌های محدودکننده‌ی (*Nla* III، *Dde*I، *Hae*III، *Mbo*II و *Hinf* I) در تشخیص گونه‌هایی از خانواده‌ی سالمون استفاده شدند، به طوری که در این میان آنزیم *Hinf* I به عنوان بهترین آنزیم برای تشخیص گونه‌های ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) معرفی گردید (Nebola et al. 2010). در تحقیق حاضر، از آنزیم *Hinf* I به عنوان آنزیم محدودکننده بر روی ژن GH استفاده گردید ولی هیچ‌گونه برشی بر روی قطعه‌ی مورد نظر انجام نگرفته و نتوانست پلی‌مورفیسم را نمایان سازد. تصور می‌شود که این آنزیم احتمالاً برای تشخیص گونه‌ها و یا حتی سویه‌های مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان از کارآیی و عملکرد مناسبی برخوردار نبوده و تنها برای انواعی از گونه‌های خانواده سالمون از جمله ماهی آزاد اقیانوس اطلس کاربرد داشته باشد.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌توان پیشنهاد نمود هضم آنزیمی محصول PCR هورمون رشد با آنزیم‌های *Alu*I و *Tag* I می‌تواند به عنوان مارکرهای مولکولی مناسب جهت شناسایی دو جمعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان ایرانی و فرانسوی و برای تشخیص این دو جمعیت (قزل-آلای وارداتی و بومی) که در سال‌های اخیر به شدت در صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور مطرح شدند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله از کلیه‌ی مساعدت‌های اساتید و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه جهت انجام بخش‌های مختلف این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Adams, N.S.; Spearman, W.J.; Burger, C.V.; Currens, K.P.; Schreck, C.B. and Li, H.W. (1994). Variation in mitochondrial DNA and allozymes discriminates early and late forms of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsha*) in the Kenai and Kasil of Rivers, Alaska. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 51(1): 170-179.

Alumy, R.; Cavari, B.; Ferstman, H.; Kolondy, O. and Funkenstein, B. (2000). Genomic structure and sequence of the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding gene: Identification of mini-satellite polymorphism in intron 1.Genome, 43: 836-845.

Billington, N. and Hebert, P.D.N. (1998). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences, 48: 80-94.

Burgener, M. and Hubner, P. (1998). Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 207(4): 261-263.

Carrera, E.; Garcia, T.; Cespedes, A.; Gonzalez, I.; Sanz, B.; Hernandez, P.E. and Martin, R. (1999). Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Food Protection, 61: 482-486.

Cronin, M.A.; Hilis, S.; Born, E.W. and Potton, C. (1994). Mitochondrial DNA variation in Atlantic and Pacific walruses. Canadian Journal of Zoology, 72(6): 1035-1043.

Din, S.Y.; Hurvitz, A.; Goldberg, D.; Jackson, K.; Levavi-Sivan, B. and Degani, G. (2008). Cloning of Russian sturgeon (*Acipenser guldenstaedtii*) growth hormone and insulin-like growth factor 1 and their expression in male and female fish during the first period of growth. Journal of Endocrinological Investigation, 31(3): 201- 210.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

Gomez, J.M.; Loir, M. and Le Gac, F. (1998). Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction, 58(2): 483-491.

Gross, R. and Nilsson, J. (1999). Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. Aquaculture, 173: 73-80.

Hedrick, P.W. (1999). Genetic of Populations. 2rd ed. Jones and Batlitt Publishers. MA, pp: 56-64.

Hendry, M.A.; Wenburg, J.K.; Myers, K.W. and Hendry, A.P. (2002). Genetic and phenotypic variation through the migratory season provides evidence for multiple population of wild steelhead in the Dean River, British Colombia. Transactions of the American Fisheries, 131(3): 418-434.

Kocour, M. and Kohlmann, K. (2011). Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture, 310: 298-304.

Lin, Y.S.; Poh, Y.P.; Lin, S.M. and Tzeng, C.S. (2002). Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological Studies, 41(4): 421-430.

McCormick, S.D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. American Zoologist, 41(4): 781-794.

Metcalfe, N.B.; Wright, P.J. and Thorpe, J.E. (1992). Relationships between social status, otolith size at first feeding and subsequent growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Animal Ecology, 61(3): 585-589.

Moksness, M.; Kjorsvik, E. and Olsen, Y. (2004). Culture of cold-water marine fish. Blackwell Publishing. pp: 164-243.

Nebola, M.; Borilova, G. and Kasalova, J. (2010). PCR-RFLP analysis of DNA for the differentiation of fish species in seafood samples. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 54: 49-53.

Phelps, S.R.; LeClair, L.L.; Yong, S. and Blankenship, H.L. (1994). Genetic diversity patterns of chum salmon in the Pacific Northwest. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51: 9-15.

Rehbein, H. (1990). Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung, 191: 1-10.

Rezvani Gilkolaei, S. (2000). Study of mitochondrial DNA variation of Russian sturgeon population from the south Caspian Sea using RFLP analysis PCR amplified ND 5/6 gene regions. Iranian Journal of Fisheries Science, 2(1): 13-36.

Smoker, W.W.; Gharret, A.J.; Stekoll, M.S. and Joyce, J.E. (1994). Genetic analysis of size in anadromous population of pink salmon. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51: 9-15.

Spruell, P.; Cummings, S.A.; Kim, Y. and Thorgaard, G.H. (1994). Comparison of three anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations using DNA fingerprinting and mixed DNA samples. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51: 252-257.

Williams, J.G.K.; Kubelic, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.

Zohar, Y. (1989). Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth and smoltification. Fish Physiology and Biochemistry, 7(1): 395-405.

Identification of two commercial strains of Iranian and French rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-RFLP technique

Iraji, S.[1]; Manaffar, R.[2]; Esmaeili Fereidouni, A.[3] and Zareh, S.[4]

Received: 04.11.2014 Accepted: 18.04.2015

Abstract

In order to identify polymorphisms in the growth hormone gene for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a total of 20 different samples were prepared from both Iranian and French populations and DNA extraction was performed using CTAB method. The polymerase chain reaction (PCR) was amplified fragment of 1825 bp the growth hormone gene. The amplified fragments were using enzymes including. Tag I, *Hinf* I, *Mbo*1, *Alu*I, *Hin*III, *Hpa*II and *Nde*I and fractionated on the 3% agarose gelelectrophoresis. In enzymatic digestion of the PCR products, *Alu* I and *Tag* I enzymes show polymorphism with a new pattern in 450 and 600 bp (by *Alu* I) and a new 500 bp (by *Tag*I) which was different among Iranian and French populations. According to the present results, we could suggest that the enzymes *Alu*I and *Tag*I can be used as molecular markers for the identification of these two populations; and also be useful to distinguish between imported and native trout populations in aquaculture industry.

Keywords: Growth hormone gene, PCR-RFLP, Rainbow trout

1- MSc Graduated of Animal Physiology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant Professor, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran
4- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Esmaeili Fereidouni, A., E-mail: a.esmaeili@sanru.ac.ir