

مقایسه تنوع ژن سیتوکروم b در ماهیان شاه کولی (Alburnus chalcoides) رودخانه‌های هراز، شیروود و گزافرود به روش PCR-RFLP

حسین رحمانی^{*}، بهرام کاظمی^۲، محمد پورکاظمی^۳

- ۱- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۲- استاد مرکز تحقیقات بیولوژی، سلوی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.
۳- دانشیار انسستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shemaya1975@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۸)

چکیده

در این بررسی ۲۱ نمونه ماهی شاه کولی *Alburnus chalcoides* از رودخانه‌های هراز، شیروود و گزافرود در استان‌های مازندران و گیلان صید شدند. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت باله ماهی‌ها انجام شد. براساس توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ماهی شاه کولی یک جفت پرایمر طراحی گردید و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد که نتیجه محصول ۸۳۱ PCR *BamHI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *DNAasis*, *HinfI*, *PpuMI*, *RsaI*, *Tsp45I*, *TaqI* جفت باز بوده است. به کمک نرم افزار *Aznzymes* آنژیم‌های *TaqI* در تمام نمونه‌های مورد مطالعه غیر از الگوهای برشی آنژیم در ماهیان رودخانه گزافرود یکسان بوده است. بر این اساس می‌توان گفت که پدیده پلی‌مریسم با استفاده از آنژیم‌های فوق و ژن سیتوکروم b در ماهی شاه کولی قابل مشاهده نبوده و نمونه‌ها به کمک این ژن و این تکنیک به یک جمعیت تعلق داشته و تمام افراد از ژنوتیپ یکسان برخوردار می‌باشند.

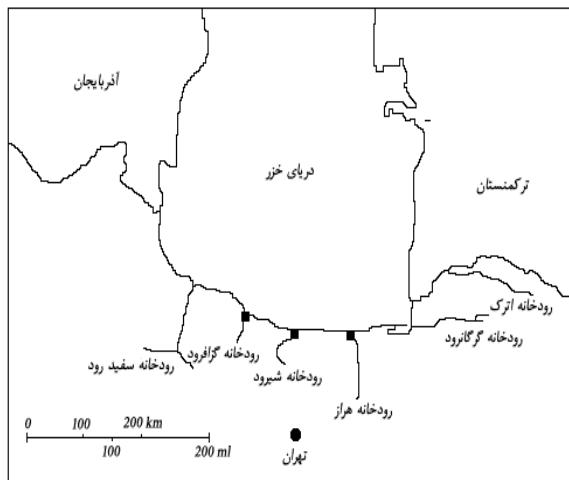
واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
b سیتوکروم
A. chalcoides شاه کولی
PCR- RFLP

مقدمه

گونه شاه کولی *A. chalcoides* از گونه‌های بتپولازیک بوده و در آبهای لب سور و شیرین زندگی می‌کند و برای تولید مثل به رودخانه‌ها مهاجرت می‌نماید (Slastenenko 1955). این گونه دارای پراکنش وسیعی در رودخانه‌های حوزه دریایی خزر، آرال و سیاه می‌باشد (1997 Bogutskaya). شاه کولی یک ماهی ریزجثه و مورد پسند مردم شمال ایران است که از اواخر فروردین تا اواخر تیر جهت تولید مثل وارد رودخانه‌های حوزه جنوبی دریایی خزر می‌شوند (Rahmani 2006; Berg 1949). میزان صید این ماهی در سال‌های اخیر در سواحل خزر کاهش یافته است (Ghaninejad et al. 2000). تاکنون روش‌های متعددی برای شناسایی ذخایر آبزیان بکار رفته، امروزه از مطالعات مولکولی جهت تفکیک جمعیت‌ها و یا ذخایر آبزیان بر حسب گونه، زیرگونه و یا جمعیت به عنوان یک روش قابل اعتماد استفاده می‌گردد (Nahavandi et al. 2007).

در ۱۹۹۷). بر اساس روش Sumbrook and Russell (2001) استخراج DNA ۳۰ میلی‌گرم از باله‌ها بطور کامل خرد شد و در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز جهت باز شدن بافت‌ها و یک میکرولیتر پروتئیناز K جهت هضم پروتئین‌ها اضافه نموده و به مدت یک شبانه روز در بن ماری با دمای ۵۵°C قرار داده شد.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی رودخانه‌های هراز، شیرود و گزارود.

سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فتل به آن اضافه شده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ ۵۳۶۶ g قرار داده، محلول لایه‌رویی به دقت جدا و به لوله دیگری منتقل شد. هم حجم محلول فوق، کلروفرم اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ ۵۳۶۶ g قرار داده و مجدداً لایه‌رویی به آرامی جدا و به لوله دیگر منتقل شد. سپس ۰/۱ حجم محلول به دست آمده، استات سدیم و ۲ برابر حجم آن الكل مطلق سرد اضافه نموده و در سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۰ دقیقه، ۸/۷۴ g و در دمای ۴°C سانتریفوژ نموده، محلول حاصل را دور ریخته و لوله حاوی DNA را با الكل ۷۰ درصد شستشو داده و به مدت ۲ دقیقه و ۸۴۲۰۷۴ مجدداً سانتریفوژ نموده و محلول را دور ریخته و لوله‌ها در دمای آزمایشگاه کاملاً خشک شدند. به رسوب حاصل مقدار ۴۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد (Sumbrook and Russell 2001).

DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد (۰/۸۰) گرم آگارز و ۱۰ میلی‌لیتر بافر TBE یک درصد) لود شده و با

تنوع ژنتیکی، در جمیعت‌هایی که از نظر جغرافیایی فاصله زیادی از هم دارند (Karakousis et al. 1991) و یا در جمیعت‌هایی که از نظر اکولوژیکی با هم متفاوت هستند، وجود دارد (Hindar et al. 1991). در مطالعات مولکولی معمولاً از DNA میتوکندری به عنوان یک نشانگر بسیار مناسب که عمدتاً به صورت وراثت مادری منتقل می‌شود، استفاده می‌گردد (Avise 1994) که می‌توان با استفاده از روش PCR-RFLP تنوع ژنتیکی جمیعت‌ها را مشخص نمود (Berrebi 1996). همچنین ژن سیتوکروم b دارای محل‌های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوجنی بین گونه‌هایی است که از نظر مرفو‌لولژیکی خیلی به هم نزدیک هستند. لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای Mطالعات فیلوجنتیک محسوب می‌گردد (Brioly et al. 1998; Zardoya and Meyer 1996). علیرغم ارزش اقتصادی شاه کولی در حوزه جنوبی دریای خزر و ارزش حفاظتی آن که از نظر طبقه بندی^۱ IUCN جزء گونه‌های آسیب‌پذیر تا در معرض تهدید محسوب می‌شود (Kiabi et al. 1999) در حوزه دریای خزر مطالعات کمی روی شاه کولی صورت گرفته است (Azari et al. 1993). تاکنون مطالعات مولکولی در مورد گونه شاه کولی انجام نشده ولی با استفاده از این روش و این ژن در مورد سایر گونه‌ها، مطالعات بسیاری انجام شده است (Brioly et al. 1998; Zardoya and Meyer 1996; Laloui et al. 2003; Imsiridou et al. 1998). هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه A. chalcoides در نمونه‌های رودخانه‌های هراز، شیرود و گزارود و شناخت ذخایر ژنی این گونه با استفاده از روش PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه‌های شاه کولی در بهار ۱۳۸۴ از سه رودخانه حوزه جنوبی دریای خزر بوسیله تور سالیک صید شد. تعداد ۲۴ نمونه شاه کولی از رودخانه هراز، ۲۰ نمونه از رودخانه شیرود و ۲۷ نمونه از رودخانه گزارود مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از باله ماهی در الكل مطلق تثیت و به آزمایشگاه منتقل شد (Pourkazemi 1996; Rezvani Gilkolai

^۱ International Union for Conservation of Nature

محلول PCR	۱۰-۵ μg	آنزیم برش دهنده	۰/۱ Unit
بافر مخصوص هر آنزیم	x ۲	آب مقطر دو بار تقطیر	۸-۱۳ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر	محلول فوق در دمای بهینه هر آنزیم به مدت یک ساعت در بن ماری قرار داده و سپس روی ژل آگارز دو درصد بهمراه مارکر Fast Ruler™ DNA Ladder Low Range گرفته شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری و محاسبه تنوع نوکلئوتیدی یا هاپلوتیپی بین افراد یا گروهها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی شامل Reap و Phylogenetic Analysis of Phylogenetic Inference Programs (Phylogenetic Inference Programs) استفاده خواهد شد.	
آب مقطر دو بار تقطیر	۱۳ میکرولیتر	آب مقطر دو بار تقطیر	۱۰-۱۳ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر	آب مقطر دو بار تقطیر	۱۰-۱۳ میکرولیتر

نتایج و بحث

استخراج DNA با روش فتل کلروفرم به خوبی انجام شده و محلول PCR قطعه ای pb ۸۱۰ با استفاده از پرایمرها تکثیر شد. برای هضم آنزیمی قطعه فوق از ۹ آنزیم استفاده شد و الگوهای الکتروفورزی با ژل آگارز ۲-۳ درصد به دست آمد. الگوی هضم آنزیمی قطعات ایجاد شده بر اثر آنزیم‌های برش دهنده روی تمامی نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی

PCR محسولات

نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات*
BamHI	۲	۷۸۱ + ۴۹
EcoRV	۲	۷۱۰ + ۱۲۱
HaeIII	۲	۱۷۱ + ۶۶۰
HincII	۲	۶۶۵ + ۱۶۶
HinfI	۳	۳۵۲ + ۳۰۰ + ۱۷۹
PpuMI	۲	۲۰۲ + ۶۲۹
RsaI	۳	۴۸۸ + ۴۲ + ۳۰۱
Tsp45I	۲	۹۵ + ۷۳۶
TaqI	۳	۵ + ۸۱ + ۶۴۵

* جمع اندازه‌های تمام الگوها برای هر آنزیم pb ۸۳۱ است.

با توجه به الگوهای هضم آنزیمی، باندهای DNA ایجاد شده برای تمام آنزیم‌ها و برای تمام نمونه‌های DNA مورد استفاده هم اندازه بوده و بیانگر این است که ژن سیتوکروم b مستقر روی mtDNA با

ولتاژ ۶۰-۸۰ ولت الکتروفورز شدند. با مقایسه باند DNA با مارکرهای کمی مقدار آن برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین شد. آغازگرهای مورد استفاده برای ژن سیتوکروم b (دارای A. chalcooides) از ژنوم میتوکندری ماهی استفاده از نرم افزار DNAsis طراحی گردید. ترتیب نوکلئوتیدهای هر یک از آغازگرهای ۲۰ نوکلئوتیدی به صورت زیر می‌باشد.
 آغازگر پیشرو^۱: ۵'-CTAGTCGATCTTCAACACC-۳'
 آغازگر پسگرد^۲: ۵'-TAGTGCAAGAACCCGCCTA-۳'

شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن سیتوکروم b به شرح زیر است:

نوع ماده	میزان مورد نیاز
DNA	1μg
Tag DNA polymerase	1unit
Buffer	1x
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP	0.2 mM
PrimerFor	10 Pmol
PrimerRev	10 Pmol
حجم نهایی	50 μl

محلول فوق در لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تهیه شده و لوله‌ها را در دستگاه مولد حرارتی قرار داده و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه زیر انجام شد.

مرحله اول: (۱ چرخه): واسرشته‌سازی اولیه (Denaturation)

۵ دقیقه ۹۴ °C

مرحله دوم: (۳۰ چرخه): واسرشته‌سازی (Denaturation)

۳۰ ثانیه ۹۴ °C

اتصال آغازگر (Annealing)

۴ ثانیه ۵۷ °C

بسط (Extension)

۴ ثانیه ۷۲ °C

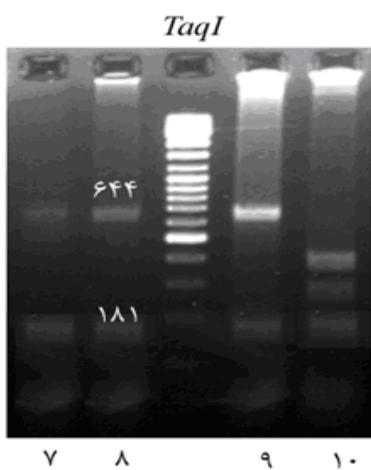
مرحله سوم: (۱ چرخه): بسط نهایی (Extension)

۵ دقیقه ۷۲ °C

برای انجام تجزیه RFLP با توجه به توالی ژن مورد نظر و جایگاه خاص هر آنزیم، آنزیم‌های BamHI, EcoRV, HaeIII, HincII, Tsp45I, TaqI, PpuMI, RsaI, HinfI, HaeIII, HincII, HinfI, EcoRV, BamHI ایجاد شده برای هر آنزیم است.

¹ Forward

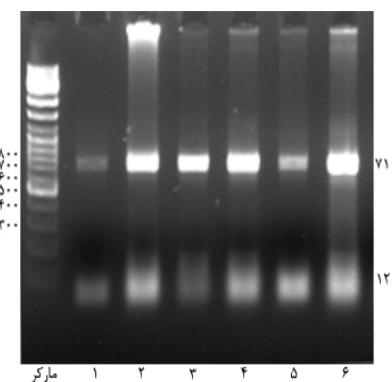
² Reverse



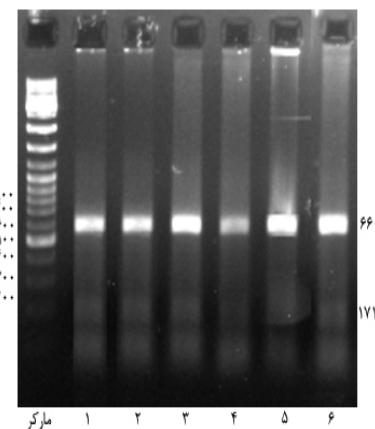
شکل ۴- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *TaqI* روی ژل آگارز دو درصد. شماره‌های ۷ و ۹ مربوط به رودخانه گزافرود، شماره‌های ۸ و ۱۰ به ترتیب مربوط به رودخانه‌های شیرود و هراز می‌باشد.

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌نماید و یکی از راه‌های مطالعه ساختار ژنتیکی، استفاده از ژنتیک جمعیت می‌باشد. شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت‌ها یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت RFLP (Rezvani Gilkolai 1997). صحیح بهره‌برداری می‌باشد (White 1996). نیز یکی از تکنیک‌های مناسب در زمینه ژنتیک مولکولی برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها و همچنین تجزیه جمعیت‌ها می‌باشد (Ovenden and Avise 1994). White (1996) بیان کردند که به طورکلی در جانوران دریایی، احتمال تنوع DNA میتوکندری خیلی کم می‌باشد و عواملی مانند شرایط نامساعد و محدود محیطی و یا مرگ و میر که بنا به دلایل خاصی اتفاق می‌افتد، یکی از عوامل بروز اختلافات نوکلئوتیدی می‌باشند (Ovenden and White 1990). اغلب گزارشات در زمینه تجزیه DNA میتوکندری ماهی‌ها، تنوع هاپلوتئیدی کمی را نشان داده و در واقع تعداد هاپلوتیپ‌های موجود مشتقات جهش-یافته می‌باشند (Billington and Herbert 1991). تغییرات DNA میتوکندری ممکن است به عنوان ابزاری در تفکیک و مدیریت ذخایر گونه‌های مختلف ماهی مفید باشد (Billington et al. 1992). Berrebi (1996) معتقد است با توجه به منشاء مادری میتوکندری، نوترکیبی در آن صورت نمی‌گیرد و این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به

این آنژیم‌ها، تنوع ژنتیکی و یا پلی‌مورفیسم بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد مناطق مختلف را نشان نمی‌دهد (شکل‌های ۳ و ۲). لذا انجام هر گونه تجزیه آماری برای محاسبه تنوع نوکلئوتید یا هاپلوتیپی و رسم درخت خویشاوندی بین افراد یا گروه‌ها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی شامل Reap و Phylophil امکان‌پذیر نبوده است. از بین نمونه‌های مورد مطالعه، فقط محصول PCR یک نمونه از رودخانه گزافرود با آنژیم برش دهنده متفاوت با الگو برش داده شد (شکل ۴).



شکل ۲- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *EcoRV* روی ژل آگارز دو درصد. شماره‌های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره‌های ۳ و ۴ مربوط به رودخانه شیرود و شماره‌های ۵ و ۶ مربوط به رودخانه گزافرود می‌باشد.



شکل ۳- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *HaeIII* روی ژل آگارز دو درصد. شماره‌های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره‌های ۳ و ۴ مربوط به رودخانه شیرود و شماره‌های ۵ و ۶ مربوط به رودخانه گزافرود می‌باشد.

فیزیکی رودخانه‌ها و دریای خزر و موانع زیستی که موجب ایجاد تفاوت‌های معنی‌دار بین افراد جمعیت سس ماهی در مناطق مورد مطالعه شده، وجود ندارد و در واقع آن جمعیت‌ها را از نظر ژنتیکی یکنواخت بیان کرده و معتقدند که ژن سیتوکروم b ژن مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت سس ماهی نبوده و نمی‌تواند اختلافات ژنتیکی بین جمعیت‌ها و یا درون جمعیت‌ها را نشان دهد. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، (1999) Wolf et al. در بررسی محصول PCR ۴۶۴ جفت‌بازی ژن سیتوکروم b و با روش RFLP در تاس‌ماهیان علاوه بر پلی مرفیسم و تعیین تنوع بین گونه‌ها ۴ آنزیم محدود کننده را به عنوان مارکرهای مولکولی بیان کردند. (1998) Imsiridou et al. در بررسی ۱۲ جمعیت مختلف ماهی سفید رودخانه‌ای (*Leuciscus cephalus*) به کمک ژن سیتوکروم b تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌ها مشاهده کردند و ۹ آنزیم از ۱۰ آنزیم برش دهنده پلی مرفیسم را در جمعیت‌ها نشان داد. با توجه به اینکه ژن سیتوکروم b توانسته در گونه‌های دیگر خانواده کپور ماهیان تنوع ژنتیکی را بین جمعیت‌ها نشان دهد لذا برای اطمینان بیشتر از تعلق این نمونه‌ها به یک جمعیت واحد می‌توان از نمونه‌های بیشتر و یا آنزیم‌های برش دهنده موثرتر و یا از نشانگرهای دیگری نظیر AFLP و Microsatellite استفاده نمود.

تشکر و قدردانی از ریاست و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی، سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و همکاری‌های صمیمانه - شان کمال تشکر را دارم.

منابع

- Avise JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. London, Chapman & Hall.
- Azari Takami G, Rajabinejad R (2002) A study of fecundity in Shemaya, *Chalcalburnus chalcooides* in Sefidrud River. Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources 6(4): 231-239.(In Farsi)
- Berg LS (1949) Freshwater Fishes of the U.S.S.R. and Adjacent Countries. Trudy institute Acad, U.S.S.R. (Translated to English in 1962), 2, 469p.
- Berrebi P (1996) Speciation of the genus Barbus in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. Biological Conservation, 72, 237-249.
- Billington N, Barrette RJ, Herbert PDN (1992) Management implication of mtDNA variation in walleye

ژنوم هسته شده است. در این مطالعه جهت استخراج DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا از روش فنل-کلروفرم استفاده گردید. زیرا فنل و کلروفرم، پروتئین‌ها را تا حد زیادی جدا کرده و نسبت به روش‌های دیگر، احتمال استخراج DNA خالص بیشتر است (Bonnaud et al. 1997). در این مطالعه، اندازه محصول PCR ژن سیتوکروم b ۸۳۱ جفت‌باز بود که برای ۷۱ نمونه از ماهیان رودخانه‌های هراز، شیرود و گزافرود بدست آمد. از ۹ آنزیم قطع کننده جهت مطالعه هضم آنزیمی استفاده شد که از بین آن‌ها فقط یک نمونه از محصولات PCR جمعیت گزافرود توسط آنزیم *TaqI* با الگوی متفاوتی قطع شده و در بقیه نمونه‌ها با آنزیم‌های برش دهنده مورد استفاده تنها یک الگوی برش مشاهده شده و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی را نشان نداد. با توجه به نتایج به دست آمده، انجام هر گونه تجزیه آماری برای محاسبه تنوع هاپلوتیپ‌ها و نوکلئوتیدها بین جمعیت‌ها و یا درون هر یک از جمعیت‌ها به وسیله نرم افزارها امکان‌پذیر نبود. علت این امر را می‌توان به نوع ژن، تعداد کم نمونه‌ها و یا تعداد کم آنزیم‌های قطع کننده مرتبط دانست. تاکنون در دنیا مطالعات ژنتیکی در مورد گونه شاه کولی انجام نشده و هیچ گونه اطلاعاتی در این زمینه وجود ندارد و به این دلیل نتایج بدست آمده در این تحقیق با گونه‌های دیگر مقایسه شدند. (2003) Laloui et al. در سال ۱۳۸۲ در بررسی تنوع ژنتیکی سس ماهی دریای خزر (*Barbus capito*) با استفاده از ژن سیتوکروم b و ۱۰ آنزیم برش دهنده و به کمک روش RFLP پلی مرفیسم را بین جمعیت‌ها و یا درون آن‌ها مشاهده نکردند (Brioly et al. 1998).

stocks. North American Journal of Fisheries Management 12: 276-284.

Billington N, Herbert PDN (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implication for introduction. Canadian Journal of Fish Aquatic Science 48 (1): 80-94.

Bogutskaya NG (1997) Contribution to the knowledge of Leuciscine fishes of Asia Minor. Part 2. An annotated check- list of Leuciscine fishes (Leuciscinae, Cyprinidae) of Turkey with descriptions of a new species and two new subspecies. Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst., 94, 161-186.

Bonnaud L, Boucher- Rodoni R, Monnerot M (1997) Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetic Evolution 7(1): 44-54.

- Brioly J, Galyiev N, Brito RM, Bouvet Y (1998) Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequence. *Md. Phylogenetic* 9, 100-108.
- Ghaninejad D, Abdolmaleki SH, Fazli H (2000) Stock assessment of bony fish in Caspian Sea. Iranian Fisheries Research and Training Organization, 90p. (In Farsi)
- Hindar K, Jonson B, Ryman N, Sthal G (1991) Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous brown trout, *Salmo trutta* L. *Heredity* 66:83-91.
- Imsiridou A, Aostolidis AP, Durand JD, Brioly J, Bouvet Y, Triantaphyllidis C (1998) Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek Chub *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mtDNA. *Journal of Biochemical Systematics & Ecology* 26: 416-429.
- Karakousis Y, Triantaphyllidis C, Economidis PS (1991) Morphological variability among seven populations of brown trout, *salmon trutta* L., in Greece. *Journal of Fish Biology* 38: 807-817.
- Karimpour M, Hosseinpour N, Haghghi D (1993) Biological survey of *Chalcalburnus chalcooides* spawning migration in Anzali Lagoon. Iranian Scientific Fisheries Journal 4: 39-52. (In Farsi).
- Khaval A (1997) The migration of *Rutilus frissi* Kutum, *Vimba vimba* and *Chalcalburnus chalcooides* to the Sefidrud River. Iranian Scientific Fisheries Journal 6(4):75-86. (In Farsi).
- Kiabi BH, Abdoli A, Naderi M (1999) Status of the fish fauna in the south Caspian basin of Iran. *Journal of Zoology in the Middle East* 18: 57-65.
- Laloui F, Rezvani Gilkolai S, Pourkazemi M (2003) Investigation the molecular of *Barbus capito* in South Caspian Basin by using PCR-RFLP. Iranian scientific Fisheries Journal 12(1): 117-130. (In Farsi).
- Nahavandi RA, Rezvani Gilkolai S, Vosoughi GH, Kazemi B (2005) A survey of Gene diversity 18s rRNA of Squid, *Sepia pharaonis*, in Persian Gulf and Oman Sea by using PCR-RFLP method. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 14(2): 157-168. (In Farsi).
- Ovenden JK, White RWG (1990) Mitochondrial and Allozyme genetics of incipient speciation in a landlocked population of *Galaxias truttaceus* (pices: Galaxiidae). *Genetics* 124: 237-249.
- Pourkazemi M (1996) Molecular and Biochemical genetic analysis of sturgeon stock from the South Caspian Sea. School of Biological Science, University of Wales. 258p.
- Rahmani H (2006) Population dynamics and genetic diversity of Shemaya, *Chalcalburnus chalcooides*, in Haraz, Shirud and Gazafrud rivers. Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. (In Farsi).
- Rezvani S (1997) Molecular population genetic of Sturgeon species in the south Caspian Sea. A ph.D. Thesis. School of Biological Sciences University of Wales.P.196.
- Sumbrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold spring Harbor laboratory press. Cold spring Habor, New York.
- Slastenenko E (1955) The Fishes of the Black Sea Basin. The publication of the Meat and Fish Office, Istanbul-Turkey (in Turkish with English summery). 165p.
- Zardoya R, Meyer A (1996) Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology of Evolution*, 13, 933-942.
- Wolf C, Hubner P, Luthy J (1999) Differentiation of the Sturgeon species by PCR- RFLP. *Food Research International*, 32: 699-705.