ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۳۲- ۲۲۷

مقایسه تنوع ژن سیتوکروم *b* در ماهیان شاه کولی (*Alburnus chalcoides*) رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود به روش PCR-RFLP

حسین رحمانی*[۱]- بهرام کاظمی[۲]- محمد پورکاظمی[۳]

۱- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۲- استاد مرکزتحقیقات بیولوژی، سلولی و مولکولی دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی.
۳- دانشیار موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت.

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۸ - تاریخ پذیرش:۹۰/۱۲/۹)

چکیده

در این بررسی ۷۱ نمونه ماهی شاه کولی *Alburnus chalcoides* از رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود در استان های 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 زنجیره ای پلیمراز انجام شد که نتیجه محصول PCR، ۸۳۱ جفت باز بوده است. به کمک نرم افزار DNAsis آنزیم های *Bam*HI، *Eco*RV، *Hae*III، *Hinc*II، *Hinf*I، *Ppu*MI، *Rsa*I ، *Tsp*45I و *Taq*I جهت مطالعات هضم آنزیمی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. الگوهای هضم آنزیمی یا ژل آگارز دو درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید. الگوهای برشی در تمام نمونه های مورد مطالعه غیر از الگوهای برشی آنزیم *Taq*I در ماهیان رودخانه گزافرود یکسان بوده است. بر این اساس می توان گفت که پدیده پلی مرفیسم با استفاده از آنزیم های فوق و ژن سیتوکروم *b* در ماهی شاه کولی قابل مشاهده نبوده و نمونه ها به کمک این ژن و این تکنیک به یک جمعیت تعلق داشته و تمام افراد از ژنوتیپ یکسان برخوردار می باشند.

واژه‌های کلیدی

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

مقدمه

گونه شاه کولی *A. chalcoides* از گونه های بنتوپلاژیک بوده و در آبهای لب شور و شیرین زندگی می کند و برای تولیدمثل به رودخانه ها مهاجرت می نماید(Slastenenko 1955). این گونه دارای پراکنش وسیعی در رودخانه های حوزه دریای خزر، آرال و سیاه می باشد(Bogutskaya 1997). شاه کولی یک ماهی ریزجثه و مورد پسند مردم شمال ایران است که از اواخر فروردین تا اواخر تیر جهت تولید مثل وارد رودخانه های حوزه جنوبی دریای خزر می شوند(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 می شود(Nahavandi et al. 2007).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]

تنوع ژنتیکی، در جمعیت هایی که از نظر جغرافیایی فاصله زیادی از هم دارند (Karakousis et al. 1991) و یا در جمعیت هایی که از نظر اکولوژیکی با هم متفاوت هستند، وجود دارد (Hindar et al. 1991). برای مطالعات مولکولی معمولا از DNA میتوکندری به عنوان یک نشانگر بسیار مناسب که عمدتا به صورت وراثت مادری منتقل می شود، استفاده می گردد(Avise 1994) که می توان با استفاده از روش PCR- RFLP تنوع ژنتیکی جمعیتها را مشخص نمود (Berrebi 1996). همچنین ژن سیتوکروم *b* دارای محل های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه هایی است که از نظر مرفولوژیکی خیلی به هم نزدیک هستند. لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می گردد (Zardoya and Meyer 1996; Brioly et al. 1998) علیرغم ارزش اقتصادی شاه کولی در حوزه جنوبی دریای خزر و ارزش حفاظتی آن که از نظر طبقه بندی IUCN[1] جزء گونه های آسیب پذیر تا در معرض تهدید محسوب می شود (Kiabi et al. 1999) در حوزه دریای خزر مطالعات کمی روی شاه کولی صورت گرفته است(Karimpour et al. 1993; Khaval 1997; Azari Takami and Rajabinejad 2002). تاکنون مطالعات مولکولی در مورد گونه شاه کولی انجام نشده ولی با استفاده از این روش و این ژن در مورد سایر گونه ها، مطالعات بسیاری انجام شده است (Zardoya and Meyer 1996; Brioly et al. 1998; Imsiridou et al. 1998; Laloui et al. 2003.). هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه *A. chalcoides* در نمونه های رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود و شناخت ذخایر ژنی این گونه با استفاده از روش PCR-RFLP می باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه های 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 گزافرود مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). مقدار ۲۰۰ میلی گرم از باله ماهی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شد(Pourkazemi 1996; Rezvani Gilkolai 1997).

برای استخراج DNA بر اساس روش استاندارد، ۳۰ میلی گرم از باله ها بطور کامل خرد شد و در لوله های ۱/۵ میلی لیتری ریخته و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز جهت باز شدن بافت ها و یک میکرولیتر پروتئیناز K جهت هضم پروتئین ها اضافه نموده و به مدت یک شبانه روز در بن ماری با دمای $55\ ^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فنل به آن اضافه شده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ $5366/4\ g$ قرار داده، محلول لایه رویی به دقت جدا و به لوله دیگری منتقل شد. هم حجم محلول فوق، کلروفرم اضافه نموده و بمدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ $5366/4\ g$ قرار داده و مجددا لایه رویی به آرامی جدا و به لوله دیگر منتقل شد. سپس ۰/۱ حجم محلول به دست آمده، استات سدیم و ۲ برابر حجم آن الکل مطلق سرد اضافه نموده و در سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۰ دقیقه، $12074/4\ g$ و در دمای $4\ ^{\circ}C$ سانتریفوژ نموده، محلول حاصل را دور ریخته و لوله حاوی DNA را با الکل ۷۰ درصد شستشو داده و به مدت دو دقیقه و $12074\ g$ مجددا سانتریفوژ نموده و محلول را دور ریخته و لوله ها در دمای آزمایشگاه کاملا خشک شدند. به رسوب حاصل مقدار ۴۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در بن ماری $37\ ^{\circ}C$ قرار داده شد(Sumbrook and Russell 2001). DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد (۰/۸۰ گرم آگارز و ۱۰ میلی لیتر بافر TBEیک درصد) لود شده و با ولتاژ ۸۰-۶۰ ولت الکتروفورز شدند. با مقایسه باند DNA با مارکرهای کمی مقدار آن برای واکنش زنجیره ای پلیمراز تعیین شد.

آغازگرهای مورد استفاده برای ژن سیتوکروم *b* (دارای ۱۱۴۰ جفت باز است) از ژنوم میتوکندری ماهی *A. chalcoides* و با استفاده از نرم افزار DNAsis طراحی گردید. ترتیب نوکلئوتیدهای هر یک از آغازگرهای ۲۰ نوکلئوتیدی به صورت زیر می باشد.

آغازگر پیشرو[2]: 5'-CTAGTCGATCTTCCAACACC-3'

آغازگر پسگرد[2]: 5'-TAGTGCAAGAACCCCGCCTA-3'

[1] International Union for Conservation of Nature

[2] Forward
[3] Riverse

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]

جدول۱- شرایط انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز برای ژن سیتوکروم *b* در این تحقیق.

DNA	1µg (1-4µl)
Taq Polymerase (5unit/ µl)	1unit (0.2µl)
Buffer PCR 10x	1x (5µl)
$MgCl_2$ (50mM)	1.5mM(1.5µl)
dNTP (10mM)	0.2mM(0.5µl)
Primer (1)	20 Pmol (1µ)
Primer (2)	20 Pmol (1µ)
dH_2O	37-40 µl
حجم نهایی	50 µl

محلول فوق در لوله های ۰/۵ میلی لیتری تهیه شده و لوله ها را در دستگاه مولد حرارتی قرار داده و واکنش زنجیره ای انجام شد. (جدول۲).

جدول۲- برنامه حرارتی واکنش زنجیرهای پلیمراز برای ژن سیتوکروم *b*

مرحله اول: (یک چرخه): واسرشته سازی اولیه	۹۴ °C	۵ دقیقه
مرحله دوم: (۳۰ چرخه): واسرشته سازی	۹۴ °C	۳۰ ثانیه
اتصال آغازگر	۵۷ °C	۴۰ ثانیه
بسط	۷۲ °C	۴۰ ثانیه
مرحله سوم: (یک چرخه): بسط نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه

در انجام تجزیه RFLP با توجه به توالی ژن مورد نظر و جایگاه خاص هر آنزیم، آنزیم های *Bam*HI، *Eco*RV، *Hae*III، *Hinc*II، *Taq*I، *Hinf*I، *Ppu*MI، *Rsa*I، *Tsp45*I انتخاب شدند و جهت انجام واکنش محلول زیر تهیه شد.

محلول PCR	۱µg (۱۰- ۵ میکرولیتر)
آنزیم برش دهنده	۳-۲ Unit (۰/۱ میکرولیتر)
بافر مخصوص هر آنزیم	۱ x (۲ میکرولیتر)
آب مقطر دو بار تقطیر	۱۳-۸ 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 به همراه مارکر Fast Ruler™ DNA Ladder Low Range مورد بررسی قرار گرفتند (جدول۱و۲). جهت تجزیه و تحلیل آماری و محاسبه تنوع نوکلئوتیدی یا هاپلوتیپی بین افراد یا گروه ها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی شامل Reap و Phylip استفاده خواهد شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم به خوبی انجام شده و محصول PCR قطعه ای bp ۸۱۰ با استفاده از آغازگرها تکثیر شد. برای هضم آنزیمی قطعه فوق از ۹ آنزیم استفاده شد و الگوهای الکتروفورزی با ژل آگارز ۳-۲ درصد به دست آمد. الگوی هضم آنزیمی قطعات ایجاد شده بر اثر آنزیم های برش دهنده روی تمامی نمونه ها در جدول ۳ آمده است.

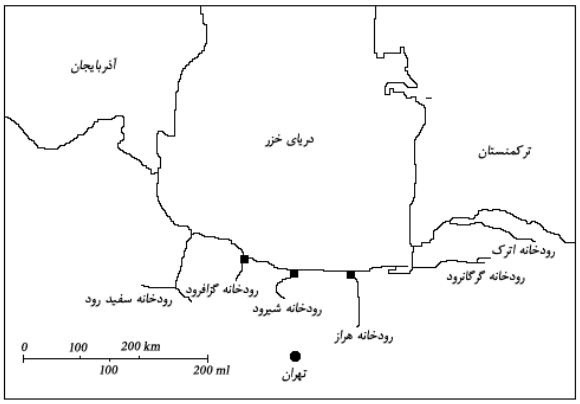
با توجه به الگوهای هضم آنزیمی، باندهای DNA ایجاد شده برای تمام آنزیم ها و برای تمام نمونه های DNA مورد استفاده هم اندازه بوده و بیانگر این است که ژن سیتوکرم *b* مستقر روی mtDNA با این آنزیم ها، تنوع ژنتیکی و یا پلی مورفیسم بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد مناطق مختلف را نشان نمی دهد (شکل های ۳ و ۲). لذا انجام هر گونه آنالیز آماری برای محاسبه تنوع نوکلئوتید یا هاپلوتیپی و رسم درخت خویشاوندی بین افراد یا گروه ها با استفاده از نرم افزارهای اختصاصی شامل Reap و Phylip امکان پذیر نبوده است. از بین نمونه های مورد مطالعه، فقط محصول PCR یک نمونه از رودخانه گزافرود با آنزیم برش دهنده متفاوت با الگو برش داده شد(شکل ۴).

جدول ۳- تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصولات PCR

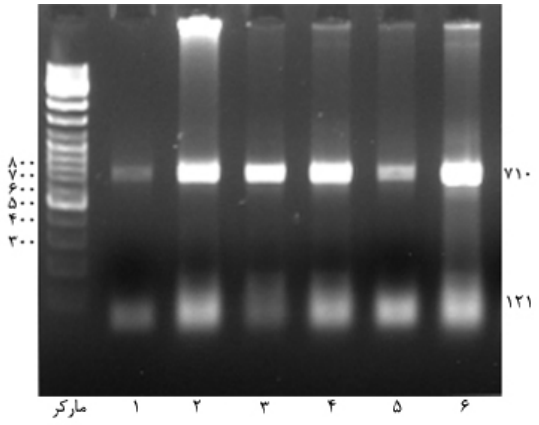
نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات* bp
*Bam*HI	۲	۷۸۱ + ۴۹
*Eco*RV	۲	۷۱۰ + ۱۲۱
*Hae*III	۲	۱۷۱ + ۶۶۰
*Hinc*II	۲	۶۶۵ + ۱۶۶
*Hinf*I	۳	۳۵۲ + ۳۰۰ + ۱۷۹
*Ppu*MI	۲	۲۰۲ + ۶۲۹
*Rsa*I	۳	۴۸۸ + ۴۲ + ۳۰۱
*Tsp*45I	۲	۹۵ + ۷۳۶
*Taq*I	۳	۵ + ۸۱ + ۶۴۵

*جمع اندازه های تمام الگوها برای هر آنزیم bp ۸۳۱ است.

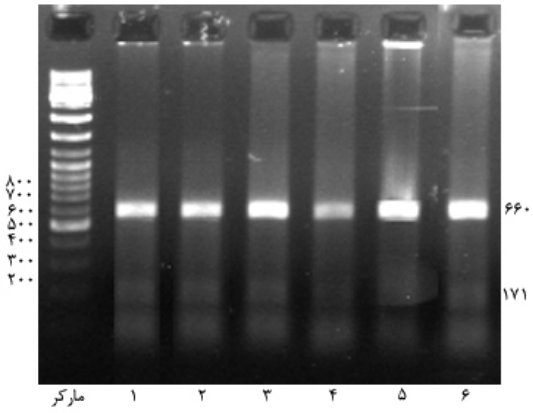
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]



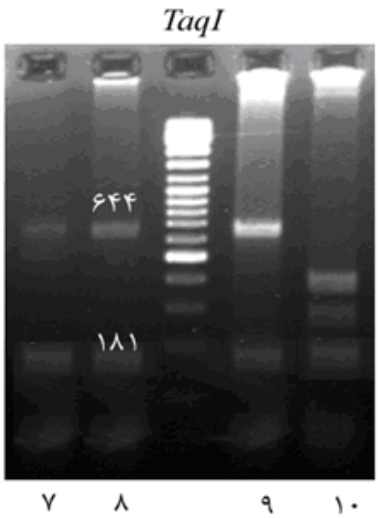
شکل ۱- موقعیت جغرافیایی رودخانه های هراز، شیرود و گزافرود.



شکل ۲- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *Eco*RV روی ژل آگارز دودرصد. شماره های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره های ۳ و ۴ مربوط به رودخانه شیرود و شماره های ۵ و ۶ مربوط به رودخانه گزافرود می باشد.



شکل ۳- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *Hae*III روی ژل آگارز دودرصد. شماره های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره های ۳ و ۴ مربوط به رودخانه شیرود و شماره های ۵ و ۶ مربوط به رودخانه گزافرود می باشد.



شکل ۴- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *Taq*I روی ژل آگارز دودرصد. شماره های ۷ و ۹ مربوط به رودخانه گزافرود ، شماره های ۸ و ۱۰ به ترتیب مربوط به رودخانه های شیرود و هراز می باشد.

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی نتوع ژنتیکی آنها می نماید و یکی از راههای مطالعه ساختار ژنتیکی، استفاده از ژنتیک جمعیت می باشد. شناسایی تحولات درون گونه ای و ساختار جمعیت ها یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می باشد (Rezvani Gilkolai 1997). RFLP نیز یکی از تکنیک های مناسب در زمینه ژنتیک مولکولی برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه ها و همچنین تجزیه جمعیت ها می باشد (Avise 1994). به طور کلی در جانوران دریایی، احتمال تنوع DNA میتوکندری خیلی کم می باشد و عواملی مانند شرایط نامساعد و محدود محیطی و یا مرگ و میر که بنا به دلایل خاصی اتفاق می افتد، یکی از عوامل بروز اختلافات نوکلئوتیدی می باشند (Ovenden and White 1990). اغلب گزارشات در زمینه تجزیه DNA میتوکندری ماهی ها، تنوع هاپلوئیدی کمی را نشان داده و در واقع تعداد هاپلوتیپ های موجود مشتقات جهش یافته می باشند(Billington and Herbert 1991). تغییرات DNA میتوکندری ممکن است به عنوان ابزاری در تفکیک و مدیریت ذخایر گونه های مختلف ماهی مفید باشد (Billington et al. 1992). با توجه به منشا مادری میتوکندری، نوترکیبی در آن صورت نمی گیرد و این خاصیت سبب بروز

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]

اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است(Berrebi 1996).

جهت استخراج DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا از روش فنل- کلروفرم استفاده شد. زیرا فنل و کلروفرم، پروتئین ها 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 جفت باز بود که برای ۷۱ نمونه از ماهیان رودخانه های 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 *Taq*I با الگوی متفاوتی قطع شده و در بقیه نمونه ها با آنزیم های 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 آنالیز آماری برای محاسبه تنوع هاپلوتیپ ها و نوکلئوتیدها بین جمعیت ها و یا درون هر یک از جمعیت ها به وسیله نرم افزارها امکان پذیر نبود. علت این امر را می توان به نوع ژن، تعداد کم نمونه ها و یا تعداد کم آنزیم های قطع کننده مرتبط دانست. تاکنون در دنیا مطالعات ژنتیکی در مورد گونه شاه کولی انجام نشده و هیچگونه اطلاعاتی در این زمینه وجود ندارد و به این دلیل نتایج بدست آمده در این تحقیق با گونه های دیگر مقایسه شدند. Laloui et al. (2003) 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 جمعیت ها و یا درون آنها مشاهده نکردند (Brioly et al. 1998). ایشان معتقدند که موانع فیزیکی رودخانه ها و دریای خزر و موانع زیستی که موجب ایجاد تفاوت های معنی دار بین افراد جمعیت سس ماهی در مناطق مورد مطالعه شده، وجود ندارد و در واقع آن جمعیت ها را از نظر ژنتیکی یکنواخت بیان کرده و معتقدند که ژن سیتوکروم *b* ژن مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت سس ماهی نبوده و نمی تواند اختلافات ژنتیکی بین جمعیت ها و یا درون جمعیت ها را نشان دهد. در تحقیقی محصول PCR ۴۶۴ جفت بازی ژن سیتوکروم *b* با روش RFLP در تاسماهیان بررسی شده که علاوه بر پلی مرفیسم و تعیین تنوع بین گونه ها ۴ آنزیم محدود کننده را به عنوان مارکرهای مولکولی بیان داشتند (Wolf et al. 1999). همچنین در مطالعه دیگر تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت مختلف ماهی سفید رودخانه ای (*Leuciscus cephalus*) به کمک ژن سیتوکروم *b* مورد بررسی قرار گرفت و ۹ آنزیم از ۱۰ آنزیم برش دهنده پلی مرفیسم را در جمعیت ها نشان داد (Imsiridou et al. 1998) که نتایج آنها برخلاف نتایج حاضر در مورد ژن سیتوکروم *b* در گونه شاه کولی می باشد با توجه به اینکه ژن سیتوکروم *b* توانسته در گونه های دیگر خانواده کپور ماهیان تنوع ژنتیکی را بین جمعیتها نشان دهد لذا برای اطمینان بیشتر از تعلق این نمونه ها به یک جمعیت واحد می توان از نمونه های بیشتر ویا آنزیم های برش دهنده موثرتر ویا از نشانگر های دیگری نظیر AFLP و Microsatellite استفاده نمود.

تشکرو 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 همکاری های صمیمانه شان کمال تشکر را دارم.

منابع

Avise JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, London.

Azari Takami G, Rajabinejad R (2002) A study of fecundity in Shemaya, *Chalcalburnus chalcoides* in Sefidrud River. Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources 6(4): 231-239.(In Farsi)

Berg L S (1949) Freshwater Fishes of the USSR. and Adjacent Countries. Trady institute Acad, USSR. (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. Journal of Biological Conservation 72: 237-249.

Billington N, Barrette RJ, Herbert PDN (1992) Management implication of mtDNA variation in walleye 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: 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]

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

Brioly J, Galyiev N; Brito RM, Bouvet Y (1998) Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequence. Journal of Molecular Phylogenetic Evolution 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. Journal of 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 and 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, Haghighi D (1993) Biological survey of *Chalcalburnus chalcoides* 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 chalcoides* 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). Journal of 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 chalcoides*, 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, Islanbul-Turkey (in Turkish with English summery). 165p.

Zardoya R, Meyer A(1996) Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates. Journal of Molecular Biology of Evolution, 13, 933-942.

Wolf C, Hubner P, Luthy J (1999) Differentiation of the Sturgeon species by PCR- RFLP. Journal of Food Research International 32: 699-705.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.3.2]