بررسی نواربندی های -RE-, NOR–, C-,G و رنگ آمیزی DAPI کروموزوم های ماهی کپور دندانی زاگرس(*Aphanius vladikovy*)

آذر همت زاده[۱]*؛ فرهاد امینی[۲]

azarhem@gmail.com

۱-عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.

۲-عضو هیئت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران .

تاریخ دریافت : اردیبهشت۱۳۹۱ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۱

چکیده

ماهی کپور دندانی زاگرس (*Aphanius vladykovi*)، از ماهیان بومی کشور ایران است و در آبگیرهای استان چهارمحال و بختیاری زیست می کند و از نظر حفظ ذخایر ژنتیکی و تنوع زیستی حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق بررسی نواربندی های گوناگون بر روی کروموزوم های این ماهی می باشد که برای نخستین بار در ایران بر روی یک گونه آبزی انجام می شوند. برای این منظور تعداد 200 عدد ماهی نر و ماده از تالاب چغاخور و چشمه مادر و دختر در استان چهارمحال و بختیاری صید گردیده و به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند. پس از تهیه گسترش های کروموزومی رنگ آمیزی با فلوروکروم DAPI انجام شد. همچنین نواربندی های G,C,NOR و RE توسط سه آنزیم محدود کننده *Alu I* ، *BamH I* و *Pst I* بر روی کروموزوم ها انجام گردید. نواربندی C و NOR نوارهایی را ایجاد نمودند. در نواربندی G نوارهای تیره وروشن بر روی کروموزوم ها ایجاد شد. در نواربندی RE آنزیم های *Alu I* و *BamH I* که محل برش نسبتاً مشابهی داشتند نوارهایی ایجاد کردند در حالی که آنزیم *Pst I* توانایی ایجاد نوار بر روی این کروموزوم ها را نداشت. به نظر میرسد ژنوم این گونه دارا ی نواحی غنی از بازهای CوGبوده درحالی که بخشهای غنی از بازهای A و T در آن کم باشد.

کلمات کلیدی : نواربندی های کروموزومی، ماهی کپوردندانی زاگرس، *Aphanius vladykovi*.

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

۱.مقدمه

ماهی کپوردندانی زاگرس با نام علمی *Aphanius vladykovi*(Coad,1988) متعلق به راسته کپور دندان ماهیان Cyprinodontiformes و خانواده Cyprinodo-ntidae- می باشد. پراکنش آن در تالاب ها و آبگیرهای استان چهارمحال و بختیاری است. این گونه با دیگر گونه های این جنس تفاوت هایی از نظر شرایط زیستی و موقعیت جغرافیایی پراکنش دارد، به نظر می رسد این تفاوت ها برای مطالعات تکاملی در این جنس مفید باشد(۳).

تعداد کروموزوم های سلول های دیپلوییید در برخی گونه های متعلق به این جنس در جدول شماره ۱ ارایه گردیده است. به نظر می رسد عدد نمایی آن در مورد تمام جنس های بررسی شده ثابت بوده و 2n= 48 باشد.

جدول شماره ۱: تعداد کروموزومهای سلولهای دیپلوییید در برخی گونه های متعلق به این جنسAphanius

منبع	تعداد کروموزوم های سلول های دیپلوییید	گونه
۱	۴۸	*Aphanius vladykovi*
۶	۴۸	*A. ginaonis*
۶	۴۸	*A. dispar*
۶	۴۸	*A. persicus*

بررسی کاریوتایپ و سیتوژنتیک ماهیان یکی از ابزارهای مطالعات تکاملی بوده، اگر چه کاربرد کمتری در مدیریت ذخایر داشته اما می تواند نقش مهمی در آبزی پروری داشته باشد. البته بررسی های مرسوم برای رسیدن به این اهداف کافی نبوده و ضروری است که مطالعات دقیق تری بر روی کروموزوم ها صورت گیرد و نشانگرهای مختلفی بر روی ساختار کروموزوم ها معین گردد. هر یک از انواع این نشانگرها قسمت های ویژه ای از کروموزوم را مشخص می نمایند، به عنوان مثال موقعیت مناطق سازمان دهنده هستک[۱] (NORs) یکی از آنهاست. این نواربندی به کمک رنگ آمیزی با نیترات نقره انجام می شود و قسمت ها یی از DNA را که در مرحله اینترفاز به طور فعالانه رونویسی می شوند را مشخص می نماید(14). تحقیقات نشان داده که نیترات نقره فقط قسمت های فعال در رونویسی را رنگ نموده در حالی که رنگ فلورسنت CMA3 همه قسمت های هستک را که در مرحله متافاز در کروموزوم ها پراکنده می شوند را مشخص می نماید. بنابراین سلول ها در مراحل مختلف همچنین بافت های مختلف، نقاط NOR مختلفی را نشان می دهند(۸).

تعیین محل هتروکروماتین[۲] از طریق نواربندی C یکی دیگر از این نشانگرها می باشد. در این نواربندی نواحی هتروکروماتیک در کلیه مراحل تقسیم سلولی رنگ آمیزی می شوند. این قسمت ها دارای چینش های تکراری DNA بوده و در اغلب کروموزوم ها در بخش های سانترومری قرار می گیرند. نواربندی C برای مطالعه بر روی تکامل کاریوتایپی و تعیین کروموزوم های جنسی به کار می رود و در مورد کروموزوم های ماهیان نیز نتایج مطلوبی در بر داشته است(۱۰).

در نواربندیG، در طول بازوهای کروموزوم نوارهایی به صورت تیره و روشن دیده می شود، که برای جداسازی و تشخیص کروموزوم های همتا مورد استفاده قرار می گیرند. این نواربندی یکی از پر کاربرد ترین روش ها در تشخیص بیماری های ژنتیکی و ناهنجاری های کروموزومی در انسان می باشد، ولی تا کنون در دیگر موجودات به ویژه آبزیان به میزان کمی انجام پذیرفته است. نواربندی G در انسان و پستانداران نتایج خوبی در بر داشته ولی در ماهیان و دیگر موجودات خونسرد این نواربندی خیلی واضح نمی باشد، که علت آن را ساختارکروموزومی این موجودات می دانند (۱۴).

[۱] - Nucleolar organizer regions
[۲] - Heterochromatin

Archive of SID

در نواربندی با کمک آنزیم های برش دهنده(نواربندی RE) بخش هایی از DNA برش داده شده و جدا می گردند. هر آنزیم محل مشخصی را برش می دهد، استفاده از این آنزیم ها امکان تفکیک قسمت های هوموژن در ساختار نوکلئوتیدها را می دهد(۵). این نوار بندی برای گونه های مختلفی از گیاهان و جانوران مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به اینکه گونه های مختلف ساکن در نقاط جغرافیایی مختلف دارای ژنوم متفاوتی هستند، زیرا این آنزیم ها مستقیما" بر روی ساختمان DNA عمل می نمایند(۱۱).

روش هایی که برای تعیین مناطق ویژه دیگری بر روی کروموزوم ها هستند، مبتنی بر فلوروکروم هایی همچون (کروموماسین[1] و اکتینومایسین[2]) وDAPI (4´,6- diamidino-2-phenylindole) است، DAPI از رنگ های اختصاصی است که به قسمت های غنی از بازهای ATتمایل دارد(۵).

هدف از این تحقیق بررسی این نواربندی ها بر روی کروموزوم های ماهی کپور دندانی زاگرس است تا بتوان با مقایسه این اطلاعات در گونه های مشابه ویژگی های تکاملی این جنس را مشخص نمود.

۲. مواد و روش ها

حدود ۲۰۰ عدد ماهی نر و ماده *Aphanius vladykovi* از تالاب چغاخور وچشمه مادر و دختر واقع در استان چهارمحال و بختیاری در شهرستان بروجن صید شدند، نمونه ها در کیسه های نایلونی همراه با اکسیژن به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شده و در آکواریوم نگهداری گردیدند و پس از دو هفته آماده بررسیهای سیتوژنتیکی شدند. تعداد ۵۰ عدد ماهی در طول مدت ۳ ماه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از توزین ماهیان، کلچی سین با دوز ۰/۱ -۰/۱۵ میلی گرم به ازای هر گرم وزن بدن به طور داخل صفاقی به آنها تزریق شد. ماهیان به مدت ۴-۵ ساعت در مخزن با دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتیگراد و با هوادهی نگهداری شدند. پس از کشتن ماهی، بافت های آبشش، کبد، طحال، بافت خونساز(کلیه)، بیضه و تخمدان ماهیان خارج شده و بخشی به صورت بافت کامل و مابقی نیز به صورت سوسپانسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفت. پس از هیپوتونیزه کردن سلولها در محلول هیپوتونیک(KCl 0.75 M) به مدت ۴۵ دقیقه، محلول کارنوی(۳متانول : ۱اسید استیک گلاسیال) جایگزین شده که باعث فیکس شدن سلول ها گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه محلول کارنوی سرد و تازه جایگزین شده و با گذشت ۱۵ دقیقه این عمل مجدداً تکرار گردید (۱۲) سپس از سلول ها بر روی لام سرد گسترش تهیه شد.

۱) رنگ آمیزی با DAPI:

لام های حاوی گسترش سلولی توسط ۱۰۰- ۲۰۰ میکرولیتر از رنگ DAPI تازه تهیه شده، پوشیده شدند و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در محفظه تاریک و مرطوب نگهداری گردیدند. پس از آن لام ها با بافر MacIlvain به خوبی شستشو و سپس خشک شدند (۱۰)

۲) نوار بندیC [3]

برای انجام نواربندی C از دستورالعمل های منابع (۲، ۱۰) استفاده شد.

۳) نواربندی NOR[4]

برای انجام این نواربندی از دو روش بیان شده توسط (۱۰) استفاده گردید، که یکی رنگ آمیزی گسترش ها در محیط قلیایی و دیگری رنگ آمیزی در محیط اسیدی می باشد.

٤) نواربندی G [5]

در این مطالعه از روش (۹) استفاده گردید. در نواربندی G لازم است که از زمان تهیه گسترش حدود یک تا دو هفته بگذرد تا

[1] - Chromomycin
[2] - Actinomycin

[3] - C-banding
[4] - NOR-banding
[5] - G-banding

Archive of SID

سلول ها کاملاً تثبیت شده و در طی مراحل مختلف انجام کار، از روی سطح لام کنده نشوند.

۵) نوار بندی RE [۱]

این نواربندی با آنزیم های برش دهنده انجام می شود. به این منظور تعدادی لام جهت انجام آزمایش انتخاب شده و یک لام نیز به عنوان شاهد انتخاب گردید. غلظت کاربردی هر آنزیم با آنزیم دیگر متفاوت می باشد همچنین منابع مختلف نیز در این مورد و همچنین در مورد مدت تیمار سلول ها با آنزیم، زمانهای متفاوتی را پیشنهاد داده اند که در جدول شماره ۲ ارائه شده است. دمای انکوباسیون همه آنزیم ها C□ ۳۷ در نظر گرفته شده است. در جدول۲ شماره محل برش سه آنزیم مورد استفاده در این تحقیق نیز نشان داده شده است.

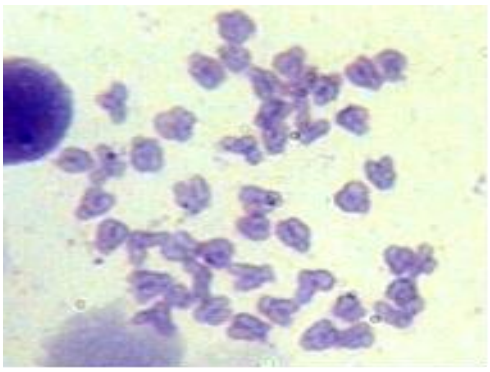
جدول ۲: محل های برش ، غلظت و مدت تیمار آنزیم های مورد استفاده برای نواربندی های RE در این تحقیق

نام آنزیم	محل برش	غلظت	مدت زمان تیمار
Alu I	AG↓CT	30-100U/100 µl	شب گذرانی
BamH I	G↓GATC	30-100U/100 µl	۶-۱۵ ساعت
Pst I	CTGCA↓G	30U/100 µl	شب گذرانی

پس از غلظت مناسب از آنزیم بر روی هر لام µl ۱۰۰از آنزیم ریخته ، پس از قرار دادن لامل، لام در محفظه مرطوب و در انکوباتور با دمایC□ ۳۷ قرار داده شد. یک لام نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته که تنها دارای بافر می باشد. پس از گذشت مدت زمان لازم برای هر آنزیم، لام با آب مقطر شستشو شده و پس از خشک شدن با گیمسا رنگ آمیزی گردید (۱۵).

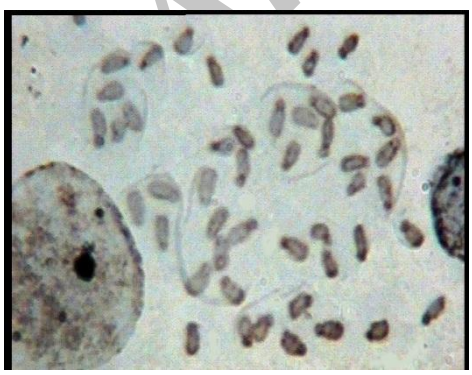
۳. نتایج

نتایج نواربندی های مختلف بر روی کروموزومهای ماهی کپوردندانی زاگرس *Aphanius vladykovi* در زیر ارائه شده است.در تصویر ۱ نواربندی C بر روی کروموزوم های بافت کلیه ماهی ماده نشان داده شده است. چنانکه مشاهده می شود، کروموزوم ها بر اثر تیمارهای مختلف شیمیایی متورم شده اند ولی نواحی هنروکروماتیک آشکار نشده است.



شکل ۱: نواربندی C بر روی سلول های بافت خونساز ماهی ماده *Aphanius vladykovi*

در تصویر ۲ نواربندی NOR بر روی کروموزوم های ماهی کپوردندانی زاگرس نشان داده شده است. چنین به نظر می رسد که کروموزوم های متعددی دارای نوارهای NOR می باشند. در همین راستا وجود هستک های متعدد (۱ تا ۴ عدد و بیشتر) در سلول های این ماهی مشاهده گردید(تصاویر۲و۳).



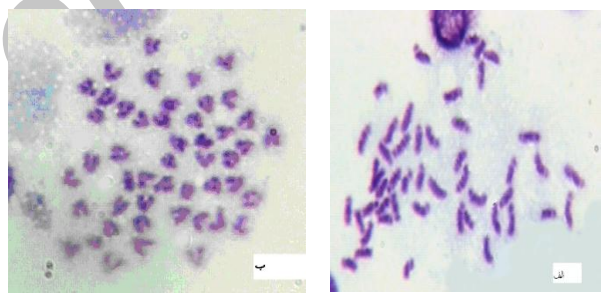
شکل ۲: نواربندی های NOR در بافت خونساز ماهی نر *Aphanius vladykovi* ، در بسیاری از کروموزوم ها نقاط NOR دیده می شوند.

[۱] RE- banding -

Archive of SID

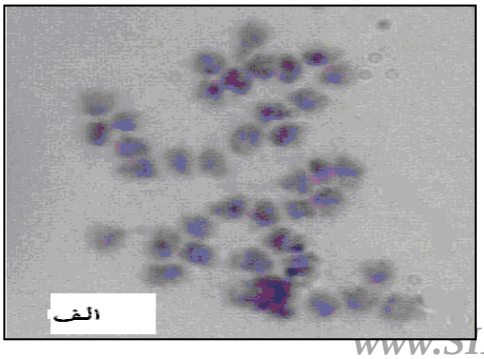
شکل ۳: هستک ها (۱ تا ٤ عدد) در سلول های ماهی *Aphanius vladykovi* توسط نیترات نقره رنگ آمیزی شده اند.

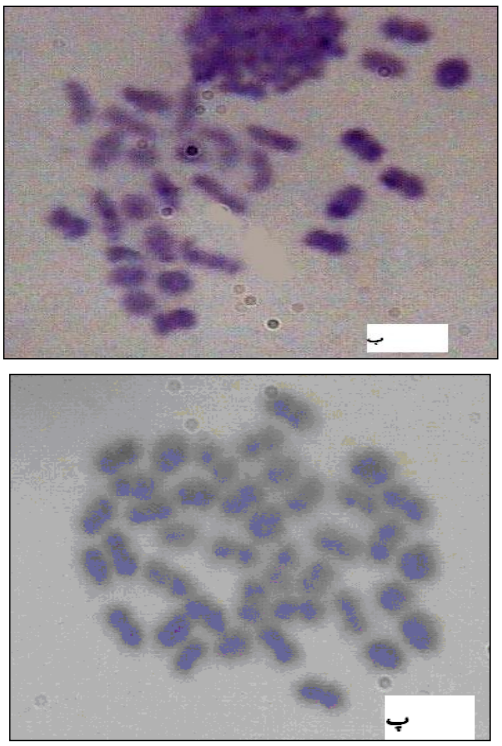
تصویر ۴ (الف و ب) نواربندی G بر روی کروموزوم های بافت خونساز ماهی ماده را نشان می دهد، که به صورت نوارهای تیره و روشن بر روی کروموزوم ها قابل تشخیص است. در این گسترش ها از دو روش ۱(تصویر الف) و ۲(تصویر ب) برای نواربندی G استفاده شده است.



شکل ٤: نواربندی G، در سلول های بافت خونساز ماهی ماده *Aphanius vladykovi* ، (الف) روش اول، (ب) روش دوم.

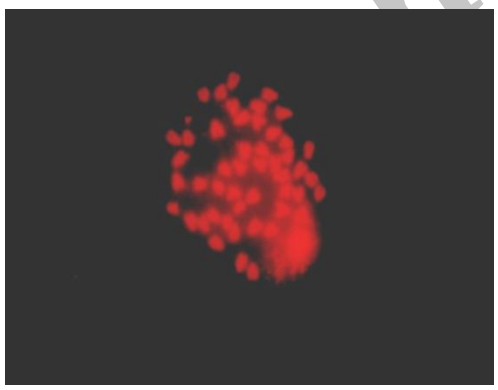
تصویر۵ نواربندی های RE با آنزیم های محدود کننده مختلف را نشان می دهند. آنزیم های محدود کننده *Bam*H I و *Alu* I نوارهایی را بر روی کروموزوم ها ایجاد کرده اند(الف و ب) ولی به نظر می رسد آنزیم*Pst* I نواربندی مشخصی را بر روی کروموزوم ها ایجادننموده است(پ)





شکل ٥ : نواربندی RE بر روی کروموزوم های ماهی *Aphanius vladykovi* به کمک آنزیم برش دهنده(الف) *Bam*H I، (ب) *Alu* I و (پ) *Pst* I

همچنین رنگ آمیزی کروموزوم های ماهی کپوردندانی زاگرس با فلوروکروم DAPI هیچ گونه نواربندی فلورسنت مشهودی را ایجاد نکرد(تصویر ۶).



شکل ٦: رنگ آمیزی کروموزوم های ماهی *Aphanius vladykovi* با رنگ فلورسنت DAPI

٤. بحث

در این مطالعه برای نخستین بار در ایران مجموعه ای از نواربندی های کروموزومی مختلف و رنگ امیزی فلورسنت با فلوروکروم DAPI بر روی یک گونه آبزی انجام پذیرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

دو روش برای نواربندی C مورداستفاده قرار گرفت، که نتایج تقریباً مشابهی را در پی داشت و به نظر می رسد این روش ها نتوانستند نواحی هتروکروماتیک در کروموزوم های ماهی کپوردندانی زاگرس را آشکار نمایند.

با توجه به اینکه این نواربندی نواحی سانترومری را مشخص می کند، که در آن چینش های تکراری از DNA قرار دارند(۱۰). به نظر می رسد که در ماهی کپوردندانی زاگرس این نواحی کم و یا کوچک بوده که با این نواربندی مشخص نشده اند. چون در این خانواده و خانواده های نزدیک به آن این نواربندی صورت نگرفته مقایسه ای نیز نمی توان انجام داد.

دو روش برای نواربندیNOR استفاده گردید. نتایج حاصل از رنگ آمیزی در محیط قلیایی در نمایان سازی نواحی سازمان دهنده هستک ها در ماهی کپوردندانی زاگرس مفیدتر بوده در حالی که از رنگ آمیزی در محیط اسیدی نتایج خوبی حاصل نگردید.

آزمایش های انجام شده در این بررسی نشان داد در گسترش های حاصل از بافت خونساز بسیاری از کروموزوم ها دارای نقاط تیره می باشند. وجود نقاط تیره در کروموزوم ها شاید به دلیل این باشد که نیترات نقره کینتوکورها[1] را نیز رنگ آمیزی نموده باشد(۴).

بررسی ها بر روی ماهی *A. fasciatus* نشان داده که نقاط NOR دارای اختلاف در اندازه وتعداد در جمعیت های مختلف این ماهی می باشد. این نقاط به صورت یکنواخت در نواحی تلومری به کمک تکنیک FISH نیز نشان داده شده اند. ژن های مشخص شده 18s rDNA و28s rDNA است، که منطبق با داده های رنگ آمیزی با نیترات نقره می باشند(۱۶). در اغلب گونه های بررسی شده تفاوت در نقاط NOR مشاهده شده که آن را مرتبط با پلی مرفیسم در هتروکروماتین دانسته اند(۱۳). البته در این روش نیترات نقره تنها نقاط NOR را رنگ آمیزی می نماید که در آخرین اینترفاز فعال بوده اند(۵). بنابراین سلول ها در مراحل مختلف و همچنین بافت های مختلف نقاط NOR مختلفی خواهند داشت. به عنوان مثال سلول های جنینی نسبت به سلول های کلیه، دارای نقاط NOR بیشتری بوده و سلول ها در مرحله گاسترولا نسبت به مرحله بلوغ فعالیت RNA سازی بیشتری داشته و نقاط بیشتری از NOR را نیز نشان خواهند داد (۷).

نواربندی G انجام شده در این بررسی روی کروموزوم های این ماهی نواحی تیره و روشن بسیاری ایجاد نموده ولی به دلیل اینکه بر روی گونه های هم خانواده این ماهی تا کنون این نواربندی انجام نشده مقایسه ای نمی تواند صورت گیرد. برای این نواربندی از سه روش استفاده گردید و روش های مختلف نتایج متفاوتی را نیز در پی داشتند که البته به کار بردن روش یکسان در مورد گسترش های مختلف و حتی گسترش های موجود بر روی یک لام نیز نتایج متغیری داشت. به نظر می رسد عواملی که در حصول به نتایج مناسب در این نواربندی دخیل هستند چندان تحت کنترل نمی باشند.

نواربندی با آنزیم های برش دهنده (محدود کننده)داده های متفاوتی داشته است به طوری که به نظر می رسد آنزیم *Pst* I نواربندی بر روی کروموزوم ها ایجاد ننموده و همه بخش های کروموزوم را به صورت یکسان تحت تاثیر قرار داده است. با توجه به اینکه محل برش این آنزیم CTGCA↓G می باشد بنابراین شاید در قسمت های چینش های غیر رمزشونده[2] تکرار پذیر نباشد و بخش های برش داده شده توسط این آنزیم کوچک بوده و قابل تفکیک نباشند، در حالی که آنزیم های*BamH* I و *Alu* I نوارهایی ایجاد نموده اند که اگر چه وضوح کمتری نسبت به نوارهای G دارند ولی به نظر می رسد در برخی از

[1] - Kinetochore

[2] - non coding

Archive of SID

کروموزوم ها نواحی سانترومری در این نواربندی مشخص شده باشد. محل برش آنزیم *Alu* I منطقه ای از ژنوم است که دارای چینش AG↓CT باشد و این آنزیم فاصله بین دو باز GC را برش می دهد بنابراین در نواحی که غنی از بازهای GC باشند می تواند این نواربندی ایجاد گردد. آنزیم *Bam*H I نیز در چینش G↓GATC را برش می دهد که مانند آنزیم *Alu* I منطقه غنی از باز G است بنابراین به نظر می رسد که این دو آنزیم نواحی نسبتاً مشابهی را برش دهند..

رنگ آمیزی با فلوروکروم DAPI بر روی گسترش های کروموزومی ماهی کپور دندانی زاگرس انجام پذیرفت، اگر چه رنگ فلوروکروم DAPI در مناطق غنی از بازهای AT ایجاد نوار می نماید، ولی در مورد این ماهی نوار خاصی مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج بدست آمده از نواربندی های REو DAPI شاید بتوان نتیجه گیری نمود که ژنوم این گونه ماهی نواحی غنی از نوکلئوتیدهای G وC بیشتری نسبت به A و T دارد. در موجوداتی که از لحاظ تکاملی پیشرفته می باشند قسمت های غیر رمز شونده گسترده شده و نسبت به موجودات پست تر توسعه یافته می شوند، به طوری که اختلاف در ژنوم موجودات یوکاریوت مربوط به این قسمت ها است. در این بخشها از DNA چینش های تکراری بسیار زیاد بوده و به همین دلیل است که نواربندی های مبتنی بر بازهای GC و یا AT در پستانداران نسبت به موجودات خونسرد نتایج بهتری داشته است(۷). در این نواربندی ها به دلیل تیمارهای مختلف کروموزوم ها شکل طبیعی خود را از دست می دهند و نمی توان آنها را کاریوتیپ نمود. مطالعات کاریولوژی این گونه در مقاله دیگری(۱) ارایه شده است.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر فرهید همت زاده به منظور فراهم نمودن تجهیزات و لوازم مورد نیاز پروژه تشکر به عمل می آید. از مهندس سعید اسداله کارشناس محترم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان که در امر صید ماهی کمک های شایانی نمودند سپاسگزاری و قدردانی می گردد.

منابع

۱-امینی. فرهاد، همت زاده. آذر(۱۳۹۱): بررسی کروموزومی ماهی کپور دندانی زاگرس*Aphanius vladykovi* . مجله تحقیقات دامپزشکی،دوره ۶۷، شماره ۳، ۲۵۱-۲۵۶.

2- Al-Sabti. K . 1991. *Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes*. J. Stefani institute ljublijana Yugoslavi. pp: 221.

3- Coad. B.W, Keivany. Y. 2000. *Aphanius vladykovi* Coad, 1988 Zagros pupfish mahi-e gour-e khari, Journal of the American Killifish Assoc, 33(6), 195-198.

4-Coluccia. E, Deiana. A. M, Cannas. R, Salvadori. S . 2006 . Study of the nucleolar organizer regions in *Palinurun elephas* (Crustacea: Decapoda). Journal of Hydrobiologia. 557: 5-8.

5- Cross. I, Diaz. E, Sanchez. I, Rebordinos. L . 2005. Molecular and cytogenetic characterization of *Crassostrea angulata* chromosomes. Journal of Aquaculture. 247; 135-144.

6-- Esmaeili. H. R, Piravar. Z, Shiva. A. H. 2007. Karyological analysis of two Endemic Tooth- Carp, *Aphanius persicus* and *Aphanius sophiae* (Pisces: Cyprinodontidae), from southwest Iran. Tork Journal Zoology. 31:69-74.

7-Foresti. F. P, Oliveira. C, Tabata. Y. A, Rigolino. M. G, Foresti. F. 2007. NOR marker in the identification and mangment of cultured fish species: The case of Rainbow Trout stock reared in Brazil. In . Fish cytogenetics. Pisano. E, Ozouf-Costaz. C, Foresi. F, Kapoor. B. G. (Eds). Science Publishers. Chapter 3-3. Pp:333-357.

8- Fortes. G. G, Bouza. C, Vinas. A, Mortines. P, Sanchez. L . 2007. Diversity in isochore structure and chromosome banding in fish. In

Archive of SID

www.SID.ir

Fish cytogenetics. Pisano. E, Ozouf-Costaz. C, Foresi. F, Kapoor. B. G. (Eds). Science Publishers. Chapter 4-3. Pp:405-420.

9- Gold. J. R, Li. Y. C, Shipley. N. S and Powers. P. k . 1990 . Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding, Journal of Fish Biology, 37, 563-575.

10- Hayes. H . 2000. Chromosomal banding techniques. In Techniques in animal cytogenetics. Papescu. P, Hayes. H, Dutrillaux. B. (Eds). Springer. Pp:25-68.

11- Leitao. A, Chaves. R, Santos. S, Pinto. H. G, Boudry. P. 2007 . Interspecific hybridization in oystr: Restrictoin enzyme digestion chromosome banding confirms *Crassostrea angulata* X *Crassostrea gigas* F1 hybrids. Journal of Experimental marin biology and Ecology. Volume 343, Issue 2, Pages 253-260.

12- Rivlin. K, Rachlin. J. W and Dale. G . 1985 . A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding, Journal of Fish Biology, 26, 267-272.

13- Rocco. L, Morescalchi. M. A, Costaliola. D, Stingo. V . 2002 . Karyotype and genome characterization in four cartilaginous fishes. An international Journal of genes and genomes. 295: 289-298.

14- Sharma. O. P, Tripathi. N. K, Sharma. K. K . 2002 . A review of chromosome banding in fishes. In Some aspect of chromosome structure and function. Sobti. R. C, Obe. G, Athwal. R. S. (Eds). Narosa. Pp109-122.

15- Swarca. A. C, Fenocchio. A. S, Cesteri. M. M, Dias. A. L. 2005. First chromosome data on *Steindachaneridion scripta* from Brazilian rivers: Gimsa, CBG, G-, and RE banding. Journal of Genetics and molecular research. 4(4): 734-741.

16- Vitturi. R, Colomba. M, Vizzini. S, Libertini. A, Barbieri. R, Mazzola. A. 2005 . Chromosomal location polymorphism of major rDNA sites in two Mediterrnean populations of the killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) . Micron. 36: 243-246.

Archive of SID

www.SID.ir