ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۷۰-۶۵

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 مرکز تحقیقات بیولوژی، سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.
۳- دانشیار انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت.
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Shemaya1975@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

در این بررسی ۷۱ نمونه ماهی شاه کولی *Alburnus chalcoides* از رودخانه‌های هراز، شیرود 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 PCR، ۸۳۱ جفت‌باز بوده است. به کمک نرم افزار DNAsis آنزیم‌های *Hinc*II *Hae*III ،*Eco*RV ،*Bam*HI ،*Taq*I ،*Tsp*45I ،*Rsa*I ،*Ppu*MI ،*Hinf*I جهت مطالعات هضم آنزیمی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. الگوهای هضم آنزیمی با ژل آگارز دو درصد و رنگ‌آمیزی 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 می‌توان گفت که پدیده پلی‌مرفیسم با استفاده از آنزیم‌های 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،
سیتوکروم *b*،
شاه کولی *A. chalcoides*،
PCR- RFLP.

مقدمه

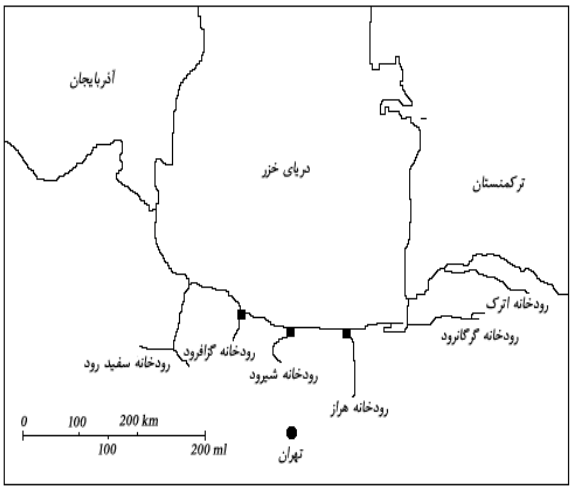
گونه شاه کولی *A. chalcoides* از گونه‌های بنتوپلاژیک بوده و در آب‌های لب شور و شیرین زندگی می‌کند و برای تولیدمثل به رودخانه‌ها مهاجرت می‌نماید (Slastenenko 1955). این گونه دارای پراکنش وسیعی در رودخانه‌های حوزه دریای خزر، آرال و سیاه می‌باشد (Bogutskaya 1997). شاه کولی یک ماهی ریزجثه و مورد پسند مردم شمال ایران است که از اواخر فروردین تا اواخر تیر جهت تولید مثل وارد رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای 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 به‌عنوان یک روش قابل اعتماد استفاده می‌گردد (Nahavandi et al. 2007).

Archive of SID

تنوع ژنتیکی، در جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی فاصله زیادی از هم دارند(Karakousis et al. 1991) و یا در جمعیت‌هایی که از نظر اکولوژیکی با هم متفاوت هستند، وجود دارد (Hindar et al. 1991). در مطالعات مولکولی معمولا از DNA میتوکندری به عنوان یک نشانگر بسیار مناسب که عمدتاً به‌صورت وراثت مادری منتقل می‌شود، استفاده می‌گردد (Avise 1994) که می‌توان با استفاده از روش PCR- RFLP تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را مشخص نمود (Berrebi 1996). همچنین ژن سیتوکروم *b* دارای محل‌های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه‌هایی است که از نظر مرفولوژیکی خیلی به هم نزدیک هستند. لذا این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌گردد (Brioly et al. 1998; Zardoya and Meyer 1996). علیرغم ارزش اقتصادی شاه کولی در حوزه جنوبی دریای خزر و ارزش حفاظتی آن‌که از نظر طبقه بندی IUCN[1] 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 Takami and Rajabinejad 2002; Khaval 1997; Karimpour 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 گزافرود و شناخت ذخایر ژنی این‌گونه با استفاده از روشPCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه‌های شاه کولی در بهار ۱۳۸٤ از سه رودخانه حوزه جنوبی دریای خزر بوسیله تور سالیک صید شد. تعداد ۲٤ 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 میلی‌گرم از باله ماهی در الکل مطلق تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شد (Pourkazemi 1996; Rezvani Gilkolai 1997). بر اساس روش Sumbrook and Russell (2001) در 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 C˚ ۵۵ قرار داده شد.



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

سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فنل به آن اضافه شده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ *g* ٥٣٦٦ 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 *g* ٥٣٦٦ قرار داده و مجددا 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 الکل مطلق سرد اضافه نموده و در سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۰ دقیقه، *g* ۱۲۰۷٤ و در دمای C˚ ٤ سانتریفوژ نموده، محلول حاصل را دور ریخته و لوله حاوی DNA را با الکل ۷۰ درصد شستشو داده و به‌مدت ۲ دقیقه و *g* ۱۲۰۷٤ مجدداً سانتریفوژ نموده و محلول را دور ریخته و لوله‌ها در دمای آزمایشگاه کاملا خشک شدند. به رسوب حاصل مقدار ٤۰ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در بن ماری C˚ ۳۷ 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 TBE یک درصد) لود شده و با

[1] International Union for Conservation of Nature

Archive of SID
www.SID.ir

ولتاژ ۸۰–۶۰ 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 ۱۱۴۰ جفت‌باز 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[1] (۱): 5'-CTAGTCGATCTTCCAACACC-3'

آغازگر پسگرد[2] (۲): 5'-TAGTGCAAGAACCCCGCCTA-3'

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

میزان مورد نیاز	نوع ماده
1µg	DNA
1unit	Tag DNA polymerase
1x	Buffer
1.5 mM	$MgCl_2$
0.2 mM	dNTP
10 Pmol	PrimerFor
10 Pmol	PrimerRev
50 µl	حجم نهایی

محلول فوق در لوله های 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)

۹۴ °C ۵ دقیقه

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

۹۴ °C ۳۰ ثانیه

اتصال آغازگر (Annealing)

۵۷ °C ۴۰ ثانیه

بسط (Extension)

۷۲ °C ۴۰ ثانیه

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

۷۲ °C ۵ دقیقه

برای انجام تجزیه RFLP با توجه به توالی ژن مورد نظر و جایگاه خاص هر آنزیم، آنزیم‌های *Hinc*II ,*Hae*III ,*Eco*RV ,*Bam*HI, *Taq*I ,*Hinf*I ,*Ppu*MI ,*Rsa*I ,*Tsp*45I, انتخاب شدند و جهت انجام واکنش محلول زیر تهیه شد.

محلول PCR	۱ µg (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 به‌همراه مارکر Fast Ruler™ DNA Ladder Low Range مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل آماری و محاسبه تنوع نوکلئوتیدی یا هاپلوتیپی بین افراد یا گروه‌ها 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 ۸۱۰ pb با استفاده از پرایمرها 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 آنزیم‌های برش دهنده روی تمامی نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱– 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

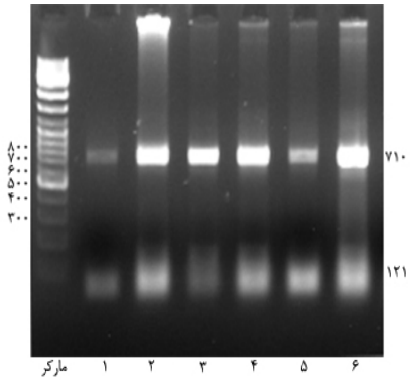
* جمع اندازه‌های تمام الگوها برای هر آنزیم pb ۸۳۱ است.

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 سیتوکرم *b* مستقر روی mtDNA با

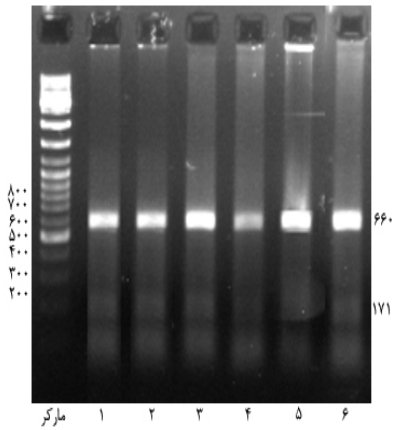
[1] Forward
[2] Reverse

Archive of SID
www.SID.ir

این آنزیم‌ها، 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 Phylip امکان-پذیر نبوده است. از بین نمونه‌های مورد مطالعه، فقط محصول PCR یک نمونه از رودخانه گزافرود با آنزیم برش دهنده متفاوت با الگو برش داده شد (شکل ٤).

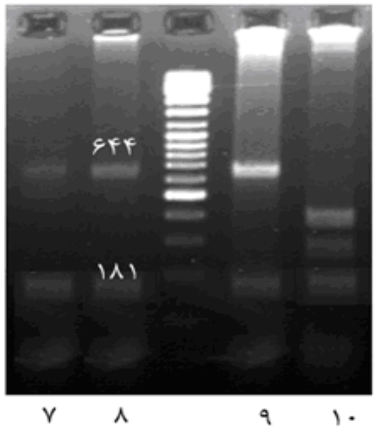


شکل ۲- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *EcoRV* روی ژل آگارز دو درصد. شماره‌های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره‌های ۳ و ٤ مربوط به رودخانه شیرود و شماره‌های ۵ و ٦ مربوط به رودخانه گزافرود می باشد.



شکل ۳- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *Hae*III روی ژل آگارز دو درصد. شماره‌های ۱ و ۲ مربوط به رودخانه هراز، شماره‌های ۳ و ٤ مربوط به رودخانه شیرود و شماره‌های ۵ و ٦ مربوط به رودخانه گزافرود می‌باشد.

TaqI



شکل ٤- الگوی هضمی محصول PCR ماهی شاه کولی با آنزیم *Taq*I 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 نتوع ژنتیکی آن‌ها می نماید و یکی از راه‌های مطالعه ساختار ژنتیکی، استفاده از ژنتیک جمعیت می‌باشد. شناسایی تحولات درون گونه-ای و ساختار جمعیت‌ها یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره‌برداری می‌باشد (Rezvani Gilkolai 1997). RFLP 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 هاپلوئیدی کمی را نشان داده و در واقع تعداد هاپلوتیپ‌های موجود مشتقات جهش-یافته می‌باشند (Billington and Herbert 1991). تغییرات DNA میتوکندری ممکن است به‌عنوان ابزاری در تفکیک و مدیریت ذخایر گونه‌های مختلف ماهی مفید باشد (Billington et al. 1992).(1996) Berrebi 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 سیتوکوم *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 برش‌دهنده 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 قطع‌کننده 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 گونه‌های دیگر مقایسه شدند. Laloui et al.(2003) در سال ۱۳۸۲ در بررسی تنوع ژنتیکی سس ماهی دریای خزر (*Barbus capito*) با استفاده از ژن سیتوکروم *b* و ۱۰ آنزیم برش‌دهنده و به کمک روش RFLP پلی مرفیسم را بین جمعیت‌ها و یا درون آن‌ها مشاهده نکردند (Brioly et al. 1998). ایشان معتقدند که موانع 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، Wolf et al. (1999) در بررسی محصول PCR ٤٦٤ جفت‌بازی ژن سیتوکروم *b* و با روش RFLP در تاس‌ماهیان علاوه بر پلی مرفیسم و تعیین تنوع بین گونه‌ها ٤ آنزیم محدود کننده را به‌عنوان مارکرهای مولکولی بیان کردند. Imsiridou et al. (1998) 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 ویا آنزیم‌های برش‌دهنده موثرتر ویا از نشانگرهای 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 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 chalcoides* 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. Trady 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 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.

Archive of SID
www.SID.ir

Brioly J, Galyiev N, Brito RM, Bouvet Y (1998) Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequence. Md. Phylogenic 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, 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). 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. 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.

Archive of SID

www.SID.ir