

بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آبهای حوضه جنوبی خزر بروش PCR - RFLP

فرامرز لالوئی^(۱)، سهراب رضوانی^(۲) و محمد پورکاظمی^(۳)

laloei@yahoo.com

۱- بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶

۳- انسستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۴۶۴

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۱

چکیده

در این بررسی ۶۰ عدد ماهی از گونه *Barbus capito* از دریا و رودخانه‌های استان مازندران و گیلان جمع آوری گردید. DNA با روش فل - کلروفرم از بافت باله این ماهی استخراج شد. براساس توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ماهی *Barbus capito* یک PCR با ۶۰ نمونه ماهی و با برنامه مناسب انجام شد که جفت پرایمر طراحی گردیده و PCR با نتیجه آن محصول PCR ۱۰۶۲bp از نمونه‌ها بدست آمد. جهت انجام آنالیز (۱) RFLP از آنتریزیم‌های *AhuI*, *TaqI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *RsaI*, *HpaII*, *AvaI* برای هضم محصول PCR استفاده شد. الگوهای هضم آنزیمی با ژل پلی اکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید. این الگوها برای تمام نمونه‌ها مشابه بود. براین اساس می‌توان گفت که پدیده پلی مورفیسم با استفاده از آنزیم‌های فوق و ژن سیتوکروم b میتوکندری در ماهی *B. capito* قابل مشاهده نبوده و جمعیتی قابل جداسازی تشخیص داده نشد و تمام افراد، از ژنتوتیپ هموژن برخوردار بودند.

لغات کلیدی: *Barbus capito*, PCR, RFLP, mtDNA, تنوع ژنتیکی، دریای خزر، ایران

اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آبزیان و توسعه آبزی پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنی گونه های بومی، مورد مطالعه قرار گرفته باشند. اولین گام در این زمینه، تشخیص صحیح گونه ها، جمعیت ها و یا نژادها می باشد که این امر هم از نظر مدیریت شیلاتی و هم برای برنامه حفاظت از گونه ها حائز اهمیت است.

سی سال ماهیان از ماهیان اقتصادی ایران می باشد که از اهمیت خاصی برخوردار هستند. از این ماهی ها تاکنون ۸۰۰ گونه در جهان شناسایی شده است (Howes, 1987) که ۱۵ گونه در ایران یافت می شود (رامین، ۱۳۷۸).

گونه *Barbus capito* در رودخانه های کورا، ارس، سفیدرود، گرگانرود و اترک وجود دارد. ماهی *B. capito* در اندازه های متوسط و نسبتاً بزرگ در دریای خزر و تالاب انزلی و رودخانه ها صید می شود. عنوان مثال صید آن در سال ۱۳۷۷ در دریا و تالاب انزلی در حدود ۳۰ تن گزارش شده است (رامین، ۱۳۷۸) و نمونه هایی با طول ۸۰ سانتیمتر در رودخانه سردآبرود صید شده است (عبدیلی، ۱۳۷۳).

مواد ژنتیکی اعم از کروموزومی یا خارج از کروموزومی در معرض تغییرات و جهش های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون سلول و یا بیرون از ارگانیسم، در هنگام همانندسازی سبب جابجا یی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می شوند. ژنوم میتوکندری عنوان یک نشانگر ژنتیکی بطور گستره ای برای مطالعات ژنتیکی بکار می رود (Hynes *et al.*, 1996 ; Ovenden, 1990)

اندازه mtDNA در اکثر ماهیان حدود 16500 ± 500 جفت باز می باشد (Rezvani Gilkolaei, 1997). در گونه های جانوری، ژنوم میتوکندری دارای ۳۷ ژن می باشد که عبارتند از ۱۳ ژن رمز دهنده پروتئین، ۲۲ ژن rRNA و یک ناحیه عنوان آغاز همانندسازی یا D-loop (Rezvani Gilkolaei, 1997). در مطالعات مختلف دو منشاء پدری و مادری برای mtDNA ثابت شده است. هر چند که ژنوم میتوکندری جانوری اغلب منشاء مادری دارد (Avise *et al.*, 1989 ; Gyllensten *et al.*, 1991) ولی منشاء پدری ژنوم میتوکندری در دروزوفیلا

و موش گزارش شده است (Kondo *et al.*, 1991 ; Gyllensten *et al.*, 1990).

باتوجه به اینکه میتوکندری منشأ مادری دارد و نوترکیبی در آن انجام نمی‌گیرد، لذا این خاصیت باعث بروز اختلاف ژنتیکی بیشتر در ژنوم میتوکندری نسبت به ژنوم هسته شده است. از اینرو نشانگر خوبی برای تشخیص گروههایی که برای 10^0 یا 10^{10} سال از هم جدا بوده‌اند، می‌باشد (Berrebi, 1996). سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است که ۲ درصد تغییر به ازاء هر میلیون سال می‌باشد.

سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است. ژنهای tRNA و tRNA نسبت به سایر قسمتها محفوظ‌تر و ناحیه D-loop منطقه‌ای است که بیشترین تغییر را دارا می‌باشد. این ناحیه تنوع کافی با قابلیت تمایز زیاد را در سطح جمعیت نشان می‌دهد (Beckenbach, 1991). همچنین ژن سیتوکروم b دارای محلهای اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباطات فیلوزنی بین گونه‌هایی است که از نظر مورفولوژی خیلی بهم نزدیک هستند. بنابراین این ژن یک نشانگر قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوزنیک محسوب می‌گردد (Zardoya & Myer, 1996 ; Briolay *et al.*, 1998).

PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، تکنیکی است که در آن تکثیر قطعه‌ای از DNA بطور انتخابی به میزان هزار و یا حتی میلیون برابر امکان پذیر می‌باشد.

آنالیز RFLP ناشی از توانایی یک آنزیم محدود کننده در بریدن جایگاههای اختصاصی از توالی نوکلئوتیدها در DNA است. اگر جهشی در جایگاه برش آنزیم واقع شود، جایگاه اختصاصی نسبت بعمل آنزیم پوشیده می‌شود و عمل آنزیم الگوی جدیدی از قطعات را ایجاد می‌کند، در اینصورت محل شناسایی در توالی DNA چنان تغییر می‌یابد که برش آن توسط آن آنزیم اختصاصی ممکن نیست. این محلها را تحت عنوان، پلی مورفیسم طولی قطعات محدود (RFLP) نامیده‌اند. از مزیت‌های مهم آنالیز RFLP قدرت تشخیص آن می‌باشد و به همین دلیل بعنوان یک تکنیک مطمئن برای مطالعات سیستماتیک و تعیین نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها و همچنین آنالیز جمعیت‌ها توسعه یافته است (Chow & Inoue, 1993 ; Cronin *et al.*, 1994).

هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی گونه *B. capito* در هر یک از مناطق نمونه‌برداری

Archive of SID

شده و شناخت ذخایر زنی این گونه با استفاده از روش PCR-RFLP بوده است.

مواد و روشها

در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه گونه *Barbus capito* از استان مازندران (۱۵ نمونه از دریا و ۵ نمونه از هر یک از رودخانه‌های تجن، شیروود و تنکابن) و ۳۰ نمونه از استان گیلان (۱۵ نمونه از دریا، ۷ نمونه از رودخانه حويق و ۸ نمونه از سفیدرود) جمع‌آوری گردید. جهت استخراج، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از باله ماهی در الكل مطلق تشییت و به آزمایشگاه منتقل شده است

.(Pourkazemi, 1996 ; Rezvani Gilkolaci, 1997)

استخراج DNA باروش فنل-کلروفرم انجام گردیده است (Fevolden & Pogson, 1997 ; Rezvani Gilkolaci, 1997 : Miler et al., 1988) برای این منظور ابتدا مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از باله ماهی را در یک میکروتیوب ریخته و مقدار ۱۰ μ l STE ۵۰۰ μ l SDS ۳۰ μ l و ۱ μ l ۳۰ پروتئیناز K به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴ تا ۵ ساعت در بن ماری ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (بهتر است نمونه‌ها به مدت یک شب در این حالت بمانند). سپس مقدار ۱۰۰ فنل به آن اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای اتاق روی همزن قرار گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها در ۱۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از دو لایه تشکیل شده، لایه رویی به دقت جدا گردید و در یک لوله دیگر ریخته شد. سپس مقدار ۱۰۰ μ l کلروفرم به آن اضافه گردید و در ۱۳۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مجدداً لایه رویی جدا و مقدار ۱۰ μ l استات سدیم و ۸۰ μ l الكل مطلق به آن اضافه شد. محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس الكل رویی را دور ریخته و رسوب تشکیل شده که همان DNA است با الكل ۷۰ درجه شستشو داده شد و برای تبخير کامل الكل، نمونه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داد شد. به رسوب، مقدار ۵۰ μ l آب مقطر اضافه شد تا DNA حل گردد. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱ درصد و

Archive of SID

رنگ آمیزی اتیدیوم بر ماید و نیز اشعه uv استفاده گردید و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه گردید.

کمیت و کیفیت محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و استفاده از مارکر (DNA/Hind III) بررسی شد.

برای جداسازی و تکثیر ژن مورد نظر، مولکول mtDNA مورد PCR قرار گرفت که در انجام آن از جفت پرایمرهای سس ماهی استفاده شده است.

توالی پرایمرهای سس ماهی :

پرایمرها از روی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندری ماهی *B. capito* و با استفاده از نرم افزار DNAsis طراحی گردید. با استفاده از توالی فوق، ۵ یکی از پرایمرها باز شماره ۹ و ۵ پرایمر دیگر باز شماره ۱۰۷۰ ژن مورد نظر بوده است. تعداد نوکلئوتیدهای هر یک از پرایمرها ۱۸ نوکلئوتید بوده که ترتیب آن شامل :

۱: پرایمر ۵' - C T A C G A A A A A C A C A C C C - ۳'

۲: پرایمر ۵' - A G G G C T G A T G C A A T T T G T - ۳'

با استفاده از این پرایمر محصول PCR قابل پیش بینی ، ۱۰۶۲ bp می باشد.

جهت انجام PCR، ابتدا محلول ذیل آماده گردید:

DNA	$1\text{-}5 \mu\text{l}$	غلظت $50\text{-}100\text{ ng}$
Taq DNA Polymerase	$0.5 \mu\text{l}$	
Buffer PCR	$5 \mu\text{l}$	
MgCL ₂	$2 \mu\text{l}$	غلظت 50 mM
dNTP *	$0.5 \mu\text{l}$	غلظت 2 mM
Primer(1)	$1/5 \mu\text{l}$	غلظت 10 ng
primer(2)	$1/5 \mu\text{l}$	غلظت 10 ng
d H ₂ O	$33\text{-}37 \mu\text{l}$	

$\overline{50 \mu\text{l}}$

* dNTP (dATP - dGTP - dTTP - dCTP)

پس از آماده سازی، محلول فوق درون دستگاه Thermal cycler قرار گرفته و PCR با برنامه ذیل انجام شده است.

مرحله اول	تک رشته شدن - مقدماتی (Denaturation)	۹۴ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه
۱ چرخه			
مرحله دوم			
۳۰ چرخه			
۳۰ ثانیه	درجه سانتیگراد ۹۴ (Denaturation)	۹۴ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
۳۰ ثانیه	اتصال پرایم (Annealing)	۵۵ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه
۱ دقیقه	سنتر DNA (Extention)	۲۲ درجه سانتیگراد	۱ دقیقه
۱ چرخه	Extention (نهایی)	۲۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه

برای انجام آنالیز RFLP از آنزیم‌های *DdeI*, *HpaII*, *HincII*, *HinfI*, *AvaII*, *AvaI*, *Sau3AI* و *TaqI*, *RsaI*, *HaeIII* استفاده شد. برای این منظور مقدار $8\ \mu\text{l}$ محصول PCR، $1\ \mu\text{l}$ آنزیم و $2\ \mu\text{l}$ بافر آنزیم را در یک میکروتیوب با آب مقطر به حجم $20\ \mu\text{l}$ رسانده و به مدت ۲-۳ ساعت درون بن‌ماری 37°C درجه سانتیگراد قرار گرفت.

محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی اکریلی آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره همراه با مارکر DNA - Hind III/ X - 174 DNA - مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم به خوبی انجام شده است. با استفاده از پرایمرهای سنتر شده، ناحیه مورد نظر نیز بوسیله تکنیک PCR تکثیر یافت. استفاده از پرایم سس ماهی منتج به بروز باند DNA در تمام 60 نمونه مورد نظر گردید که اندازه باند این نمونه‌ها مشابه بوده و در حد $1062\ \text{bp}$ بوده است. برای هضم آنزیمی 1062 جفت باز محصول PCR نمونه‌ها، تعداد 10 آنزیم، شامل *RsaI*, *DdeI*, *HpaII*, *HincII*, *HinfI*, *AvaII*, *TaqI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *AvaI* مورد استفاده قرار گرفت و الگوهای الکتروفورزی با ژل پلی اکریل آمید بدست آمد. شکل‌های 1 و 2 نمونه‌ای از

Archive of SID

قرار گرفت و الگوهای الکتروفورزی با ژل پلی اکریل آمید بدست آمد. شکلهای ۱ و ۲ نمونهای از الگوهای هضم آنزیمی و جدول ۱ اندازه قطعات ایجاد شده بر اثر عمل آنزیم‌های محدود کننده بر روی هر نمونه را نشان می‌دهد.

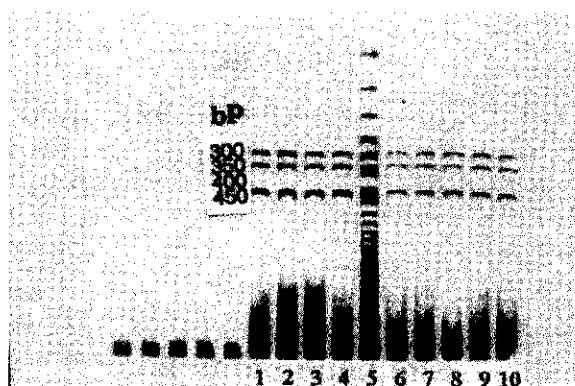
جدول ۱ : تعداد و طول قطعات ایجاد شده براثر هضم آنزیمی محصولات PCR

نام آنزیم	تعداد قطعات	طول قطعات (bp)							
<i>Ava I</i>	۳	۲۸۸	۳۹۲	۳۸۲					
<i>Ava II</i>	۳	۳۴۳	۴۰۲	۳۱۷					
<i>Dde I</i>	۷	۱۱۲	*۳۰	۲۷۰	*۷۲	۱۴۴	۲۵۸	۱۷۶	
<i>Hae III</i>	۴	۱۳۴	۱۵۹	۱۰۵	۶۶۴				
<i>Hinc II</i>	۲	۴۷	۱۰۱۵						
<i>Hinf I</i>	۳	۴۸۰	*۴۲	۵۴۰					
<i>Hpa II</i>	۲	۱۳۲	۹۳۰						
<i>Rsa I</i>	۴	۳۸۶	۶۳	۴۴۱	۱۷۲				
<i>Sau3AI</i>	۴	۲۲۶	۶۱۱	۱۶۶	*۵۹				
<i>Taq I</i>	۲	۶۰۵	۴۵۷						

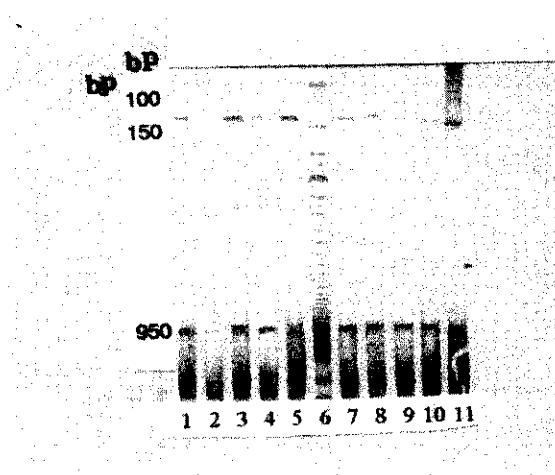
* این قطعات بعلت کوچکی در برخی موارد مشاهده نشدند.

قابل ذکر است که جمع اندازه‌های تمام الگوها برای هر آنزیم ۱۰۶۲ bp می‌باشد.

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 این آنزیم‌ها، تنوع ژنتیکی و یا پلی‌مورفیسم بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد بین مناطق مختلف را نشان نمی‌دهد. لذا انجام هرگونه آنالیز آماری برای محاسبه Haplotype diversity یا Nuclutide diversity رسم درخت خویشاوندی، بین افراد یا گروه‌ها با بهره‌گیری از نرم افزارهای اختصاصی برای این منظور مانند برنامه‌های Reap و Phylip امکان پذیر نبوده است.



شکل ۱: الگوهای هضمی محصول PCR ماهی *Barbus capito* با آنزیم *Ava II* بر روی ژل پلی آکریل آمید. ستونهای ۱ تا ۴: نمونه‌های رودخانه. ستون ۵: مارکرو ستونهای ۶ تا ۱۰: نمونه‌های دریا.



شکل ۲: الگوهای هضمی محصول PCR ماهی *Barbus capito* با آنزیم *Hpa II* بر روی ژل پلی آکریل آمید. ستونهای ۱ تا ۵: نمونه‌های رودخانه. ستون ۶: مارکرو ستونهای ۷ تا ۱۱: نمونه‌های دریا

ناحیدای از ژنوم میتوکندری هایی که مورد مطالعه قرار گرفته، ژن سیتوفلکروم b بوده که هر یک از آنژیمها تنها یک نوع الگوی الکتروفورزی برای تمام نمونه ها را نشان دادند و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی مشاهده نگردید. عدم مشاهده پلی مورفیسم در نمونه های جمع آوری شده از چند جهت قابل تفسیر می باشد. اول اینکه موانع فیزیکی رودخانه ها و دریا ای خزر و یا موانع زیستی وجود نداشته است که موجب ایجاد تفاوت های معنی داری بین افراد گونه *B. capito* در مناطق مختلف نمونه برداری شود و در واقع گروه ها از نظر ژنتیکی هموژن و یکنواخت هستند و تفاوتی بین آنها وجود ندارد. البته استفاده از ژنهای دیگر mtDNA و یا استفاده از تعداد نمونه های بیشتر بین آنها وجود ندارد. دوم اینکه احتمالاً ژن سیتوفلکروم b، ژن مناسبی برای بررسی جمعیت سسن ماهیان نبوده و نمی تواند بخوبی اختلاف بین جمعیت ها را نشان دهد. با توجه به اینکه متوسط تعداد نوکلئوتید هایی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفته است، حدود ۱۱۲hp می باشد، در واقع ۹۵ درصد از ژن سیتوفلکرم b و یا حدود ۱ درصد از کل ژنوم میتوکندری ها در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است. به همین منظور جهت اطمینان می باشد ناحیدای دیگری از ژنوم میتوکندری مثل ناحیده ND5/6-D-loop مورد مطالعه قرار گیرد.

Ovenden در سال ۱۹۹۰ مطرح کرد که بطور کلی احتمالاً در ارگانیزم های دریایی، تنوع mtDNA خیلی کم است و عواملی مانند اثر شرایط نامناسب و محدود و یا مرگ و میرهای فامیلی که به دلایل ویژه ای اتفاق می افتد، یکی از عوامل بروز اختلافات نوکلئوتیدی می باشد (Pourkazemi, 1996). اغلب گزارشات مربوط به آنالیز mtDNA، تنوع هاپلوتیپی کمی را نشان می دهد و در واقع تعداد هاپلوتیپهایی که وجود دارد، مشتقات جهش یافته می باشد (Billington & Hebert, 1991).

استفاده از مولکول mtDNA برای تمايز جمعیت های گونه های ماهیان خاویاری دریای خزر (Rezvani Gilkolaei & Skibinski, 1999 ; Rezvani Gilkolaei, 2000) و یا گونه های میگوی خلیج فارس و دریای عمان (رضوانی گیل کلایی و همکاران، ۱۳۸۰) دارای نتایج مناسب و قابل قبولی بوده است.

Doadrio و Zardoya در سال ۱۹۹۹ با استفاده از توالی ژن سیتوفلکروم b ارتباط فیلوجنی ۵۲ زیر گونه از کپور ماهیان یونان را بررسی نمودند و ارتباط فیلوجنی این ماهیان مشخص شده است.

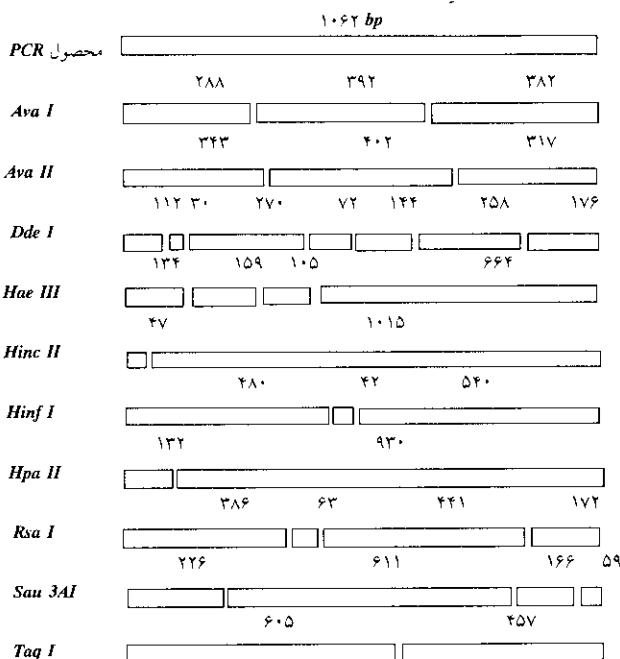
Archive of SID

آنها کپور ماهیان را به دو گروه اصلی شامل کپور، goldfish و سس ماهیان و گروه دوم شامل جنسها و گونه‌های :

Leuciscus, Vimba, Tropidophoxinellus, Scardinius, Gobio, Pseudophoxinus, Pachychilon, Alburnus, Chalcalburnus, Leucaspis, Blicca, Abramis, Leuciscus, Rutilus, Phoxinellus, Chondrostoma, Alburnoides species.

در این تحقیق اطلاعات توالی ژن سیتوکروم b برای نشان دادن اختلاف بین اجداد کپور ماهیان یونان، دانوب و جنوب مدیترانه مناسب بوده ولی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b جهت بررسی ارتباط فیلوژنی و ریشه کپور ماهیان اروپا مناسب نبوده و برای این منظور توالی ژنهای دیگر از میتوکندری و زنهای هسته لازم بود (Zardoya & Doadrio 1999).

Berrebi در سال ۱۹۹۵ با روش PCR-RFLP و آلوژایم‌ها ۳۱ گونه از باریوس ماهیان شمال مدیترانه را مطالعه و ارتباط بین گونه‌های مختلف را بررسی نمود. قابل ذکر است که گونه در تحقیق فوق مورد بررسی قرار نگرفته است.



شکل ۳: شکل شماتیک تعداد و طول قطعات ایجاد شده بر روی محصل PCR ماهی *B. capito* توسط آنزیمهای محدود کننده

Archive of SID

از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی استاد محترم دانشکده علوم پزشکی دانشگاه سهید بهشتی که با راهنمایی های خود و با در اختیار گذاشتن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی موجبات انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر بعمل می آید. همچنین از آقای محمد علی افرایی که در نمونه برداری ماهیان همکاری نموده اند تشکر می گردد.

منابع

- رامین، م.، ۱۳۷۸. شناسایی و تعیین پراکنش باربوس ماهیان ایران. پایان نامه دکترا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. ۱۷۰ صفحه.
- رضوانی گیل کلائی، س.؛ سید علی بابایی، س.ع. و پور کاظمی، م.، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I بروش RFLP. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال دهم، تابستان ۱۳۸۰، صفحات: ۱۵ تا ۳۰.
- عبدلی، الف.، ۱۳۷۳. هیدرولوژی و هیدروبیولوژی رودخانه سردآبرود. مرکز تحقیقات شیلاتی مازندران. ۴۵ صفحه.

Avise, J.C. ; Helfman, G.S. ; Saunders, N.C. and Heles, L.S. , 1989. Mitochondrial DNA different in North Atlantic eels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 83, pp.4350-4354.

Beckenbach, A.T. , 1991. Rapid mt DNA sequence analysis of populations using the polymerase chain reaction. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol.48,(suppl.1). pp.45-81.

Berrebi, P. , 1996. Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. Biological conservation. Vol. 72, pp.237-249.

Billington, N. and Hebert, P.D.N. , 1991. Mitocondrial DNA diversity in fishes and

Archive of SID

- Billington, N. and Hebert, P.D.N. , 1991.** Mitocondrial DNA diversity in fishes and its implication for introductions. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 48 (supp.1), pp.80-94
- Brioly, J. ; Galtiev, N. ; Brito, R.M. and Bouvet, Y. , 1998.** Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequence. md. phylogenetic. Vol.9, pp.100-108.
- Chow, S. and Inoue, S. , 1993.** Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in Mitochondrial genes of *Thunnus tuna* species. Bull. Nat. Res. Inst. fav sea fish. Vol. 30, pp.207-225.
- Cronin, M.A. ; Hillis, S. ; Born, E.W. and Potton, C. , 1994.** mtDNA variation in atlantic and pacific waleruses. Can. 3.200 L.72, pp.1035-1043.
- Fevolden, S.E. and Pogson, G.H. , 1997.** Genetic divergence at the synaptophysin locus amons Norwegian coastae and noth-east Arctic population of Atlantic cod. Journal of fish Biology. Vol. 51, pp.895-908.
- Gyllensten, U. ; Wharton, D. ; Josefsson, A. and Wilson, A.C. , 1991.** Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature. Vol. 352, pp.255-257.
- Howes, G.J. , 1987.** The phylogenetic position of the Yugoslavian Cyprinid fish *Danuš gulopyge* Heckel, 1841, with an appraisal of the genus *Barbus* Cuvies and Dopuet, 1816, and the subfamily cyprinidae. Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. 2ad., Vol. 52, pp.165-96.
- Hynes, R.A. ; Ferguson, A. and Mccann, M.A. , 1996.** Variation in mtDNA and post-glacial colonisation of north western Europe by brown trout. Journal of fish

Archive of SID

Biology. Vol. 48, pp.54-61.

Kondon, R. ; Satta, Y. ; Matsuura, F.T. ; Ishiwa, H. ; Takahata, N. and Chigusa, S.I., 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. Genetics. Vol. 126, pp.675-663.

Miller, S.A. ; Dykes, D.D. and Polesky, H.F. , 1988. A simple salting out procedure for entrating DNA from human nuckated cells. Vol. 16, 1215 P.

Ovenden, J.K. and White, R.W.C. , 1990. Mitochondrial and Allozyme genetics of incipient in a landlocked population of *Galaxias truttaceus* (plcs: Galaxidae). Genetics. Vol. 124, pp.701-716.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stock from the south Caspian Sea. School of Biological Scince, University of Wales. 258 P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 1997. Molecular population genetic studies of sturgeon species in the south Caspian Sea. School of Biological Sciences, University of Wales. 196 P.

Rezvani Gilkolaei, S. , 2000. Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from the south Caspian Sea using RFLP analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions. Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 2, No. 1, pp.13-36.

Rezvani Gilkolaei, S. and Skibinski, D.O.F. , 1999. Polymerase chain reaction and direct sequencing of mtDNA from the ND5/6 gene region in Persian sturgeon *Acipenser persicus* from the southern Caspian Sea. Iranian Hournal of Fisheries

Archive of SID

Sciences, Vol. 1, No. 1, pp.23-34.

Zardoya, R. and Doadrio, I., 1999. Molecules evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European. J. Mol-Evol. Vol. 4, pp.227-237.

Zardoya, R. and Meyer, A., 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molec. Biol. Evol. Vol. 13, pp.933-942.