شناسایی مولکولی و ارزیابی ژنتیکی ماهی شیر *Scomberomorus commerson* بر اساس D-Loop ژنوم میتوکندریایی در خلیج‌فارس، دریای عمان و دریای عرب با استفاده از تکنیک High Resolution Melting Real Time PCR

چکیده

ماهی شیر(*Scomberomorus commerson*) از خانواده تون ماهیان (Scomberidae) بوده و ازنظر اقتصادی و اکولوژیکی دارای اهمیت زیادی می‌باشد. در این بررسی شناسایی مولکولی و تمایز ژنتیکی این ماهی بر اساس منطقه D-loop ژنوم میتوکندریایی با استفاده از تکنیک HRM-Real Time PCR صورت پذیرفته است. برای این کار، باله پشتی ۱۰۰ نمونه ماهی شیراز ۴ منطقه بوشهر، دوحه، جاسک و کراچی تهیه و پس از استخراج ژنوم آن‌ها با انجام واکنش HRM-Real Time PCR با استفاده از رنگ SYTO 9، گروه‌بندی صورت پذیرفت. سرگروه‌ها برای آب‌های بوشهر در ۸ گروه، دوحه ۶ گروه، جاسک ۹ گروه و کراچی ۶ گروه دسته‌بندی شدند و درنهایت پس از بررسی نمونه‌ها، در واکنش نهایی HRM-Real Time PCR، ۲۰ گروه حاصل شد. نمونه‌های منتخب با انجام مجدد واکنش زنجیره‌ای پلیمر از برای تعیین توالی ارسال شدند. نتایج به‌دست‌آمده از تعیین توالی با توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه شده و جنس و گونه ماهی شیر *S. commerson* شناسایی شد. سپس با رسم درخت فیلوژنی توسط توالی‌های به‌دست‌آمده و مشاهده تمایز ژنتیکی، مشخص شد که این تکنیک می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک مؤثر در تفکیک و گروه‌بندی نمونه‌ها برای بررسی‌های جمعیتی و سرعت بخشیدن به روند تحقیق مورداستفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ماهی شیر، تون ماهیان، خلیج‌فارس، دریای عمان، دریای عرب، HRMA.

آنا منصورکیائی[۱]

پرگل قوام مصطفوی[۲*]

سید محمدرضا فاطمی[۳]

فرهاد کی مرام[۴]

علی ناظمی[۵]

۱، ۲ و ۳. دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. سازمان تحقیقات شیلات، تهران، ایران

۵. گروه زیست‌شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

***مسئول مکاتبات:**

gh.mostafavi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۰۳

این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

تون ماهیان (Scombridae)، گروهی بسیار باارزش از ماهیان اقتصادی هستند که به‌صورت تازه، یخزده و کنسروی به بازار عرضه می‌شوند. آن‌ها در اقیانوس‌های حاره و نیمه حاره جهان پراکنش دارند (Collette and Nauen, 1983). ماهی شیر (Lac'epe`de, 1800) *Scomberomorus commerson* از خانواده تون ماهیان (Scombridae) و از راسته Perciformes یک ماهی شکارگر منطقه سطح زی می‌باشد که پراکنش وسیعی در آب‌های گرمسیری هند آرام داشته (Mc pherson, 1992) این ماهی که انتشار تقریباً جهانی دارد، در سراسر آب‌های مناطق ساحلی اقیانوس هند، آرام، دریای سرخ، شرق افریقا، دریای عرب، خلیج‌فارس، سواحل هند، آسیای جنوب شرقی، شمال چین، ژاپن، استرالیا و ... مشاهده می‌شود و ازنظر اکولوژی در محدوده فلات قاره آب‌های ساحلی کم‌عمق (معمولاً در عمق‌های ۱۰ تا ۷۰ متری)

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

دیده می‌شود (Claereboudt *et al*., 2005). همچنین در تمامی مناطق جغرافیایی پراکنش خود، از ماهیان مهم در صید تجاری، سنتی و تفریحی محسوب می‌گردد (Collette and Nauen., 1983). طبق آمار به‌دست‌آمده از سازمان تحقیقات شیلات ایران میزان صید سالانه این ماهی *S. commerson* در طی سال‌های ۱۳۸۸ تا سال ۱۳۹۲ از ۷۶۹۱ تن در سال ۱۳۸۸ به ۲۰۱۳۷ تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است (شیلات ایران، ۱۳۹۳).

مطالعات ژنتیک مولکولی جمعیت‌های طبیعی، وابسته به نشانگرهای چندشکلی می‌باشد که امکان بررسی ساختار جمعیتی و ایجاد داده‌های علمی برای تنظیم برداشت به‌منظور حفظ جمعیت‌های ضعیف‌تر و مدیریت منابع شیلاتی را میسر می‌سازد. در بیشتر گونه‌ها ژنوم میتوکندریایی از تغییرپذیرترین نشانگرها و به‌عنوان یک نشانگر خوب برای کشف تمایزهای ژنتیکی می‌باشد (Okumus and Ciftci, 2003). با توجه به وراثت مادری ژنوم میتوکندریایی، برای شناخت بهتر و درک عمیق‌تر ساختار ژنتیک جمعیت، جریان ژنی، هیبریدیزاسیون، جغرافیای زیستی و روابط فیلوژنی موجودات مختلف استفاده می‌شود (Avise *et al*., 1987; Bartlett and Davidson, 1991).

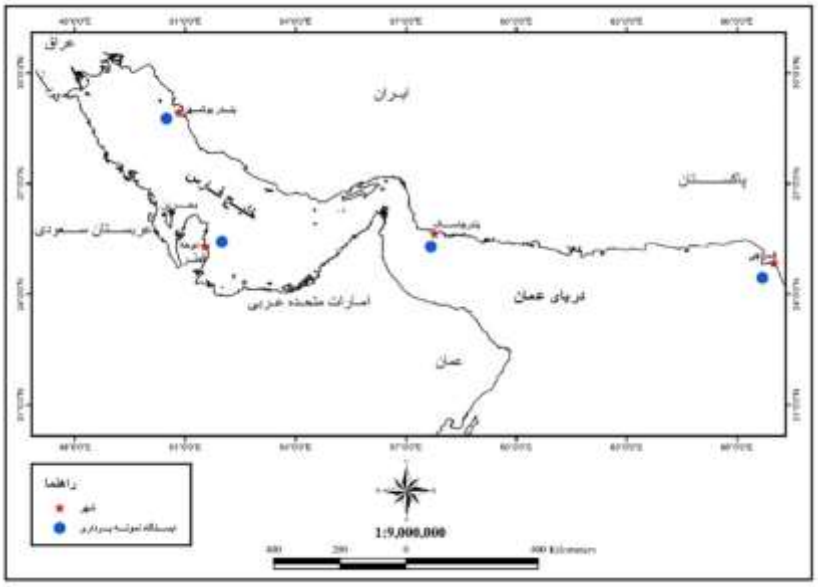
روش‌های ژنتیکی از مهم‌ترین ابزارها برای تعیین ساختار ژنتیکی ذخایر و ارزیابی سطوح و الگوهای تنوع ژنتیکی در ماهی‌ها می‌باشند (Liu, Z.J. and J.F. Cordes, 2004). تکنیک High Resolution Melting(HRM)-Real Time PCR یکی از روش‌های جدید برای آنالیز DNA است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ معرفی شد. ساده‌ترین روش برای تعیین ژنوتیپ، بررسی جهش و تطابق سکانس می‌باشد که کاربرد آن در حال افزایش است و در آن نیازی به جداسازی یا پردازش نمونه‌ها نمی‌باشد. پس از تکثیر توسط واکنش PCR منحنی‌های ذوب، توسط پایش تشعشع رنگ اشباعی که واکنش زنجیره‌ای پلیمر از را مهار نمی‌کند، ایجاد می‌شود (Gudrun H Reed *et al*., 2007).

اگرچه *S. commerson* در خلیج‌فارس و دریای عمان به‌عنوان یک‌گونه در معرض خطر در نظر گرفته نمی‌شود ولی با توجه به خزانه ژنی در این مناطق و کاهش جمعیت هشداری جدی برای در معرض خطر قرار گرفتن این‌گونه می‌باشد و بنابراین استراتژی مدیریت ژنتیکی موردنیاز ضروری است (عابدی و همکاران، ۱۳۸۹ ,Abedi, 2012).

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۰ عدد از ماهی شیر *S. commerson* (۲۵ نمونه از هر منطقه به‌طور جداگانه) از خلیج‌فارس، دریای عمان و دریای عرب از بندرها صیادی بوشهر و دوحه در خلیج‌فارس، جاسک در دریای عمان و کراچی در دریای عرب در طی دوره زمانی ۶ ماهه آبان ۱۳۹۲ الی اردیبهشت ۱۳۹۳ توسط تور گوش‌گیر جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری از باله پشتی ماهی‌ها انجام و به تیوب‌های حاوی اتانول ۹۵ درصد (Kumar *et al*., 2014) منتقل گردید و پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانت‌گراد فریزر، برای انجام آزمایش‌ها و مطالعات ژنتیکی نگهداری شدند. شکل ۱ موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در سواحل خلیج‌فارس، دریای عمان و دریای عرب را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری در خلیج‌فارس (بوشهر و دوحه)، دریای عمان (جاسک) و دریای عرب (کراچی).

کل ژنوم موجود در سلول (DNA هسته‌ای و میتوکندریایی) با استفاده از کیت (High Pure PCR Template preparation Kit Roche Cat.no.11796828001) استخراج و به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت و تعیین غلظت و خلوص DNA استخراجی از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده گردید. الکتروفورز ژنوم‌ها از طریق ژل ۱ درصد انجام پذیرفت.

جهت تکثیر ناحیه D-loop (قطعه حدود ۵۰۰ جفت بازی) ژنوم میتوکندریایی از آغازگرهای رفت‌وبرگشت (5'- Forward: CCGGACGTCGGAGGTTAAAAT-3') ،(5'-AGGAACCAAATGCCAGGAATA) Reverse: استفاده شد (Meneses *et al*,. 2006).

واکنش HRM-Real Time PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتری شامل ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، Tris ۵۰ میلی مولار، KCl ۱۰ میلی مولار، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار، dNTPs ۰/۲ میلی مولار، ۰/۳ پیکومول از هر پرایمر و ۱/۵ واحد از Taq DNA Polymerase و SYTO 9توسط دستگاه Corbett 6000 انجام پذیرفت. شرایط بهینه Real Time PCR اجراشده بر روی DNA ها بدین‌صورت بود: پروفایل واکنش شامل یک واسرشت شدن (denaturing)اولیه دو رشته در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، با تعداد ۳۰ سیکل انجام‌شده که هرکدام شامل ۳۰ ثانیه واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۵۴ ثانیه چسبیدن پرایمرها (annealing) در ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه ساخته‌شدن رشته مکمل (extension) به دنبال پرایمرها در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس در پایان واکنش، ۵ دقیقه ساخته‌شدن رشته مکمل در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. HRM از ۶۵ الی ۸۷ درجه سانتی‌گراد با شیفت حرارتی ۰/۱ درجه سانتی‌گراد در هر ۵ ثانیه انجام گرفت. سپس گروه‌بندی (بر اساس تفکیک نقطه ذوب DNA) توسط آنالیز HRM (HRMA) انجام گردید؛ و میزان ۵ ماکرو لیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد همراه بارنگ Gel red برای مشاهده باندها و اطمینان از کیفیت باندها استفاده شد

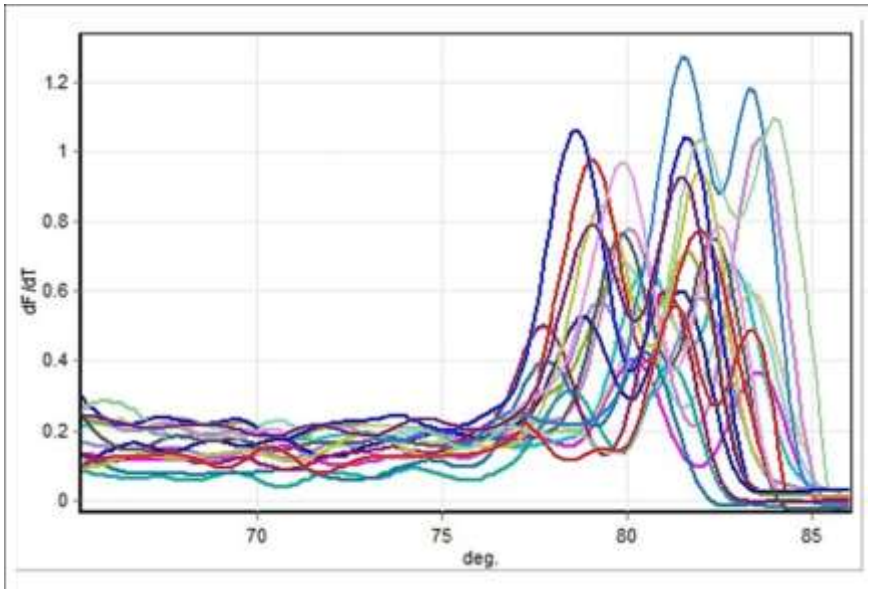
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

جهت تعیین توالی و حصول حجم مناسب از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمر از برای توالی یابی، نمونه‌های منتخب مجدد تحت واکنش فوق‌الذکر قرارگرفته و پس از صحت انجام آن و عدم وجود آلودگی به شرکت Bioneer (Bioneer Sequensing Service) واقع در کره جنوبی ارسال شدند.

در این تحقیق توالی نمونه‌های منتخب پس از انجام توالی یابی با استفاده از نرم‌افزارهای (Hall, 1999) BioEditVer 7.0.1برای بازبینی و اصلاح توالی‌ها و Blast برای شناسایی و تأیید گونه موردنظر در بانک ژنی NCBI و با استفاده از برنامه CLUSTAL W از نرم‌افزار MEGA 6.06 (Tamura *et al*., 2013) یا استفاده از مدل "Kimura 2-parameter model" و Transitions به همراه Transversions به‌منظور پاره‌ای از محاسبات و رسم درخت فیلوژنی neighbor joining tree با bootstrap 1000 استفاده گردید و از نرم‌افزار CLC Viewer 6.5.2 برای هم ترازی توالی‌ها استفاده گردیده است (Knudsen *et al*., 2011).

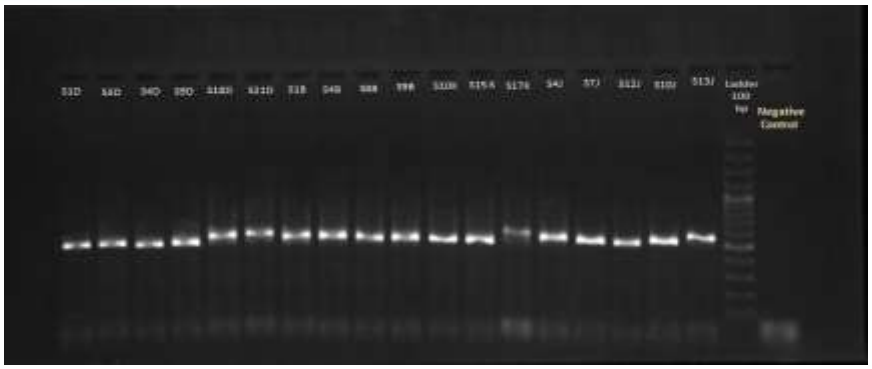
نتایج

نتایج گروه‌بندی توسط آنالیز HRM (HRMA) به ترتیب نشان داد که آب‌های دوحه (قطر) در ۶ گروه، بوشهر در ۸ گروه، جاسک در ۹ گروه و کراچی در ۶ گروه دسته‌بندی شدند. درنهایت، واکنش HRM-Real time PCR نمونه‌های منتخب چهار منطقه برای تعیین نمونه‌های منتخب نهایی انجام گرفت و نمودارهای ذوب (Melting) این واکنش در شکل ۲، آورده شده است. از ۲۹ گروه مرتبط با ۴ منطقه موردبررسی، درنهایت ۲۰ گروه نهایی از آنالیز HRM حاصل شد که در جدول ۱، نتایج گروه‌بندی به‌صورت نمونه‌های منتخب گروه‌ها به همراه نمونه‌های زیرمجموعه آورده شده است. تصویر ژل محصولات PCR نمونه‌های منتخب گروه‌ها در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۲: نمودارهای ذوب (Melting) از واکنش HRM-Real time PCR برای نمونه‌های منتخب گروه‌های چهار منطقه موردبررسی.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]



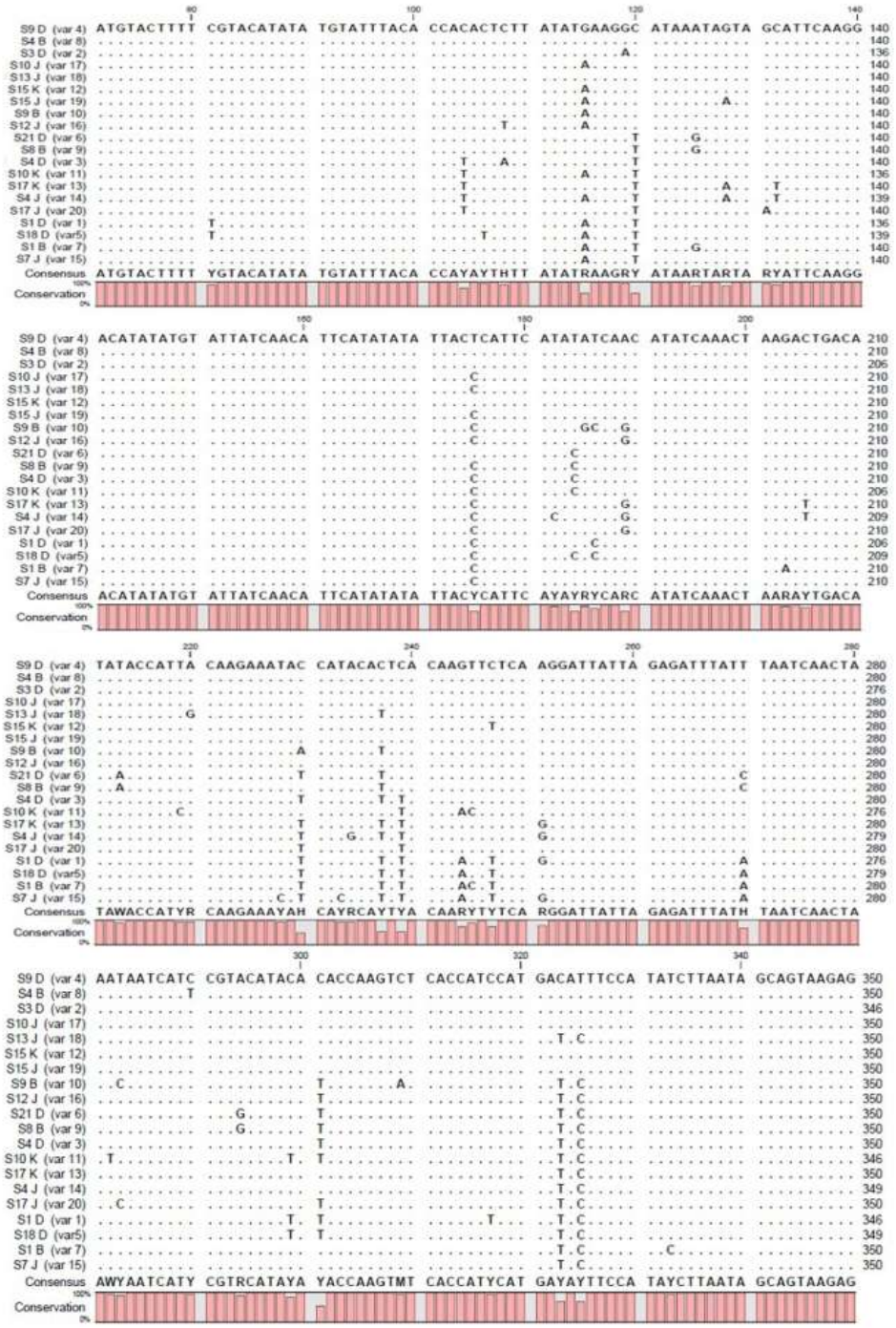
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های منتخب گروه‌ها برای تعیین کیفیت.

جدول ۱: HRM گروه‌ها بر اساس آنالیز (S نمونه، Var گروه و مناطق با حروف B: بوشهر، D: دوحه، J: جاسک، K: کراچی).

HRM گروه‌ها بر اساس آنالیز									
Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5	Var 6	Var 7	Var 8	Var 9	Var 10
S_1 D	S_3 D	S_4 D	S_9 D	S_{18} D	S_{21} D	S_1 B	S_4 B	S_8 B	S_9 B
S_2 D	S_7 D	S_{11} D	S_{15} D	S_1 J	S_2 B	S_3 B	S_6 B		
S_5 D	S_{10} D	S_{12} D	S_{16} D	S_{14} J	S_5 B	S_8 K	S_{11} B		
S_6 D	S_{13} D	S_{14} D	S_{17} D	S_{26} J	S_7 B	S_9 K	S_{19} B		
S_8 D	S_{22} D	S_{24} D	S_{19} D		S_{10} B	S_{16} K			
S_{20} D	S_{21} B	S_{25}D	S_{23} D		S_{12} B	S_{18} K			
	S_3 K		S_{14} B		S_{13} B				
	S_7 K		S_{20} B		S_{15} B				
	S_{14} K		S_{22} B		S_{16} B				
	S_{19} K		S_{25} B		S_{28} B				
	S_{29} K		S_{26} B						
			S_{31} B						
			S_{11} K						
			S_{12} K						
			S_{24} K						
			S_{25} K						
			S_{28} K						
			S_4 K						
HR گروه‌ها بر اساس آنالیز									
Var 11	Var 12	Var 13	Var 14	Var 15	Var 16	Var 17	Var 18	Var 19	Var 20
S_{10} K	S_{15} K	S_{17} K	S_4 J	S_7 J	S_{12} J	S_{10} J	S_{13} J	S_{15} J	S_{17} J
S_{23} K	S_{21} K	S_{22} K	S_6 J	S_{28} J	S_{21} J	S_{16} J			
S_{26} K	S_{27} K	S_{31} K		S_{17} B	S_{23} J	S_{18} J			
	S_{30} K	S_{20} J			S_{24} J	S_{25} J			
		S_{11} J				S_{27} J			
						S_{31} J			
						S_{32} J			
						S_{33} J			

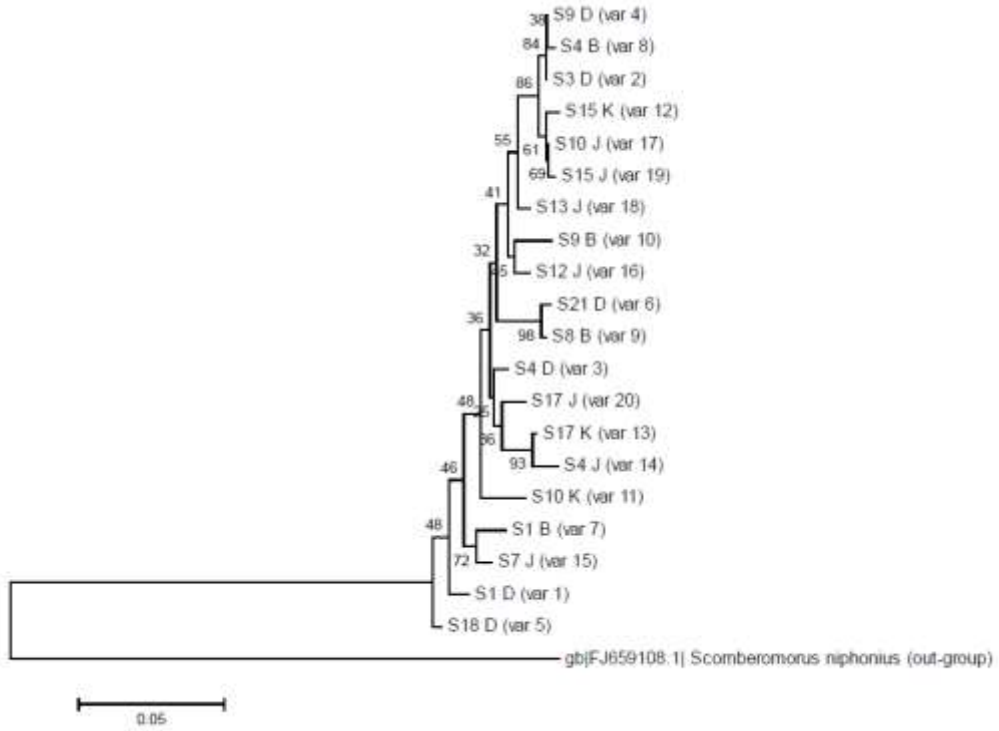
نتایج Blast توالی‌ها همگی جنس و گونه *Scomberomorus commerson* را با همولوژی بالای ۸۰ درصد نشان دادند نتایج هم‌ترازی‌ها تفاوت‌های نوکلئوتیدی منطقه D-loop سرگروه‌ها را مشخص کرد. درخت فیلوژنی ترسیم‌شده در شکل ۵ آورده شده است که شاخه‌های مختلف و تمایزات در درخت فیلوژنی ایجادشده نیز مشاهده شدند.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]



[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

شکل ۴: هم ترازی ۲۰ نمونه منتخب که توسط نرم‌افزار CLC Viewer انجام و محدوده تفاوت‌ها آورده شده است. R: A/G (purine), Y: C/T (Pyrimidine), M: A/C, W: A/T, S: C/G, K: G/T, B: C/G/T, D:) .(A/G/T, H: A/C/T, V: A/C/G, N: A/C/G/T



شکل ۵: درخت فیلوژنی ۲۰ نمونه منتخب، شماره دسترسی به‌توالی های ثبت‌شده در بانک ژنی NCBI برای نمونه‌های S15K، S4J، S1D، S4B به ترتیب (LC101261.1- LC101262.1- LC101263.1- LC101264.1)، S17K (LC101268.1)، S3D (LC101270.1) می‌باشند و باقی در حال ثبت شدن هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

در خصوص شناسایی مولکولی تون ماهیان و روابط فیلوژنتیکی آن‌ها مطالعات زیادی صورت نپذیرفته است. تحقیقاتی بر روی شناسایی گونه‌های مختلف ماهیان با استفاده از تکنیک HRM همانند تحقیق جاری انجام پذیرفته است. بررسی‌های زیادی با استفاده از فن‌های PCR-RFLP، Multiplex PCR و تعیین توالی به‌طور مستقیم از منطقه D-Loop صورت پذیرفته است اما آنالیز High Resolution Melting، تفاوت‌ها را در توالی DNA با نشان دادن کاهش فلورسانس، زمانی که DNA تحت ذوب شدن توسط افزایش دما تک‌رشته‌ای می‌شود، در نمودارهای ذوب مشخص می‌نماید. HRM-Real Time PCR، یک تکنیک تعیین ژنوتیپ سریع، ارزان و بسیار حساس ازنظر دقت بوده که محدودیت‌های دیگر آنالیزهای Post-PCR را کاهش می‌دهد که این تکنیک (HRMA) برای شناسایی ژنتیکی ۶ گونه از تون ماهیان در خلیج مکزیک بکار برده شد و نمودارهای Melting از ژن ND4 برای ۶ گونه از تون ماهیان با استفاده از پرایمرها و هم‌چنین با

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

استفاده از unlabeled probe به دست آمدند و نیز نشان داد که این تکنیک ارزیابی سریع‌تر و کم‌هزینه‌تری را نسبت به سایر روش‌های شناسایی ژنتیکی داشته است (Perales *et al*., 2011). در سال ۲۰۰۹ روی تکنیک‌های مختلف PCR برای شناسایی گونه‌های مختلف ماهیان تحقیقی انجام‌شده است و در میان ده روش اصلی، سه روش PCR-RFLP, PCR-FINSو PCR با پرایمر های تخصصی بیشترین کاربرد را داشته‌اند. Real-time PCR یکی دیگر از روش‌های جدید و کاربردی در شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف ماهیان بوده است (Teletchea, 2009).

در سال ۱۳۸۹ با استفاده از همین تکنیک شناسایی مولکولی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیرهای خام ارتفاعات البرز مرکزی را انجام دادند و اهمیت و دقت این تکنیک در گروه‌بندی نمونه‌ها و نیز امکان کاهش فوق‌العاده زمان و هزینه از نتایج این تحقیق بوده است (فرقانی و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به سریع و اقتصادی بودن و ضریب اطمینان بالای روش HRM از این روش برای مطالعات جمعیتی، شمشیر ماهی (*Xiphias gladius*) از مناطق اطلس شمالی و جنوبی، مدیترانه، هاوایی و شیلی استفاده شد و نشان داده شد که HRMA یک روش تعیین ژنو تیپ قوی برای مطالعه جمعیت‌های وحشی می‌باشد (Smith *et al*., 2009).

همانطورکه در جدول ۱ گروه‌بندی حاصل از آنالیز HRM مشاهده می‌گردد تعداد زیادی از نمونه‌ها با استفاده از تکنیک HRM Real Time PCR در گروه‌های مختلف دسته‌بندی گردیدند که نشان از نقطه ذوب یکسان DNA نمونه‌های هر گروه می‌باشد؛ بنابراین با این تکنیک از انجام توالی یابی برای گونه‌های مشابه صرف‌نظر گردیده است.

نمونه‌های S9D و S4B و S3D که در درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده در یک خوشه قرار گرفتند با مقایسه نتایج هم‌ترازی نمونه‌ها نشان داد که کمترین تفاوت‌های نوکلئوتیدی میان‌شان مشاهده شد.

نتایج به‌دست‌آمده از هم ترازی توالی‌های ۲۰ نمونه منتخب تفاوت‌های نوکلئوتیدی میان نمونه‌های منتخب گروه‌ها را با استفاده از SNPs های حاصل در شکل ۳ به دست داد. توالی‌ها روی درخت فیلوژنی تمایزات قابل‌ملاحظه‌ای را نشان دادند و طبق بررسی‌های انجام‌شده از آنالیزهای نمودارهای ذوب و HRM و همچنین ایجاد درخت فیلوژنتیک توسط توالی‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار MEGA 6.06 و مشاهده تمایز مشخص شد که این تکنیک می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک مؤثر در تفکیک و گروه‌بندی نمونه‌ها برای بررسی‌های ژنتیکی و سرعت بخشیدن به روند تحقیق عمل کند و همچنین می‌توان در زمان محدود دامنه وسیعی از جمعیت را موردبررسی قرارداد.

از آنجائی که این تکنیک یک تکنیک امن و بسته‌ای ازلحاظ آلودگی و خطای آزمایش می‌باشد تا حد زیادی به‌دقت بررسی‌ها کمک کرده و سطح دقت را تا حد زیادی بالا می‌برد.

سپاسگزاری

از زحمات محمد اسکندری و محمدتقی آژیر که در انجام امور آزمایشگاهی ما را یاری رساندند و از مسئولان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران و دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

عابدی، ا.، محمدی، م. و قاسمی، ا.، ۱۳۹۰. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ماهی قباد(*Scomberomorusguttatus*) خلیج‌فارس با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. اقیانوس‌شناسی. سال دوم، شماره ۶ صفحات ۲۱-۱۵.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

فرقانی، ف.، ناظمی، ع.، شریفی، ش. و اسکندری، م.، ۱۳۸۹. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیرهای خام ارتفاعات البرز مرکزی با استفاده از High Resolution Melting Real Time PCR و 16S rDNA PCR Sequencing. زیست‌فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی. سال دوم، شماره ۵. صفحات ۲۸-۲۱.

معاونت برنامه‌ریزی و توسعه مدیریت شیلات.، ۱۳۹۳. سالنامه آماری شیلات ایران.

Abedi, E., Zolgharnein, H., Salari, M. A. and Qasemi, A., 2012. Genetic Differentiation of Narrow-Barred Spanish Mackerel (*Scomberomoruscommerson*) Stocks Using Microsatellite Markers in Persian Gulf. American-Eurasian. Journal Agriculture and Environmental Sciences, 10: 1305-1310.

Avise, J. C. Arnold, J. and Ball, R. M., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and Systematics. Ann Rev Ecol Systematic. 18:489-522

Bartlett, S. E., and Davidson, W. S., 1991. Identification of *Thunnus*tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome
b genes. Canadian Journal of Fish and Aquatic Science 48: 309-317.

Claereboudt, M. R., McIlwain, J. L., Al-Oufi, H. S., and Ambu- Ali, A. A., 2005. Patterns of reproduction and spawning of the kingfish (*Scomberomoruscommerson*) in the coastal waters of the Sultanate of Oman. Fish Research, 73:273- 282.

Collette, B. B. and Nauen, C. E., 1983. FAO species catalogue Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO Fish. Synop. 125(2). 137 pp.

Gudrun, H. R., Kent, J. O. and Wittwer, C. T., 2007. High- resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics, 8(6): 597-608.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.**Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30: 2725-2729.

Kumar, S., Dudley, J., Nei, M. and Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.

Kumar, G., Kunal, S. P., Menezes, M. R. and Kocour, M., 2014. Genetic divergence between *Auxis thazard* and *A.rochei* based on PCR- RFLP analysis of mtDNA D-loop region. Turkish journal of fisheries and aquatic sciences. 14:539-546.

Liu, Z. J. and Cordes, J. F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture, genetics. Aquaculture, 238: 1-37

McPherson, G. R., 1992. Age and Growth of the Narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson* LacCp and de, 1800) in North-eastern Queensland Waters. Australia Journal Marine Freshwater Research. 43: 1269-82.

Menezes, M. R., Ikeda, M. and Taniguchi, N., 2006. Genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (L.) using PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA D-loop region. Journal of Fish Biololy. 68:156-161.

Okumus, I. and Ciftci, Y., 2003. Fish population genetics and molecular markers: II- molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. Turkish Journal of fisheries and Aquatic Sciences. 3:51-79.

Perales, B., Smith, B. L. and Alvarador Bremer, J. R., 2011. Genetic Identification of Tuna Species via High-Resolution Melting Analysis, California State University Monterey Bay

Smith, B. L. Lu, C. P. and Alvarado Bremer, J. R., 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for. Molecular Ecology Resources.

Teletchea, F., 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Rev fish Biology Fisheries. 19:265-293.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]