

مطالعه جایگاه رده بندی ماهی کور غار ایران، *Iranocypris typhlops* نسبت به جنس‌های *Barbus* و *Garra* با استفاده از ژن *COI*

Analysis of the systematic status of the blind Iran cave barb, *Iranocypris typhlops*, using *COI* gene

ایرج هاشم زاده سقرلو^{۱*}، شیرین رحمتی^۲، راضیه پوراحمد^۳، کباوش گلزاریان پور^۴ و اصغر عبدلی^۵

۱ و ۲-۳- استادیار، دانشجوی کارشناسی و استادیار دانشگاه شهرکرد

۴- مربی، دانشگاه گنبد کارس

۵- دانشیار، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی

Hashemzadeh Segherloo I^{*1}, Rahmati S², Purahmad R³, Golzarianpour K⁴, Abdoli A⁵

1,2,3. Assistant Professor, BSc Student and Assistant Professor, University of Shahre Kord, Shahre Kord, Iran

4. Instructor, University of Gonbad-e-Kavoos, Gonbad, Iran

5. Associate Professor, Environmental Sciences Research Center, Shahid Beheshty University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: irhashem@nres.sku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۵- تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

وضعیت رده بندی ماهی کور غار ایران، *Iranocypris typhlops* و اشکال دیسک دار و بدون دیسک آن تا حدی مبهم است و بررسی آن با روش های مولکولی می تواند در این رابطه مفید باشد. در این مطالعه با توجه به فرضیات موجود با استفاده از توالی ۵' ژن *COI* جایگاه رده بندی ماهی کور غار ایران در مقایسه با گونه های جنس *Barbus* و *Garra* و سایر کپورماهیان بویژه گونه های کپورماهیان ایران در منطقه زاگرس بررسی شد. برای اولین بار توالی یک ژن برای ماهی کور غار ایران و توالی ژن *COI* برای گونه *Garra rufa* (در ایران) و برای اولین بار برای گونه های *Capoeta trutta*، *Capoeta aculeatae*، *Barbus lacerta*، *Luciobarbus*، *Luciobarbus barbulus*، *Kosswigobarbus sublimus*، *Kosswigobarbus kosswigi* و *esocinus* گزارش شد. با توجه به نتایج بدست آمده در بررسی های شجره شناسی رابطه نزدیکی در بین این گونه و گونه های جنس *Barbus*، *Capoeta*، *Barbus*، *Kosswigobarbus* و *Lusiobarbus* مشاهده نشد. اما رابطه گونه ماهی کور غار ایران با گونه های جنس *Garra* و بویژه گونه *G. rufa* نزدیک و جالب توجه بود. در کل شاید بتوان ماهی کور غار ایران را از گونه های خوبشاوند ماهی *G. rufa* دانست، که در طی تکامل خود فرایند مینیاتوری شدن را تجربه کرده است. در بین نمونه های ماهی کور بررسی شده یکی از نمونه های بدون دیسک دارای هاپلوتایپ گزارش شده برای ماهی کور دیسک دار بود، که با این مشاهده می توان احتمال دورگ گیری در بین اشکال دیسک دار و بدون دیسک ماهی کور و یا عدم ثبات صفت دیسک را در این ماهیان مطرح کرد، که قضاوت در این مورد نیازمند بررسی های بیشتر است.

واژه‌های کلیدی

رده بندی،
ژن *COI*،
ماهی کور غار ایران،
Barbus
Garra

مقدمه

ماهی کور غار ایران (*Iranocypris thphlops* Brun and Kaiser) از گونه های خانواده کپورماهیان بوده و در خروجی طبیعی یک سیستم غارسنگی آهکی در رشته کوه زاگرس (۳۳ درجه و ۴ دقیقه شمالی و ۴۸ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی در ارتفاع ۷۴۰ متر) در دره آب سیرم (حوضه رودخانه دز) در استان لرستان زیست می کند (Sargeran et al. 2008) (شکل ۱). بعلاوه اخیرا این گونه از نقطه دیگری در رشته کوه زاگرس در حوضه رودخانه سیمره در فاصله ۱۳۱ کیلومتری زیستگاه یادشده نیز گزارش شده است (Mahjoorazad and Coad 2009). این ماهی دارای رنگ صورتی، فاقد چشم، دارای مقطع عرضی گرد و ناحیه رأسی تا حدی تخت، دوجفت سبیلک، دهان نیمه انتهایی، فلس های دایره ای، خط جانبی نه چندان مشخص و دارای دیسک دهانی (در بعضی از افراد) است (Sargeran et al. 2008). که در بین اشکال دیسک دار و بدون دیسک این گونه تمایز ژنتیکی قابل توجهی (۳-۴ درصد) در توالی بارکد (*COI*) گزارش شده است (Hashemzadeh et al. 2012). این گونه در لیست سرخ اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت^۱ در ردیف گونه های آسیب پذیر طبقه بندی شده است (IUCN 2010). گزارش زیستگاه جدید این ماهی، می تواند وضعیت حفاظتی آن را تحت تاثیر قرار دهد (Mahjoorazad and Coad 2009).

اظهارات متعددی در رابطه با جایگاه رده بندی واقعی این گونه ارائه شده است. برای مثال Brown and Kaiser (1948) این ماهی را به جنس *Barbus* نسبت می دهند (Coad 2008). Saadati (1977) با توجه به جثه کوچک این ماهی در مقایسه با گونه های جنس *Barbus* در حوضه دجله، که ماهیان بسیار بزرگتری هستند، این ادعا را رد می کند (Coad 2008). ممکن است این گونه با جنس *Garra* که در زاگرس نیز پراکنش وسیعی دارد (Abdoli 2000) مرتبط باشد. این گونه از لحاظ تعداد سبیلک و شکل دهان به گونه های هر دو جنس یادشده شباهت دارد، اما با توجه به جثه کوچک و وجود دیسک در قسمت دهانی (Sargeran et al. 2008; Hashemzadeh et al. 2012) ممکن

است، رابطه نزدیک تری با جنس *Garra* داشته باشد. رابطه نزدیک یادشده در بین اشکال ماهی کور و جنس *Garra* از نظر ژنتیکی گزارش شده است (Hashemzadeh et al. 2012) در یک مطالعه دیگر هم با استفاده از ژن *Cyt b* رابطه نزدیکی در بین ماهی کور (*Phreatichthys andruzzii*) و یکی از گونه های ماهی گارا (*Garra barreimiae*) مشاهده شده است (Colli et al. 2009). علی رغم موارد یادشده، تاکنون رابطه ماهی کور با سایر جنس های ماهیان موجود در منطقه زاگرس مثل *Barbus*، *Cyprinion*، *Capoeta*، *Kosswigobarbus* و *Luciobarbus* و سایر کپورماهیان ایران مشخص نشده است. هدف از تهیه توالی های بارکد DNA، بهبود شناسایی گونه ها و کشف گونه های جدید از طریق مطالعه الگوهای تمایز توالی در یک منطقه استاندارد در ژنوم است. در مورد جانوران، تحقیقات به یک قطعه ۶۴۸ جفت بازی از ژن میتوکندریایی *COI* معطوف شده است، که می توان آن را به راحتی با استفاده از تعداد محدودی آغازگر در گونه های مختلف تکثیر کرد (Kerr et al. 2007). کارایی این ژن در گروه های جانوری مختلف ارزیابی شده است و بیش از ۹۴ درصد گونه های مورد مطالعه دارای آرایه های بارکد مشخص و متمایز، با تغییرات درون گونه ای کم و تمایز بین گونه ای بالا نسبت به گونه های نزدیک، بوده اند و گونه های ماهیان هم در این گروه قرار می گیرند (Ward et al. 2005; Hajibabaei et al. 2008 Hubert et al. 2006). با توجه به نامشخص بودن وضعیت آرایه شناختی ماهی کور غار ایران نسبت به سایر گونه های کپورماهیان زاگرس، این مطالعه با هدف بررسی جایگاه رده بندی ماهی کور غار ایران با استفاده از توالی انتهای ۵ ژن *COI* در مقایسه با جنس های *Garra* و *Barbus*، *Capoeta*، *Cyprinion*، *Kosswigobarbus* و *Luciobarbus* انجام شد. جنس های یادشده از نظر ویژگی هایی مثل تعداد ردیف های دندان حلقی و همچنین از نظر وجود سبیلک با ماهی کور شباهت دارند.

مواد و روش ها

برای این مطالعه از باله پنج قطعه ماهی کور غار دیسک دار و هشت قطعه باله ماهی کور بدون دیسک، پنج قطعه ماهی *G. rufa* و یک نمونه از هر کدام از گونه های *Barbus lacerta*، *Capoeta*

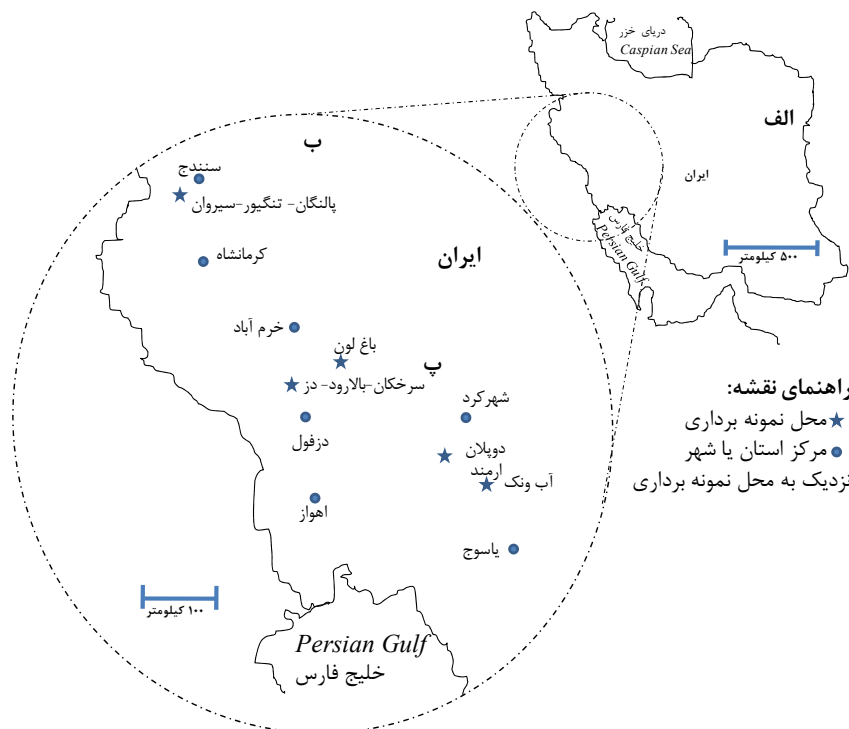
¹ International Union for Conservation of Nature

ویرایش شدند. عملیات انطباق^۱ توالی های COI و ایجاد فایل های Nexus و FASTA برای نرم افزارهای MrBayes و MEGA4، با استفاده از نرم افزار ClustalX (1.83) (Thompson et al. 1997) انجام شد. به منظور یافتن توالی های مشابه برای استفاده در بررسی شجره شناسی، هاپلوتایپ های به دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن (NCBI) با سایر توالی های موجود برای گونه های کپورماهیان (Cyprinidae) مقایسه شدند (Altschul et al. 1997). پس از انطباق و یکپارچه کردن توالی ها، یک قطعه به طول ۵۵۱ جفت باز انتخاب شد، که در بین ماهیان مورد مطالعه و توالی های موجود در بانک ژن مشترک بود. برای این که شاخصی کمی برای مقایسه مقدار تمایز در بین گونه ها در دست باشد، از فاصله ژنتیکی K2P (Kimura 1980) محاسبه شده با استفاده از نرم افزار MEGA5 استفاده شد (Tamura et al. 2007). برای ترسیم درخت شجره شناسی از روش های Maximum Parsimony موجود در نرم افزار MrBayes3.1 و روش Bayesian موجود در نرم افزار MEGA5 استفاده شد. پارامترهای مورد استفاده برای ترسیم دارنگاره (درخت شجره شناسی) Maximum Parsimony شامل روش SPR برای جست‌وجوی درخت MP، تعداد ۱۰ دارنگاره اولیه و نگهداری حداکثر ۱۰۰ دارنگاره بود. برای آزمون شجره شناسی از روش آماری بوسترپینگ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. در دارنگاره ترسیم شده شاخه های دارای مقدار بوسترپ کوچکتر از ۵۰ حذف شدند و شاخه های دارای مقدار بوسترپ بزرگتر از ۵۰ حفظ شدند. برای بررسی شجره شناسی به روش بایسی که مبتنی بر مدل است بهترین مدل تکاملی براساس معیار اطلاعاتی آکایکه (AIC)^۲ با استفاده از برنامه Modeltest 3.8 (Posada and Crandall 1998) انتخاب شد. معیار اطلاعاتی آکایکه (AIC)، معیاری است که توسط نرم افزار Modeltest به منظور تعیین برآزش مدل های تکاملی محاسبه شده و مدلی به عنوان مناسب ترین مدل انتخاب می شود که مقدار عددی معیار AIC مربوط به آن کمتر از سایر مدل ها باشد (Posada and Crandall 1998). بهترین مدل برای این داده ها، مدل $TVM + G$ بود اما نرم افزار

•*Kosswigobarbus sublimus*، •*Capoeta aculeatae trutta*، •*Luciobarbus barbustus*، •*Kosswigobarbus kosswigi*، •*Luciobarbus esocinus* و •*Cyprinion macrostomum* استفاده شد. نمونه ها در سال های ۱۳۸۶، ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از منابع آبی مثل بالارود (دز-کارون)، سیروان (دجله)، ارمند (کارون)، گاماسیاب (کرخه)، بشار (کارون)، آب ونک (کارون) و دوپلان (کارون) با استفاده از الکتروشوکر و تور ساچوک نمونه برداری شده و در الکل اتانل ۹۶ درصد تثبیت شده بودند (شکل ۱). علاوه بر این در مورد ماهی کور از نمونه های ماهی کور مجموعه های موجود در دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه شهرکرد که از زیستگاه ماهی کور برداشت شده اند، استفاده شد. نمونه های DNA با استفاده از روش Chelex100 استخراج شدند (Estoup et al. 1996). برای تکثیر ژن COI، آغازگرهای 5'- (5'-*AGTGGTTATGYGGCTGGCTT-3'*) و 3'- (*AACCTCTGTCTTCGGGGCTA-3'*) موجود در بانک ژن (NCBI)، طراحی شدند. برای انجام عملیات تعیین توالی ژن COI، ابتدا این ژن با استفاده از روش PCR تکثیر شد. هر واکنش PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر، شامل ۳۵/۶ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰ ایکس، یک میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی مولار، یک میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار هر آغازگر، یک میکرولیتر dNTP ۲۵ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم بیوتگ و ۵ میکرولیتر DNA بود (Estoup et al. 1996). شرایط دمایی واکنش زنجیره پلیمرز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۴ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد (یک دقیقه)، ۶۱ درجه سانتی گراد (یک دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۱/۵ دقیقه) و در نهایت یک چرخه ۱۵ دقیقه ای در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. در نتیجه واکنش PCR، یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۶۶۰ جفت باز تکثیر شد که توالی کامل ژن COI را در بر داشت. برای انجام بررسی های شجره شناسی، توالی انتهای 5' ژن COI با استفاده از دستگاه ABI 3100 تعیین شد. برای انجام عملیات تعیین توالی از آغازگر پیشرو (*FCOI20*) استفاده شد. توالی های خام به صورت چشمی با استفاده از نرم افزار Bioedit V 7.1.3

¹ Alignment

² Akaike Information Criterion



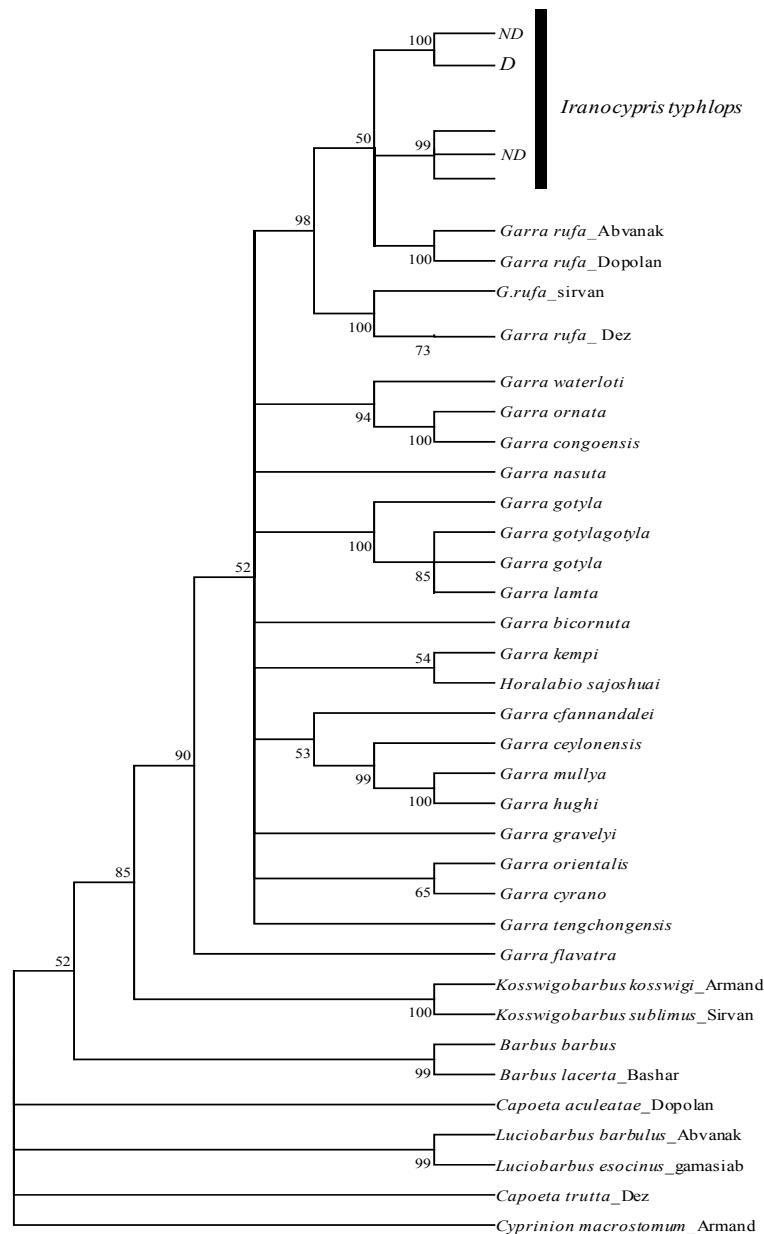
شکل ۱- نقشه محل‌های نمونه برداری ماهی کور غار، *Garra* و سایر گونه‌های مورد استفاده در این مطالعه

توالی‌های بدست آمده در این مطالعه و توالی‌های سایر گونه‌های کپورماهیان، مشاهده شد که گونه ماهی کور غار ایران (*I. typhlops*) با گونه ماهی *G. rufa* یک گروه هم‌تبار (مونوفایلیتیک) را تشکیل دادند (شکل ۲). علاوه بر این فاصله ژنتیکی *K2P* محاسبه شده در بین توالی‌های ماهی کور دیسک دار و بدون دیسک نسبت به ماهی *G. rufa* به ترتیب ۴/۳ درصد و ۵ درصد و فاصله ژنتیکی ماهی کور نسبت به گونه‌های جنس *Barbus* ۱۸/۱ تا ۱۹/۱ درصد بود (جدول ۱). این مشاهدات نشان می‌دهد ماهی کور غار ایران از نظر رده بندی به گونه‌های جنس *Garra* نزدیک است و نسبت نزدیکی با جنس *Barbus* و سایر جنس‌های مورد استفاده در این مطالعه ندارد. این نتایج (Coad (2008) و همچنین با مطالعات شجره‌شناسی ماهی کور غار (*P. andruzzii*) و گونه *G. barreimiae* مطابقت دارد (Colli et al. 2009). آنها نیز رابطه شجره‌شناسی نزدیکی در بین دو گونه یاد شده گزارش کردند (Colli et al. 2009). ممکن است این مشاهدات نشان دهنده رابطه خویشاوندی گونه‌های جنس *Garra* و ماهی کور غار

Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist) MrBayes 3.1 (and Huelsenbeck 2003) مورد استفاده برای قضاوت در مورد روابط شجره‌شناسی قادر به اجرای مدل یاد شده نیست، در نتیجه بهترین مدل بعدی براساس معیار AIC یعنی مدل $GTR + I$ با مقدار آلفای ۰/۱۴ برای بررسی انتخاب شد. جستجوی MCMC برای ۲۱۰۰۰۰۰ نسل با نمونه برداری زنجیره مارکوف در هر ۱۰۰ نسل اجرا شد. در نهایت ۲۱۰۰۰ درخت شجره‌شناسی ایجاد شد که ۵۲۵۰ درخت اولیه حذف شد.

نتایج و بحث

مجموعاً ۱۷ هاپلوتایپ (چهار هاپلوتایپ برای ماهی *G. rufa*، چهار هاپلوتایپ برای ماهی کور غار، یک هاپلوتایپ برای هر کدام از سایر گونه‌های مورد استفاده) مشاهده شد. هر دو دارنگاره ترسیم شده به روش‌های پارسیمونی و بایسی در مورد ماهی کور و جنس *Garra* دارای شکل یا توپولوژی مشابه بودند، لذا تنها دارنگاره ترسیم شده به روش Maximum Parsimony ارائه شده است. بر پایه درخت شجره‌شناسی ترسیم شده برای



شکل ۲- درخت شجره شناسی ترسیم شده با روش Maximum Parsimony موجود در نرم افزار MEGA5 برای توالی های بدست آمده در این مطالعه و توالی های موجود در بانک ژن. اعداد درج شده در محل گره های درخت شجره شناسی مقادیر Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار است که برای تأیید صحت شاخه ها یا انشعابات مرتبط با آنها محاسبه شده است. هاپلوتایپ های ماهی کور غار ایران در شکل با خط تیره عمودی در جلوی خوشه مربوط به آنها مشخص شده اند. (ND) ماهی کور بدون دیسک و (D) ماهی کور دارای دیسک.

علاوه وجود دیسک دهانی در ماهی کور غار (Sargeran et al. 2008)، به عنوان یکی از مشخصات ماهیان جنس گارا، می تواند تأیید کننده رابطه تکاملی ماهی کور غار با ماهیان جنس گارا باشد. در مقایسه با سایر گونه های جنس *Garra* که در این

مورد مطالعه باشند، به این مفهوم که احتمالاً ماهیان کور در گذشته بواسطه ورود ماهیان جنس *Garra* به محیط های کارستی و تاریک، نوعی فرایند مینیاتوری شدن (Rüber et al. 2007) را در طول تکامل تجربه کرده و به شکل کنونی خود در آمده اند. به

جدول ۱- ماتریس فواصل ژنتیکی K2P محاسبه شده با نرم افزار MEGA5 در بین هاپلوتایپ های ماهی کور غار، *I. typhlops* و سایر ماهیان مورد بررسی در این مطالعه. فواصل ژنتیکی براساس درصد عنوان شده اند. اسامی عنوان شده در مقابل اسامی علمی بعضی از گونه ها، نشاندهنده محل نمونه برداری آنها است.

گونه	<i>I. typhlops</i> D	<i>I. typhlops</i> ND	<i>Garra rufa</i> _Abvanak	<i>G. rufa</i> _Dopolan	<i>G. rufa</i> _Sirvan	<i>G. rufa</i> _Balarood	<i>Capoeta aculeatae</i>	<i>C. trutta</i>	<i>Kosswigobarbus kosswigi</i>	<i>Kosswigobarbus sublimus</i>	<i>Luciobarbus barbulus</i>	<i>Luciobarbus esocinus</i>	<i>Barbus lacerta</i>	<i>B. barbuis</i>
<i>Iranocypris typhlops</i> D*														
<i>Iranocypris typhlops</i> ND**	۳/۶													
<i>Garra rufa</i> _Abvanak	۴/۲	۴/۷												
<i>G. rufa</i> _Dopolan	۴/۲	۴/۷	۰											
<i>G. rufa</i> _Sirvan	۴/۴	۵/۳	۵/۶	۵/۶										
<i>G. rufa</i> _Balarood	۴/۴	۴/۹	۵/۶	۵/۶	۰/۴									
<i>Capoeta aculeatae</i>	۱۵/۶	۱۵/۴	۱۵/۷	۱۵/۷	۱۵/۴	۱۵/۶								
<i>C. trutta</i>	۱۶/۸	۱۷/۶	۱۶/۹	۱۶/۹	۱۷/۸	۱۸/۱	۶/۸							
<i>Kosswigobarbus kosswigi</i>	۱۷/۷	۱۶/۲	۱۷/۲	۱۷/۲	۱۸/۰	۱۸/۲	۱۲/۷	۱۴/۳						
<i>Kosswigobarbus sublimus</i>	۱۷/۷	۱۶/۷	۱۷/۲	۱۷/۲	۱۷/۹	۱۸/۲	۱۳/۴	۱۴/۳	۱/۸					
<i>Luciobarbus barbulus</i>	۱۶/۲	۱۵/۹	۱۵/۷	۱۵/۷	۱۶/۴	۱۶/۶	۵/۶	۷/۲	۱۴/۳	۱۴/۰				
<i>Luciobarbus esocinus</i>	۱۵/۹	۱۵/۷	۱۵/۵	۱۵/۵	۱۶/۲	۱۶/۴	۵/۸	۷/۰	۱۴/۵	۱۴/۳	۰/۹			
<i>Barbus lacerta</i>	۱۹/۱	۱۸/۸	۱۷/۴	۱۷/۴	۱۷/۱	۱۷/۳	۹/۷	۱۰/۱	۱۴/۸	۱۴/۷	۱۰/۱	۹/۹		
<i>B. barbuis</i>	۱۸/۱	۱۷/۶	۱۶/۹	۱۶/۹	۱۷/۱	۱۷/۳	۸/۲	۹/۳	۱۳/۴	۱۳/۱	۹/۵	۹/۳	۱/۸	
<i>Cyprinion macrostomum</i>	۱۹/۲	۱۸/۸	۱۹/۲	۱۹/۲	۲۰/۰	۲۰/۳	۱۱/۹	۱۱/۶	۱۸/۶	۱۷/۶	۱۱/۶	۱۲/۸	۱۴/۶	۱۴/۹

* ماهی کور دیسک دار و ** ماهی کور بدون دیسک

دیسک دهانی (Sargeran et al. 2008) در شکل دیسک دار ماهی کور در کنار فاصله ژنتیکی کمتر آنها نسبت به هم و همچنین عدم وجود دیسک و فاصله ژنتیکی بیشتر در شکل دیگر ماهی کور را ممکن است بتوان به عنوان شاهدی مبنی بر ورود اجداد ماهیان کور به محیط زیرزمینی در دو مرحله زمانی یا در طی دو حادثه متفاوت پذیرفت. به این مفهوم که احتمالاً شکل بدون دیسک که تمایز بالاتری را در مقایسه با شکل دیسک دار نسبت به جنس *Garra* دارد، مدت زمان بیشتری در مقایسه با شکل دیسک دار از جنس یادشده جدا بوده و لذا تمایز بیشتری حاصل کرده است. در میان نمونه های ماهیان کور بدون دیسک یکی از هاپلوتایپ های شکل دیسک دار ماهی کور که پیش تر نیز توسط Hashemzadeh

مطالعه مورد توجه قرار گرفته اند، گونه *G. rufa* فاصله نزدیک تری نسبت به ماهی کور غار دارد، که این امر در کنار نزدیکی جغرافیای زیستگاه ماهی کور و محدوده پراکنش گونه *G. rufa* نشاندهنده روابط تکاملی نزدیک آنها است، این رابطه نشان می دهد که رده بندی ماهی کور در سطح جنس می تواند به جنس *Garra* تغییر کند و احتمالاً ماهی کور نیز به جنس یادشده تعلق دارد. در صورتی که ضریب ساعت مولکولی ۰/۵۲ یا ۰/۷۶ درصد در میلیون سال (Levin et al. 2012) را برای ژن *COI* در نظر بگیریم، مدت زمان جدایی ماهیان کور دیسک دار از گونه *G. rufa* ۸/۲۶ تا ۵/۶ میلیون سال و زمان جدایی ماهیان کور بدون دیسک از *G. rufa* ۹/۶ تا ۶/۵ میلیون سال خواهد بود. وجود

منابع

- Abdoli A (2000) The inland water fishes of Iran. Tehran: Nature and Wildlife Meusume of Iran. (In Farsi)
- Aboimi MA, Mavarez J, Bernatchez L, Coelho MM (2010) Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 817-828.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389- 3402.
- Coad B (2008) Fresh water fishes of Iran. Available at <http://www.briancoad.com/contents.htm>
- Colli L, Paglianti A, Berti R, Gandolfi G, Tagliavini J (2009) Molecular phylogeny of the blind cavefish *Phreatichthys andruzzii* and *Garra barreimiae* within the family Cyprinidae. *Environmental Biology of Fishes* 84:95-107.
- Estoup A, Largiader CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5:295-298.
- Gante HF, Collares-Pereira MJ, Coelho MM (2004) Introgressive hybridisation between two Iberian *Chondrostoma* species (Teleostei, Cyprinidae) revisited: new evidence from morphology, mitochondrial DNA allozymes and NOR-phenotypes *Folia Zool* 53: 423-432.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103:968-971.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Laviolette N, Taylor E, Burrige M, Watkinson D, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3:E2490.
- Gante HF, Collares-Pereira MJ, Coelho MM (2004) Introgressive hybridisation between two Iberian *Chondrostoma* species (Teleostei Cyprinidae) revisited: new evidence from morphology, mitochondrial DNA allozymes and NOR-phenotypes. *Folia Zool* 53: 423-432.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. Available at www.iucnredlist.org
- Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7:535-716.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Mahjoorazad A, Coad BW (2009) A new cave fish locality for Iran. *Electronic Journal of Ichthyology* 2:30-33.

et al. (2012) برای شکل دیسک دار گزارش شده است، مشاهده شد. این مشاهده را می توان با دو احتمال توجیه نمود. اولین احتمال، وجود پدیده دورگ گیری در بین اشکال دیسک دار و بدون دیسک و در نتیجه تغییر در صفت دیسک و عدم مشاهده آن در افراد دورگ است. دورگ گیری طبیعی در بین کپورماهیان گزارش شده است (Aboim et al. 2010). با توجه به این که در یک نمونه از ماهیان کور بدون دیسک هاپلوتایپ شکل دیسک دار مشاهده شده است و با فرض این که نمونه یادشده دورگ باشد، می توان والد ماده نمونه یادشده و در نتیجه جهت دورگ گیری را مشخص نمود که در مورد یادشده والد ماده از ماهیان دیسک دار است. برای تایید این فرضیات باید از نشانگرهای هسته ای مثل ریزماهورک ها هم استفاده شود، زیرا نمی توان تنها با نشانگرهای ریختی و یا میتوکندریایی اظهار نظر قطعی کرد (Aboim et al. 2010) و این برداشت ها می تواند غیرصحیح باشد (Gante et al. 2004). اما احتمال دوم، عدم ثبات صفت دیسک‌دار بودن در اثر زیستن در محیط‌های کم جریانی مثل محیط های زیر زمینی و حذف تدریجی این ویژگی در افراد است. ماهیان دیسک دار که از زیرخانواده Labeoninae هستند معمولا در محیط‌های دارای جریان سریع آب زندگی می‌کنند (Zhang 2005) و از دیسک برای چسبیدن به بسترهایی مثل سنگ استفاده می‌کنند، اما ممکن است در محیط‌های کم جریان به تدریج دیسک نقش خود را از دست داده و تحلیل رود، مثل چشم ها که در ماهیان کور به علت شرایط زیستگاهی تحلیل رفته اند. علاوه بر صفت وجود یا عدم وجود دیسک در رابطه با ویژگی های کالبدی مثل شکل کیسه شنا و طول روده نیز در بین ماهیان کور هم‌شکل تنوع وجود داشته است (Sargeran et al. 2008). برای تایید این احتمالات، باید مطالعاتی با سایر روش‌های ژنتیکی انجام شود.

تقدیر و تشکر

در این بخش نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات جناب آقای مهندس بنی مهدی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک گروه ژنتیک دانشگاه شهرکرد به جهت کمک های ارزشمند ایشان تقدیر و تشکر شود. این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است.

- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rüber L, Kottelat M, Tan HH, Ng PK, Britz R (2007) Evolution of miniaturization and the phylogenetic position of *Paedocypris*, comprising the World's smallest vertebrate. *BMC Evolutionary Biology* 7, 38.
- Sargeran P, Bakhtiyari M, Abdoli A, Coad BW, Sarvi K, Rahmati Lishi M, Hajimoradloo A (2008) The endemic Iranian Cave-fish, *Iranocypris typhlops*: two taxa or two forms based on the mental disc? *Journal of Zoology in the Middle East* 44:67-74
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360:1847-185.