

تهیه بارکد ژنتیکی ماهیان جنس *Capoeta* در سرشاخه‌های کارون و دجله

Genetic barcoding of *Capoeta* species in Karoon and Tigris tributaries

ایرج هاشم زاده سقرلو^۱، اصغر عبدالی^۲، راضیه پوراحمد^۳، مجتبی پوریا^۴، کیاوش گلزاریان پور^۱

- ۱- استادیاران، دانشگاه شهرکرد
- ۲- دانشیار، دانشگاه شهید بهشتی
- ۳- کارشناس ارشد، شیلات استان کرمانشاه
- ۴- مریب، دانشگاه گنبد کاووس

Hashemzadeh Segherloo I^۱, Abdoli A^۲, Purahmad R^۱, Puria M^۳, Golzarianpour K^۴

1. Assistant Professors, University of Shahre Kord, Shahre Kord, Iran
2. Associate Professor, Shahid Beheshty University, Tehran, Iran
3. Graduate Student, Kermanshah Dept of Fisheries, Kermanshah, Iran
4. Instructor, University of Gonbad-e-Kavous, Gonbad, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

در این مطالعه ۲۲ قطعه از ماهیان متعلق به گونه‌های *Capoeta trutta*, *C. aculeatae*, *C. damascina*, *C. buhsei* از رودخانه‌های سیروان (پالنگان)، ارمند، الوند، سرخکان بالاورد، ماربر، چنان خشکه، بهشت آباد، دوپلان و آب و تک در منطقه زاگرس برای تهیه توالی بارکد یا ژن *COI* مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۱۳ هاپلوتاپ به دست آمد. مقدار تمایز توالی بارکد در سطح درون گونه ای برپایه ضریب تمایز *K2P* ۰/۱۳ ± ۰/۰ درصد بود. نتایج نشان داد که ماهیان جنس *Capoeta* گروه تک شجره‌ای بوده و در مقایسه با سایر گونه‌های مورد بررسی به گونه *Barbus barbus* نزدیکتر بودند. بیشترین تمایز در بین گونه‌های *C. aculeatae* و *Capoeta trutta* (۷/۳ درصد) و کمترین مقدار تمایز در بین گونه‌های *C. buhsei* و *C. damascina* (۲/۷ درصد) وجود دارد. با توجه به ضرایب تمایز محاسبه شده بیشترین و کمترین زمان انشقاق گونه‌های مورد مطالعه ۳۸ و ۳/۵۵ و ۵/۱۹ و ۹/۶-۱۴/۳۸ میلیون سال برآورد شد.

واژه‌های کلیدی

بارکد
تمایز
زاگرس
Capoeta
COI
K2P

مقدمه

است، زیرا گونه‌های این جنس هگزапلوفید ($2n=150$) هستند. جدا شدن گروه بین النحرینی احتمالاً در اوسط میوسن در حدود ۱۲/۶ میلیون سال قبل، اعضای ایرانی گروه آناتولی- ایرانی در پلیوسن (۶/۷ میلیون سال قبل) و گروه خزر و آرال در طی اوآخر Levin et al. (2012) پلیوسن (۲/۶ میلیون سال قبل) رخ داده است (

Samaee and Patzner (2011) در ایران از نظر ریخت‌شناسی بررسی کردند و گروههای تمایزی را شناسایی کردند، اما باید برای روشن شدن ریشه ژنتیکی یا غیرژنتیکی این تمایز، مطالعات بیشتری انجام شود.

برای بررسی‌های شجره‌شناسی مولکولی می‌توان از ژن‌های موجود در هسته و میتوکندری استفاده کرد. فرایند پلی‌پلوئیداسیون طبیعی یکی از فرایندهای گونه‌زایی در ماهیانی مثل کپورماهیان، Hallerman آزادماهیان، ماهیان خاویاری و ماهیان مکنده است (Hallerman 2003). حالت پلی‌پلوئیدی با افزایش تعداد کروموزوم‌ها و افزایش تعداد نسخه‌های ژن‌های هسته‌ای می‌تواند نتایج بررسی‌های شجره‌شناسی را که با استفاده از ژن‌های هسته‌ای انجام می‌شوند با خطا همراه کند (Machordom and Doadrio 2001). با توجه به این موضوع، استفاده از ژن‌های میتوکندریایی به دلیل ماهیت هاپلوفید آنها، در مورد شجره‌شناسی گروههای مختلف کپورماهیان می‌تواند در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای کارآمدتر باشد. هدف از تهیه توالی‌های بارکد DNA، بهبود شناسایی گونه‌ها و کشف گونه‌های جدید از طریق مطالعه الگوهای تمایز توالی در یک منطقه استاندارد در ثنومن است. در مورد جانوران، تحقیقات به یک قطعه ۶۴۸ جفت بازی از ژن میتوکندریایی *COI* معطوف شده است، که می‌توان آن را به راحتی با استفاده از تعداد محدودی آغازگر در گونه‌های مختلف تکثیر کرد (Kerr et al. 2007).

کارایی این ژن در گروههای جانوری مختلف ارزیابی شده است و بیش از ۹۴ درصد گونه‌های مورد مطالعه دارای آرایه‌های بارکد مشخص و تمایز، با تغییرات درون گونه‌ای کم و تمایز بین گونه‌ای بالا نسبت به گونه‌های نزدیک، بوده‌اند و گونه‌های ماهیان هم Ward et al. 2005; Hajibabaei et al. 2006; Hubert et al. 2008 در این گروه قرار می‌گیرند (al.). با توجه به ویژگی‌های این ژن، امروزه جنبشی در سراسر جهان آغاز شده که به واسطه آن

جنوب غربی آسیا پراکنش گسترده‌ای دارد. این جنس ۲۰ گونه را در خود جای می‌دهد، که هفت گونه از آنها در ایران حضور دارند (Coad 2013). گونه‌های این جنس را می‌توان در بیشتر حوضه‌های آبخیز ایران مشاهده کرد. منشا این جنس نامشخص بوده و ممکن است با جنس *Barbus/Aulopyge* و یا با *Cyprinodon* خویشاوندان آن در آسیای جنوبی و شرقی ارتباط داشته باشد Levin et al. (2012). (Howes 1982; Coad 2013) جنس *Luciobarbus* را با بررسی ژن *Cytb* به جنس *Capoeta* گزارش کردند. در حوضه رودخانه‌های دجله و کارون که هر دو حوضه دجله بزرگ را تشکیل می‌دهند، به ویژه در زاگرس *C. aculeate*, *C. buhsei*, *C. damascina* و *C. trutta* حضور دارند. برپایه مطالعات ریخت‌شناسی گونه‌های یادشده به عنوان گونه‌های مشخص معرفی شده‌اند، اما در رابطه با روابط تکاملی و منشا ژنتیکی آنها در ایران اطلاعات کمی وجود دارد. با استفاده از روش‌های مولکولی در کنار بررسی‌های ریخت‌شناسی علاوه بر قضاؤت در مورد روابط رده‌بندی گونه‌ها می‌توان در مورد نحوه ارتباط تکاملی آنها با استناد به ضرایب ساعت مولکولی که بسته به ژن‌ها و موجودات حامل آنها می‌توانند متغیر باشند، قضاؤت کرد. بر پایه مطالعات Levin et al. (2012) که با استفاده از ژن *Cytb* انجام شده، ماهیان جنس *Capoeta* تک شجره‌ای بوده و در بین جنس *Luciobarbus* قرار دارند. در مطالعه یادشده منشا یا زمان پیدایش ماهیان جنس *Capoeta* دوره میوسن میانی عنوان شده است. نزدیکترین خویشاوند جنس *Capoeta* گونه *Luciobarbus subquincunciatus* است، که در حوضه دجله و فرات حضور دارد. پژوهشگران یاد شده عنوان می‌کنند که پیدایش بخش اختصاصی خراشیدن جلیک در ساختار دهان ماهیان این جنس یکبار در تکامل آنها رخ داده است. در این مقاله سه گروه اصلی بین النحرین (شامل گونه‌های *trutta* و *barroisi* در ایران)، گروه آناتولی- ایرانی (شامل گونه‌های *saadii* و *damascina buhsei* های *heratensis* و *aculeate*) شناسایی شده است. به احتمال زیاد این جنس در اثر حواծ آلوپلی پلوئیدی به وجود آمده

RCOI20III (TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG -3' استفاده شدند (Hashemzadeh et al. 2012). برای انجام عملیات تعیین توالی ژن *COI*. ابتدا این ژن تکثیر شد. هر واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر ۲/۵ میکرولیتر بافر X، ۰/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۲۵ میلی- مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بیوتگ (۵ واحد در میکرولیتر) و دو میکرولیتر DNA بود (Estoup et al. 1996). شرایط دمایی واکنش زنجیره پلیمراز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد (یک دقیقه)، ۶۱ درجه سانتی گراد (یک دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (یک دقیقه) و در نهایت یک چرخه ۱۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. در نتیجه واکنش PCR. یک قطعه از ژنوم میتوکندریالی به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز تکثیر شد که توالی کامل ژن *COI* را در بر گرفت. برای انجام بررسی‌های شجره شناسی، توالی انتهای ۵' ژن *COI* با استفاده از دستگاه 3100 ABI تعیین شد. برای انجام عملیات تعیین توالی از آغازگر پیشرو (FCOI20) استفاده شد. توالی‌های خام به صورت چشمی با استفاده از نرم افزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدند. عملیات انطباق^۱ توالی‌های *COI* با استفاده از نرم افزار ClustalX (1.83) (Thompson et al. 1997) انجام شد. به منظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی شجره شناسی، هاپلوتاپ‌های بدست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن (NCBI) با سایر توالی‌های موجود برای گونه‌های کپورمهایان (Cyprinidae) مقایسه شدند (Altschul et al. 1997). پس از انطباق و یکپارچه کردن توالی‌ها، یک قطعه به طول ۸۷۰ جفت باز انتخاب شد، که در بین ماهیان مورد مطالعه و توالی‌های موجود در بانک ژن مشترک بود. برای این که شاخصی کمی برای مقایسه مقدار تمایز در بین گونه‌ها در دست باشد، از فاصله ژنتیکی K2P (Kimura 1980) محاسبه شده با استفاده از نرم افزار MEGA5.1 استفاده شد (Tamura et al. 2007). برای ترسیم دارنگاره از روش مبتنی بر مدل یعنی روش بیشترین

پژوهشگران کشورهای مختلف توالی ژن یادشده را همراه با تهیه بانک‌های نمونه و تصویر نمونه‌ها تهیه کرده و آنها را در پایگاه‌های اطلاعاتی خاصی برای استفاده سایر پژوهشگران ذخیره می‌کنند. با انجام این امور و کامل شدن اطلاعات برای همه گونه‌های جانوری، امکان شناسایی سریع گونه‌ها با کمترین هزینه و انرژی فراهم خواهد شد. یکی از مزایای تهیه بارکد ژنتیکی در کتاب شناسایی گونه‌ها، کشف گونه‌های مخفی است، به این مفهوم که ممکن است گونه‌ها از نظر ژنتیکی تمایز داشته باشند، اما از نظر ریخت‌شناسی به عنوان گونه‌های یکسانی طبقه‌بندی شوند (Freeland 2005). برای مثال در این رابطه در بین دو فرم دیسک *Iranocypris typhlops* دار و بدون دیسک ماهی کور غار ایران، *Garra* نزدیک هستند با تهیه بارکد ژنتیکی مشخص شده است که دو گونه از ماهی کور وجود دارد و آنها به جنس *Garra* نزدیک هستند (Hashemzadeh et al. 2012). *C. buhsei*, *C. aculitae*, *Capoeta damascina* و *C. trutta* وجود دارند، در این مطالعه سعی شده است توالی و تنوع بارکد گونه‌های جنس *Capoeta* در منطقه یادشده مشخص شده و امکان شناسایی آنها و روابط شجره مادری آنها با استفاده از این توالی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

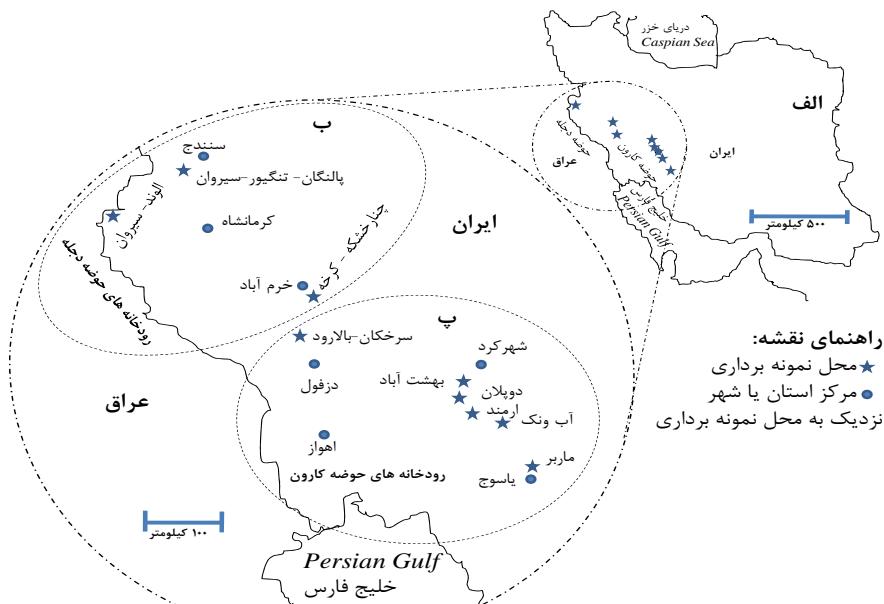
نمونه برداری از ماهیان مورد استفاده در این مطالعه در سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۹ با استفاده از الکتروشوکر در رودخانه‌های سیروان (پالنگان)، ارمند، الوند، سرخکان بالارود، ماربر، چتار خشکه، بهشت آباد، دوپلان و آب ونک انجام شد (شکل ۱). در این مطالعه تعداد ۷ قطعه *C. damascina*, ۷ قطعه *C. aculeate*, ۷ قطعه *C. buhsei* و ۶ قطعه *C. trutta* از مناطق مورد مطالعه استفاده شد. در زمان نمونه برداری باله سینه‌ای یا شکمی سمت راست ماهیان قطع و در الكل اتanol ۹۶ درصد برای مطالعات ژنتیکی ثبت شد و تعدادی از ماهیان نمونه برداری شده در فرمالین ۱۰ درصد جهت نگهداری در آرشیو ثبت شدند. نمونه‌های DNA با استفاده از روش Chelex100 استخراج شدند (Estoup et al. 1996). برای تکثیر ژن *COI*, آغازگرهای با توالی ۵'-ACCTCTGTCTCGGGGCTA -3' و ۵'-FCOI20 (5'-AACCTCTGTCTCGGGGCTA -3')

^۱ Alignment

جدول ۱- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه های مورد مطالعه بر اساس درصد تمایز توالی ژن *COI*. اعداد داخل پرانتز مدت زمان تخمینی اشتراق گونه های مورد مطالعه بر اساس میلیون سال است.

<i>C. damascina</i>	<i>C. aculeate</i>	<i>C. trutta</i>	گونه
			<i>C. trutta</i> (Meso)
		(۱۴/۳) ۷/۳	<i>C. aculeate</i> (Ca-Ar)
(۱۰/۹)	۵/۷	(۱۲/۳) ۶/۴	<i>C. damascina</i> (An-Ir)
(۵/۲) ۲/۷	(۱۱/۱) ۵/۸	(۱۲/۶) ۶/۶	<i>C. buhsei</i> (An-Ir)

(Meso) بین النحرین؛ (Ca-Ar) خزر-آرال؛ (An-Ir) آناتولی-ایران



شکل ۱- نقشه محل های نمونه برداری ماهیان مورد مطالعه. (الف) موقعیت کلی محدوده نمونه برداری؛ (ب) رودخانه های حوضه دجله و (پ) رودخانه های حوضه کارون. رودخانه های هر حوضه با اشکال بیضی محاط شده اند. کارون و دجله و فرات در جنوب غرب ایران ارondon رود را تشکیل داده و وارد خلیج فارس می شوند.

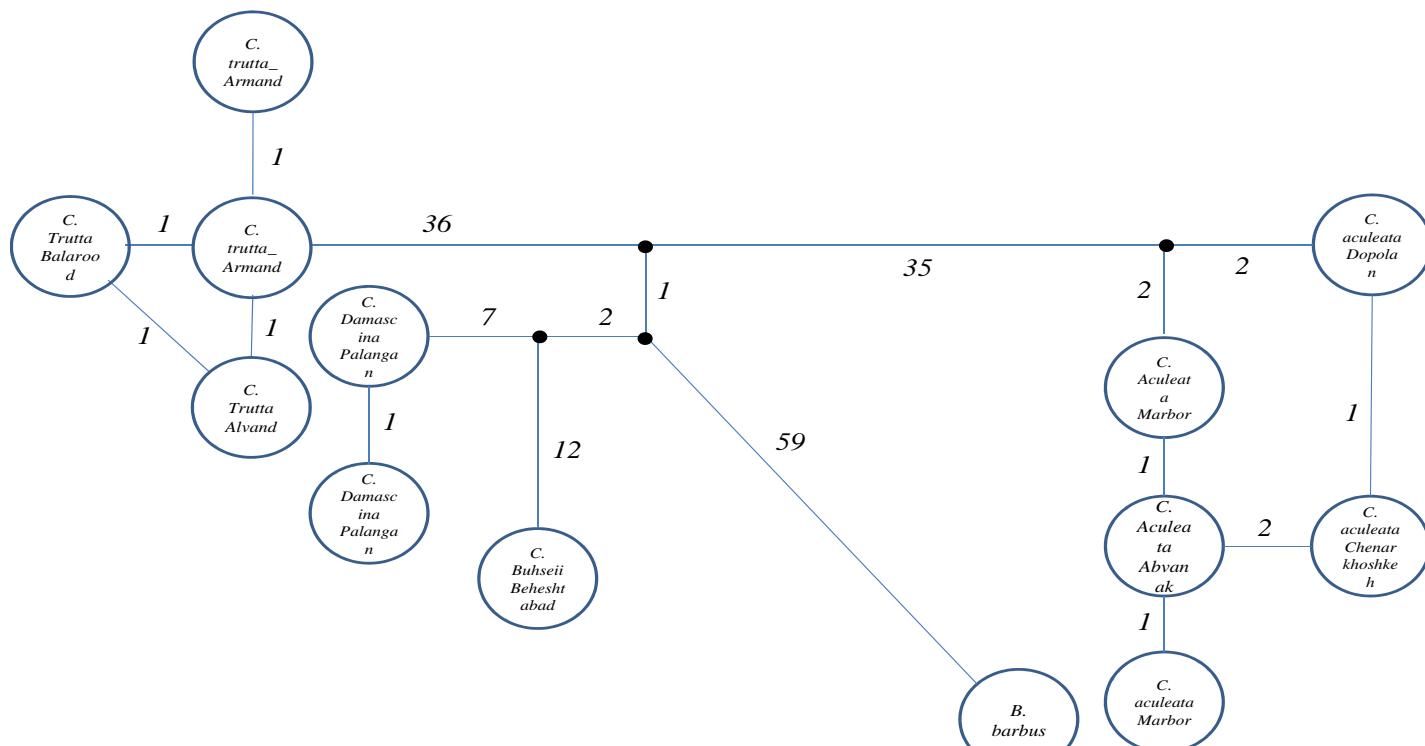
نتایج و بحث

در مجموع ۱۲ هاپلوتاپ (۵ هاپلوتاپ *C. aculeata*, دو هاپلوتاپ *C. damascina*, یک هاپلوتاپ *C. buhsei*، ۴ هاپلوتاپ *C. trutta*) شناسایی شد (جدول ۲ و شکل ۲). میانگین فاصله ژنتیکی K2P درون گونه های در گونه *C. trutta* ۰/۰۷ درصد، در گونه *C. buhsei* ۰/۱۷ درصد، در گونه *C. aculeate* ۰/۱۷ درصد، در گونه *C. damascina* ۰/۱۷ درصد بود. در مورد گونه های مورد مطالعه فاصله ژنتیکی در سطح درون گونه ای با سایر مطالعات و نتایج آنها برای سطح رده بندی یاد شده مطابقت دارد. تمایز توالی ژن *COI* در سطح درون گونه ای برای گروه های مختلف جانوری شامل خفash ها (Clare et al. 2006)، (Hebert et al. 2004)، پرنده گان آمریکای شمالی (۰/۲۷ درصد)،

احتمال Maximum Likelihood (Maximum Likelihood) موجود در نرم افزار MEGA5.1 استفاده شد. مدل تکاملی دارای بیشترین برآذش برای داده های مورد بررسی با روشن احتمال بیشینه توسط نرم افزار BIC: Bayesian MEGA5.1 و برپایه شاخص اطلاعاتی بایسی (Information Criterion (IC) انتخاب شد. در این رابطه مدل TN93+G+I102 به عنوان مناسب ترین مدل انتخاب شد. برای تایید اعتبار شاخه های دارنگاره از آزمون بوسترب با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. برای ترسیم شبکه هاپلوتاپی و مشاهده روابط هاپلوتاپ های بدست آمده از نرم افزار Clement et al. 2000 (TCS 1.21) استفاده شد. برای مشاهده همه هاپلوتاپ ها در یک شبکه هاپلوتاپی، تعداد گام های جهشی در نرم افزار افزایش داده شد.

جدول ۲- جایگاه‌های متفاوت نسبت به توالی ژن *COI* ماهی *Capoeta capoeta*. شماره‌های ردیف اول جدول نشان‌دهنده شماره جایگاه‌ها هستند.

نام	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۸	۳۹	۴۰	۴۱	۴۲	۴۳	۴۴	۴۵	۴۶	۴۷	۴۸	۴۹	۵۰
<i>C. capoeta</i>	A	A	T	C	C	T	C	C	A	T	T	G	C	A	T	C	T	A	A	A	T	A	C	C	C	C	T	G	A	A	G	A			
<i>C. trutta</i>	G	C	.	T	.	C	T	.	T	C	C	A	T	.	G	.	A	C	.	C	G	.	T	.	A	.	G	.							
<i>C. trutta</i>	G	C	.	T	.	C	T	.	T	C	C	A	T	.	G	.	A	C	.	C	G	.	T	.	A	.	G	.							
<i>C. aculeate</i>	G	T	T	.	.	.	C	.	C	G	.	G	.	.	.	T	T	A	.							
<i>C. buhsei</i>	T	C	T	T	T	C	.	.	.	A	.	G	G	C	G	T	.	T	T	C	.	G	G	.							
<i>C. aculeate</i>	G	T	T	T	.	.	C	.	C	G	T	T	A	.								
<i>C. damascina</i>	.	.	C	.	.	C	T	T	T	C	A	.	G	.	G	.	.	C	G	T	.	G	.	A	.	G	.	G							
<i>C. damascina</i>	.	.	C	.	.	C	T	T	T	C	.	G	.	G	.	G	.	C	G	T	.	G	.	A	.	G	.	G							
<i>C. damascina</i>	G	T	T	T	C	.	.	.	G	.	.	C	.	T	.	T	.	T	.	.	.	G	.								
<i>C. damascina</i>	G	T	T	T	C	.	.	.	G	.	.	C	.	T	.	T	.	T	.	.	.	G	.								
<i>C. aculeate</i>	G	T	T	.	.	C	.	C	G	.	G	.	.	.	T	T	A	.									

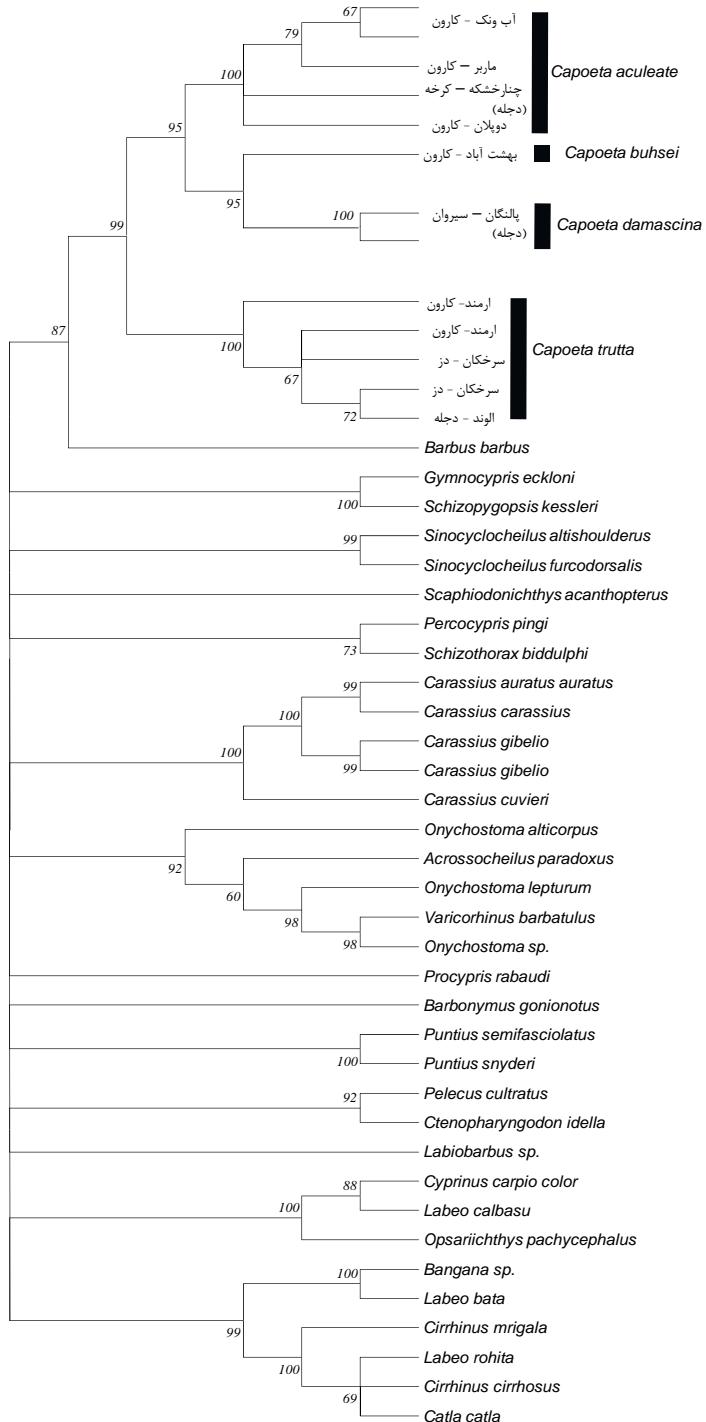


شکل ۲- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده برای ژن *COI* ماهیان موردنظری. اعداد موجود در کنار خطوط نشان دهنده تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت در بین هاپلوتایپ‌ها هستند.

و گونه *C. aculeatae* *trutta* را ۱۴/۳۸ میلیون سال (ضریب ۰/۵۲) تا ۹/۶ میلیون سال (ضریب ۰/۷۶) و زمان جدایی دو گونه *C. damascina* و *C. buhsei* را ۵/۱۹ میلیون سال (ضریب ۰/۵۲) تا ۳/۵۵ میلیون سال (ضریب ۰/۷۶) محاسبه کرد. با توجه به زمانهای جدایی محاسبه شده، سایر گونه‌های مورد مطالعه در زمانی بین زمانهای یادشده مشتق شده‌اند، با توجه به این که Levin et al. (2012) می‌توان زمانهای اشتراق یادشده را به عنوان زمان اشتراق گونه‌های جنس *Capoeta* تک شجره‌ای هستند (Ward et al. 2005; Hajibabaei et al. 2006; Hubert et al. 2008)، در مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در این رابطه گونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در این رابطه گونه‌های *C. buhsei* و *C. damascina* با ۲/۷ درصد تمایز توالی نزدیکترین گونه‌های مورد مطالعه بوده و بیشترین فاصله ژنتیکی در بین گونه‌های *C. aculeatae* و *C. trutta* وجود دارد (۷/۳ درصد). با توجه به میزان تمایز توالی در بین گونه‌های یک جنس در ماهیان آب شیرین که برابر با ۸/۳۷ درصد است (Hubert et al. 2008)، می‌توان عنوان کرد که مشاهدات حاضر نیز با گزارش‌های موجود در مورد ماهیان آب شیرین مطابقت دارد.

Levin et al. (2012) با توجه به فسیل‌های موجود و با بررسی ژن *Cytb* ساعت مولکولی ۰/۵۲ درصد در هر میلیون سال را محاسبه کردند، اما پیشتر ضریب ساعت مولکولی ۰/۷۶ درصد برای همین ژن گزارش شده است (Zardoya and Doadrio 1999). با توجه به ضرایب فوق می‌توان زمان جدایی یا انشقاق گونه‌های *C. barbus* را مشاهده کرد.

نتایج تحقیقات (Levin et al. 2012) مطابقت دارد، علاوه بر این عنوان می‌کند که منشا جنس *Capoeta* در جنوب غرب آسیا دارای مسیر یکسان با مسیر مرتبط با پیدایش جنس *Barbus* است، که در این مطالعه نیز موضوع یادشده تایید می‌شود. با توجه به این که گونه‌های جنس *Capoeta* در داشتن ساختار دهانی مشابه هستند، می‌توان عنوان کرد که پیدایش آنها در گذشته یکبار رخ داده است یا آنها تک شجره‌ای هستند (Levin et al. 2012). با توجه به ساعت مولکولی یادشده (۰/۵۲) می‌توان زمان اشتقاء جنس *Capoeta* از *Barbus* را بر پایه اطلاعات موجود ۲۱/۱۵ تا ۱۷/۸۸ میلیون سال قبل برآورد کرد. ماهیان جنس *Capoeta* رابطه نزدیکی با جنس *Luciobarbus* دارند (Levin et al. 2012)، که در مطالعه یادشده زمان اشتقاء جنس ۳۰/۸ تا ۲۰/۹ از جنس *Barbus* حدود ۲۵/۱ میلیون سال (قبل و زمان اشتقاء جنس *Capoeta* از *Luciobarbus* حدود ۱۷ تا ۲۰/۷ میلیون سال) میلیون سال پیش برآورد شده است. با توجه به موارد یادشده می‌توان برآورد بدست آمده در این مطالعه را نیز با برآوردهای سایر مطالعات مطابق دانست، زیرا براساس اطلاعات موجود در سیر تکامل ابتداء جنس *Luciobarbus* از جنس *Barbus* مشتق شده و سپس طی فرایند پلی پلوئیداسیون جنس *Capoeta* تکامل یافته است (Levin et al. 2012). در شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده (شکل ۲)، می‌توان مشاهده کرد که فاصله جهشی هاپلوتایپ‌های افراد متعلق به یک گونه، در همه موارد از یک تا دو جهش تجاوز نمی‌کند. با توجه به این که نمونه‌های مورد بررسی از رودخانه‌های مختلفی در حوضه دجله تهیه شده‌اند، می‌توان عنوان کرد که زمان جدایی جمیعت‌های رودخانه‌های مورد مطالعه در حدی نیست که موجب تمایز قابل توجه شود. با این حال ارائه قضاوت‌های بوم‌شناختی در مورد مهاجرت و روابط بین جمیعتی ماهیان مورد مطالعه تنها با توجه به تعداد کم نمونه‌های مورداستفاده در این مطالعه و همچنین با استفاده از ژن *COI* و یا سایر ژن‌های مشابه نمی‌تواند از قطعیت بالایی برخوردار باشد. ارائه قضاوت‌های دقیق در مورد روابط کنونی و گذشته نزدیک جمیعت‌های مورد مطالعه نیازمند استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر و نشانگرها‌ی مثل ریزماهواره‌ها است.



شکل ۳- دارنگاره احتمال بیشینه (ML) ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA5.1 برای توالی‌های بدست آمده در این مطالعه و توالی‌های موجود در باank ژن . اعداد درج شده در محل گره‌های دارنگاره مقادیر محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار هستند.

کرد گروه‌های خزر-آرال، آناتولی-ایران و بین‌النهرین معرفی شده توسط (Levin et al. 2012) کاملاً مشخص است. این مشاهده با

منابع

- 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.
- Clare EB, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN (2006) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7: 184-190.
- Clement M, Posada D and Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660
- Coad B (2013) Fresh water fishes of Iran. Available at <http://www.briancoad.com/contents.htm>
- 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.
- Freeland JR (2005) *Molecular Ecology*. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.
- 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.
- Hallerman EM (2003) Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Hashemzadeh Segherloo I, Bernatchez L, Golzaripour K, Abdoli A, Primmer CR and Bakhtiary M (2012) Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. *Journal of Fish Biology* 81: 1747-1753.
- Hebert PDN, Stoeckle M, Zemlak T, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biology* 2: 1657-1668.
- Howes G (1982) Anatomy and evolution of the jaws in the semiplotine carps with a review of the genus *Cyprinion* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 42: 299-335.

- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Laviolette N, Taylor E, Burridge 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.
- 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: 535-546.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 11-120.
- Levin BA, Freyhof J, Lajbner Z, Perea S, Abdoli A, Gaffaroglu M, Ozulug M, Rubenyan HR, Salnikov VB, Doadrio I (2012) Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 542-549.
- Machordom A, Doadrio I (2001) Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268: 1297-1306.
- Samaee SM, Patzner RA (2011) Morphometric differences among populations of tu'inii, *Capoeta damascina* (Teleostei: Cyprinidae), in the interior basins of Iran. *Journal of Applied Ichthyology* 27: 928-933.
- 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.
- Zardoya R, Doadrio I (1999) Molecular evidence of the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49: 227-237.