

## بررسی پراکنش و وضعیت رده‌بندی اعضای جنس *Barbus* Cuvier and Cloquet, 1816 در ایران با استفاده از ژن *COI*

### Analysis of distribution and taxonomy of the *Barbus* Cuvier and Cloquet, 1816 in Iran using *COI* gene

آرش جولاده رودبار<sup>۱\*</sup>

۱- دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Jouladeh-Roudbar A<sup>\*1</sup>

1- PhD, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jouladehroudbar@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۲/۱۹)

#### چکیده

اورنج ماهیان *Barbus* spp. یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین جنس‌های خانواده کپورماهیان Cyprinidae می‌باشند که برخی گونه‌های آن به لحاظ ظاهری شبیه به یکدیگر بوده و همین مسئله باعث شده تا در بین محققان شناسایی و تفکیک گونه و یا جمعیت‌های این جنس با مشکل روبرو شود. امروزه روش‌های نوین شناسایی مبتنی بر استفاده از DNA می‌تواند بسیاری از مشکلات رایج را که در بررسی‌های ریخت‌شناسی با آن رو به رو هستیم حل بنماید. در مطالعه حاضر به منظور شناسایی و تهیه نقشه پراکنش گونه جنس *Barbus* در ایران از پنج حوضه آبریز نمک، کویر، کاسپین، ارومیه و تیگریس با استفاده از دستگاه الکتروفیشر نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از توالی‌یابی ژن میتوکندریایی *COI* درخت تبارشناسی اعضای این جنس با استفاده از روش Bayesian inference و تخمین Maximum likelihood ترسیم شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه که تاییدکننده نتایج مطالعات پیشین بود، حضور چهار گونه *B. lacerta*، *B. miliaris* و *B. cyri karunensis* در آب‌های داخلی ایران تایید شد. علاوه بر این نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌ای اعضای جنس *Barbus* در ایران نشان داد بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۳/۴۸ بین دو گونه *B. lacerta* و *B. miliaris* و کمترین آن به میزان ۱/۱۷ مربوط به دو گونه *B. lacerta* و *B. cyri* است. همچنین با توجه به نتایج گونه *B. urmianus* مترادف *B. cyri* در نظر گرفته شد.

#### واژه‌های کلیدی

ایران  
تنوع ژنتیکی  
حوضه آبریز  
ماهی اورنج

*Carasobarbus Karaman, 1971 Luciobarbus Heckel, 1843*  
و *Mesopotamichthys Karaman, 1971* منتقل شدند  
(Borkenhagen 2014, Esmaeili et al. 2017, Jouladeh-  
Roudbar et al. 2020).

بر اساس مطالعات (Esmaeili et al. 2010) صرفاً گونه *Barbus lacerta* از این جنس از حوضه‌های کاسپین، ارومیه، اصفهان و تیگریس معتبر شناخته می‌شد. اما (Jouladeh- et al. 2015) Roudbar جمعیت موجود در حوضه تیگریس را مرتبط با گونه *B. lacerta* و یک گونه توصیف نشده، جمعیت حوضه کاسپین را مرتبط با گونه *B. cyri*، و جمعیت موجود در حوضه نمک و کویر را به *B. miliaris* نسبت داد، همچنین معتقد بودند بر اساس مطالعات (Motamedi et al. 2014) ممکن است جمعیت موجود در حوضه ارومیه مربوط به گونه جدیدی باشد. در ادامه (Khaefi et al. 2017) با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی (CO1) اعضای این جنس در آب‌های داخلی ایران را مورد مطالعه قرار دادند و ضمن تأیید نتایج (Jouladeh-Roudbar et al. 2015) گونه توصیف نشده را با نام *B. karunensis* از حوضه تیگریس توصیف نمود. همچنین آن‌ها جمعیت‌های ساکن حوضه ارومیه و کاسپین را به *B. cyri* منتسب نمودند. در ادامه (Levin et al. 2019) نیز تأیید نمودند که جمعیت حوضه کاسپین منتسب به گونه *B. cyri* است. اما اخیراً جمعیت حوضه رودخانه مهاباد چای در حوضه ارومیه صرفاً با استفاده از ویژگی‌های ریختی به‌عنوان *B. urmianus* توصیف شده است (Eagderi et al. 2019) ولی بر اساس آخرین فهرست منتشر شده از آب‌های داخلی ایران *B. lacerta* (حوضه تیگریس)، *B. karunensis* (حوضه تیگریس)، *B. miliaris* (حوضه‌های نمک و کویر) و *B. cyri* (کاسپین و ارومیه) از آب‌های داخلی ایران معتبر شناخته شده است و گونه *B. urmianus* مترادف *B. cyri* قرار داده شده است (Jouladeh-Roudbar et al. 2020).

با توجه به مطالب عنوان شده به‌نظر می‌رسد در مورد گونه‌های معتبر جنس *Barbus* در ایران اختلاف نظر وجود دارد، بنابراین این مطالعه به‌منظور بررسی جمعیت‌های این جنس در حوضه‌های آبریز ایران با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی هدف

همواره از روش‌های متفاوتی برای شناسایی، بررسی تنوع جمعیتی و تمایز گونه‌های مختلف ماهیان استفاده شده که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به بررسی‌های ریخت‌شناسی، سیتولوژیکی و روش‌های مبتنی بر DNA میتوکندریایی و هسته‌ای اشاره نمود (Levin et al. 2020; Perea et al. 2019; Levin et al. 2012). با توجه به این‌که شکل بدن و سایر ویژگی‌های ریختی ماهیان متأثر از محیط زیست آن‌ها می‌باشد، لذا نمی‌توان تنها با استناد به ویژگی‌های ریختی به تفکیک، طبقه‌بندی و یا تمایز جمعیت‌های یک گونه اقدام نمود. زیرا اغلب به‌دلیل شرایط مشابه یا متفاوت محیطی و اثرات محیط بر ویژگی‌های ریختی ماهیان، تشخیص گونه‌ها یا جمعیت‌ها با خطا مواجه می‌شود (Frankham et al. 2014).

در سال‌های اخیر مزیت استفاده از روش‌های مولکولی نظیر تعیین توالی ژن میتوکندریایی *COI* و استفاده از آن در شناسایی، تفکیک و طبقه‌بندی گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف ماهیان به اثبات رسیده است (Ward et al. 2005; Ivanova et al. 2007; Ward et al. 2008). نتایج بررسی‌های مبتنی بر این ژن اغلب کامل‌کننده، تصحیح‌کننده و یا گاهی در تضاد با نتایج مطالعات ریخت‌شناسی پیشین بوده است (Borkenhagen 2014; Freyhof 2016; Freyhof et al. 2016; Ghanavi et al. 2016).

جنس *Barbus* یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های خانواده کپور ماهیان Cyprinidae است که همواره بر سر شناسایی و اعتبار گونه‌های آن در بین محققان اختلاف نظر وجود داشته است، زیرا گونه‌های مختلف این جنس، اغلب تفاوت‌های گسترده‌ای در ویژگی‌های ریخت‌شناسی جمعیت‌های خود بروز می‌دهند. این تفاوت‌ها در جمعیت‌هایی که با یکدیگر فاصله جغرافیایی بیشتری دارند نمود گسترده‌تری دارد و همین امر باعث می‌شود که شناسایی آن‌ها با مشکل مواجه شود (Naseka and Bogutskaya 2009; Motamedi et al. 2014; Khaefi et al. 2017a, b).

در یکی از ابتدایی‌ترین مطالعاتی که روی ماهیان آب‌های داخلی ایران صورت گرفت، ۱۵ گونه معتبر در جنس *Barbus* قرار داده شد (Coad 1998). اما در ادامه با بررسی‌های گسترده‌تر و بهره‌جویی از روش‌های فیلوژنتیکی مبتنی بر ژنوم میتوکندریایی اعضای آن به جنس‌های *Arabibarbus* Borkenhagen, 2014

آگاز برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد.

جهت تکثیر ژن *COI* از پرایمر رفت FishF1- (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' و برگشت FishR1- (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') استفاده شد (Ward et al. 2005). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که از مقدار شش میکرولیتر بافر 10X، ۳ میکرولیتر منیزیم کلرید (MgCl<sub>2</sub>)، دو میکرولیتر پرایمر رفت و دو میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر (۱۰mM) dNTPs، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز (۵ u/μl) و ۲ میکرولیتر DNA الگو بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای سه دقیقه، به دنبال آن سی و چهار چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۷ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر موفق ناحیه *COI* پنج میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاز ۰/۷ درصد الکتروفورز شد.

گذاری شد تا در نهایت بتوان نتیجه گرفت چه گونه‌هایی از این جنس در آب‌های داخلی ایران یافت می‌شود.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ترسیم نقشه پراکنش: برای انجام این تحقیق در خلال سال‌های سال ۱۳۹۸-۱۳۹۶ از منابع آبی پنج حوضه آبریز نمک، کویر، کاسپین، ارومیه و تیگریس با بهره‌جویی از دستگاه الکتروفیشر SAMUS 725MS نمونه‌برداری انجام شد. قسمتی از باله و یا عضله سمت راست بدن نمونه‌های صید شده (جدول ۱) در اتانول ۹۶ درصد فیکس و جهت انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از صید اعضای جنس *Barbus* مختصات مکانی نقطه نمونه‌برداری با استفاده از دستگاه GPS ثبت شد. سپس برای مصور نمودن نقاط پراکنش از نرم‌افزار ArcMap 10.7 و Excel 2019 استفاده شد.

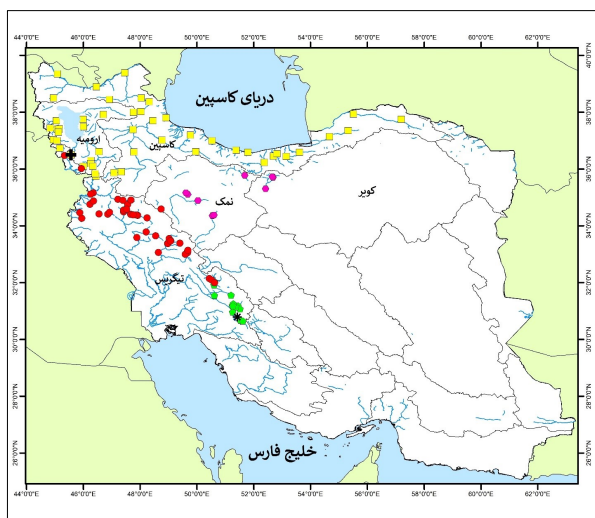
استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA Extraction Kit BIO-RAD از نمونه‌ها صورت گرفت. از روش‌های اسپکتروفتومتری (Cary UV-Vis 400) و الکتروفورز افقی ژل

جدول ۱- نام ایستگاه، گونه و موقعیت جغرافیایی نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش

ردیف	نام ایستگاه	گونه	مختصات جغرافیایی	حوضه
۱	قمرود	<i>B. miliaris</i>	34.353125° 50.547961°	نمک
۲	جلایر		34.887046° 50.037460°	
۳	چونقان		32.086897° 50.665503°	تیگریس
۴	خرسان	<i>B. karunensis</i>	31.177867° 51.138367°	
۵	سفید رود		36.891415° 49.524847°	کاسپین
۶	تجن		36.535757° 53.088423°	
۷	شهر چای	<i>B. cyri</i>	37.439925° 44.830483°	
۸	زربینه رود		36.697951° 46.540564°	ارومیه
۹	سفر چای		35.863716° 46.416849°	
۱۰	میری سه		36.502495° 45.563973°	
۱۱	کشکان		33.749681° 48.206480°	
۱۲	قلیان		33.101418° 49.681126°	
۱۳	حسین اباد	<i>B. lacerta</i>	34.553211° 47.404816°	تیگریس
۱۴	چشمه سرده		33.737887° 48.231870°	
۱۵	بوئین		35.966173° 45.696024°	
۱۶	بریسو		36.232220° 45.549137°	
۱۷	گاو رود		34.927930° 47.221354°	

شکل درخت تکاملی ترسیم شده نمونه‌های گونه *B. lacerta* در پنج خوشه جدا، نمونه‌های *B. cyri* بدون خوشه (پلی تومی) و نمونه‌های *B. miliaris* و *B. karunensis* هر کدام در یک خوشه قرار گرفتند.

نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌های گونه‌های جنس *Barbus* مورد بررسی در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۳/۴۸ بین دو گونه *B. lacerta* و *B. miliaris* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۱/۱۷ بین دو گونه *B. lacerta* و *B. cyri* به دست آمد. همچنین بیشترین و کمترین میزان فاصله ژنتیکی درون جمعیتی در گونه *B. lacerta* به میزان ۱/۱ (حسین آباد+چشمه سرده و کشکان) و ۰/۵۲ درصد (قلیان و کشکان) حاصل شد.



شکل ۱- نقشه پراکنش جنس *Barbus* در ایران. مربع زرد: *B. cyri*، دایره قرمز *B. lacerta*، پنج ضلعی سبز *B. karunensis*، شش ضلعی صورتی *B. miliaris* ستاره مشکی: محل تیپ *B. karunensis* و مثبت مشکی محل تیپ گونه اسمی *B. urmianus*

جدول ۲- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد مطالعه جنس

*Barbus* بر اساس درصد تفاوت در ژن *COI*.

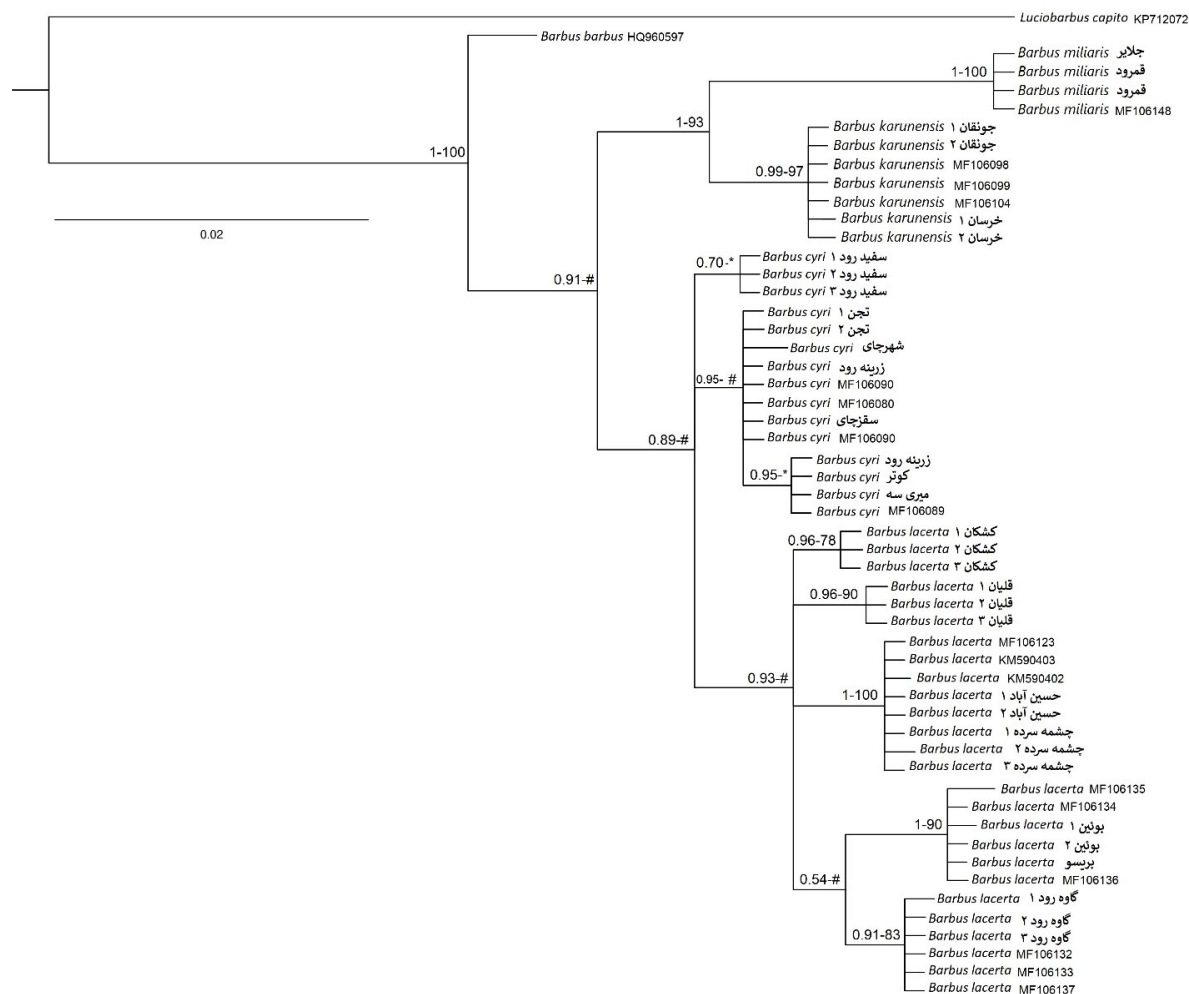
ردیف	گونه	۱	۲	۳
۱	<i>B. lacerta</i>			
۲	<i>B. cyri</i>	۱/۱۷		
۳	<i>B. karunensis</i>	۱/۸۳	۱/۸۱	
۴	<i>B. miliaris</i>	۳/۴۸	۲/۸۳	۲/۴۸

پس از حصول اطمینان از تکثیر موفق و بدون آلودگی قطعه مورد نظر ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی ماکروژن (MacroGen, Korea) خالص‌سازی و در نهایت جهت توالی‌یابی (روش Sanger sequencing) به همان شرکت ارسال شد. قطعه تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای رفت توالی‌یابی شدند.

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2020 ویرایش شدند. عملیات مقایسه و تطبیق توالی‌های ژن *COI* با استفاده از ClustalW multiple alignment در نرم‌افزار BioEdit v. 7.2.5 انجام شد (Hall 1999). به منظور یافتن توالی‌های مشابه جهت ترسیم درخت تبارشناسی، توالی ویرایش شده با استفاده از جستجوی BLAST در بانک ژن (NCBI) با سایر توالی‌های این جنس مقایسه شدند. مدل تکاملی مناسب برای توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار jModelTest انتخاب شد (Darriba et al. 2012). بر اساس نتیجه حاصله از این نرم‌افزار، مدل K2+G برای تجزیه و تحلیل پیشنهاد شد. برای ترسیم درخت‌های تبارشناسی از روش Bayesian inference در نرم‌افزار MrBayes v. 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) و تکرار ۱۰ میلیون نسل و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML GUI v. 2.0 (Silvestro and Michalak, 2012) و ۱۰ هزار تکرار استفاده شد. برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی توالی‌های حاصله از روش K2P در نرم‌افزار MEGA v. 7.0 استفاده شد (Kumar et al. 2016). همچنین برای مشاهده درخت‌های به دست آمده نیز از نرم‌افزار FigTree v. 1.5 استفاده شد (Rambaut, 2009). گونه *Luciobarbus capito* نیز به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

## نتایج

در خلال نمونه‌برداری‌های صورت گرفته از ۱۰۲ ایستگاه مختلف در پنج حوضه آبریز کویر، نمک، کاسپین، ارومیه و تیگریس نمونه‌های گونه‌های جنس *Barbus* صید شدند (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصله از تعیین توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی ۳۵ نمونه به طول ۶۱۶ جفت‌باز، چهار گونه *B. lacerta*، *B. miliaris* و *B. karunensis* شناسایی شدند. با توجه به

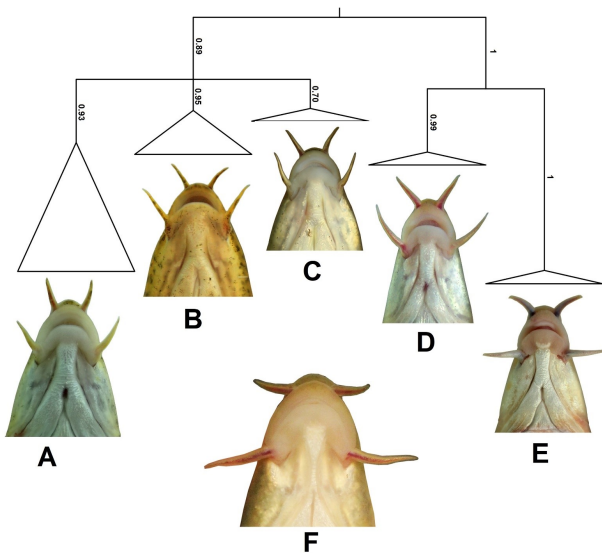


شکل ۲- درخت تبارشناسی ترسیم شده به روش Maximum likelihood و Bayesian inference. شماره دسترسی نمونه‌های استفاده شده از بانک NCBI در مقابل آن‌ها آورده شده است، در شاخه‌هایی که عدد بوت استرپ زیر ۵۰ بوده از علامت # استفاده شده، در صورتی که شاخه در روش ML موجود نبوده روی شاخه ستاره \* قرار داده شده است.

جدول ۳- میانگین فاصله ژنتیکی K2P (درصد) بین جمعیت‌های مختلف حاصله از ترسیم درخت تبارشناسی (شکل ۲) اعضای جنس Barbus در این مطالعه.

ردیف	نام	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
۱	<i>B. cyri</i> (کوتر)									
۲	<i>B. cyri</i> (کاسپین)	۰/۵۲								
۳	<i>B. cyri</i> (ارومیه)	۰/۱۶	۰/۳۷							
۴	<i>B. lacerta</i> (گاوه رود)	۱/۱۲	۱/۰۴	۱/۰۶						
۵	<i>B. lacerta</i> (حسین آباد+چشمه سرده)	۱/۳	۱/۲۱	۱/۲۴	۰/۸۶					
۶	<i>B. lacerta</i> (بوئین+بریسو)	۱/۳۶	۱/۴۵	۱/۲۹	۰/۷۵	۰/۹۲				
۷	<i>B. lacerta</i> (قلیان)	۰/۹۵	۰/۸۶	۰/۸۹	۰/۵۳	۰/۶۹	۰/۹۲			
۸	<i>B. lacerta</i> (کشکان)	۱/۱۳	۱/۰۴	۱/۰۶	۰/۶۹	۰/۸۷	۱/۱	۰/۵۲		
۹	<i>B. miliaris</i>	۳/۰۱	۳/۰۱	۲/۸۶	۳/۳۷	۳/۷۴	۳/۰۶	۳/۵۶	۳/۷۴	
۱۰	<i>B. karounensis</i>	۱/۹۳	۱/۷۵	۱/۷۷	۱/۷۴	۲/۱	۱/۸	۱/۹۲	۲/۱	۲/۲۸

همچنین در شکل ۴ (F) فرم لب‌های نمونه صید شده از محل تیپ *B. urmianus* ارائه شده و به نظر می‌رسد تفاوت متمایز کننده‌ای با دیگر نمونه‌های *B. cyri* صید شده از حوضه ارومیه و کاسپین ندارد.



شکل ۴- درخت تبارشناسی BI به همراه نمای زیرین سر و فرم لب‌ها؛ به ترتیب از بالا به پایین: A: *B. lacerta*، B: *B. cyri* (ارومیه)، C: *B. cyri* (کاسپین)، D: *B. miliaris*، E: *B. miliaris*، F: *B. cyri* (کوثر، حوضه رودخانه *B. urmianus*).

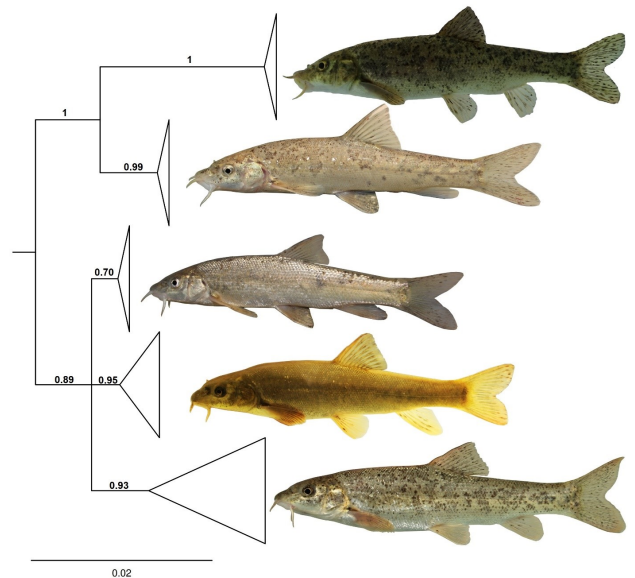


شکل ۵- *Barbus cyri* صید شده از نهر میری‌سه، کوثر، حوضه رودخانه مهابادچای

بحث

با توجه به تنوع ریختی بالا و شباهت ظاهری اعضای جنس *Barbus* در حوضه‌های آبریز ایران و دشواری شناسایی و تفکیک آن‌ها با استفاده از ویژگی‌های ریختی، توالی‌یابی DNA می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد و مطمئن برای بررسی تنوع و تفکیک جمعیت‌ها و یا گونه‌های احتمالی مورد استفاده قرار گیرد. در

علاوه بر این کمترین میزان فاصله ژنتیکی درون جمعیتی برای گونه *B. cyri* به میزان ۰/۱۶ درصد بین دو جمعیت ارومیه و کوثر و بیشترین آن به مقدار ۰/۵۲ درصد بین دو جمعیت کاسپین و کوثر به دست آمد. در بین جمعیت‌های گونه‌های جنس *Barbus* اختلافات ریختی فراوانی گزارش شده است ( Khaefi et al. 2014a, b; Motamedi et al. 2014) در این مطالعه نیز این تفاوت‌ها به وضوح مشاهده شد، در شکل ۳ نمای عمومی و رنگ بدن گونه‌های معتبر این جنس در ایران به همراه درخت تبارشناسی ارائه شده است. همواره از شکل عمومی لب‌ها، به عنوان یکی از ویژگی‌های شناسایی گونه‌های این جنس و بعضاً جمعیت‌های آن نام برده شده است. فرم لب‌های این جمعیت‌ها به همراه درخت تبارشناسی در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌طور که از شکل پیداست به نظر می‌رسد فرم لب‌ها در نمونه‌های مورد مقایسه کمابیش به یکدیگر شبیه هستند (شکل ۴، A-E)، اما به نظر می‌رسد فرم لب‌ها در گونه *B. karounensis* کمی متفاوت از دیگر گونه‌ها و ضخیم‌تر است (شکل ۴، E).



شکل ۳- درخت تبارشناسی BI به همراه نمای کلی بدن جمعیت‌های مورد مطالعه؛ به ترتیب از بالا به پایین: ۱- *B. karounensis*، ۲- *B. miliaris*، ۳- *B. lacerta* و *B. cyri* (کاسپین)، *B. cyri* (ارومیه) و

برای رسیدن گونه *B. cyri* به حوضه ارومیه در نظر گرفت مسیر اول محل قرارگیری سرشاخه‌های رودخانه قطورچای (کاسپین) و زولاچای (شمال حوضه ارومیه) مکانی که کوه‌های قره تپه وجود دارند، و مسیر دوم محل سر شاخه‌های رودخانه قزل اوزن حوالی کوه‌های دوزخدره با رودخانه سقز رود از سرشاخه‌های زربنه رود. احتمالاً اولین افراد این گونه در خلال فرآیندهای زمین‌شناسی از دو مسیر احتمالی ذکر شده به این حوضه وارد شده‌اند (Khaefi et al. 2017).

همان‌طور که اشاره شد *B. urmianus* از رودخانه مهابادچای در حوضه ارومیه با استفاده از ویژگی‌های ریختی توصیف شده است (Eagderi et al. 2019). با توجه به شکل درخت تبارشناسی ترسیم شده نمونه‌های صید شده از محل تیپ (شکل ۵)، در کنار نمونه‌های *B. cyri* و در یک شاخه قرار گرفته‌اند. همچنین فاصله ژنتیکی نمونه‌های این رودخانه در حدود ۰/۱۷ درصد با دیگر نمونه‌های *B. cyri* در حوضه آبریز ارومیه و ۰/۵۲ درصد با نمونه‌های حوضه کاسپین تفاوت دارد. این درحالی است بر اساس مطالعات (Khaefi et al. 2017a) و نتایج این مطالعه میزان اختلاف ژنتیکی قابل تأیید بین گونه‌های جنس *Barbus* حداقل یک درصد برآورد می‌شود.

در مجموع با توجه نتایج حاصله از این مطالعه، به نظر می‌رسد توالی ژن میتوکندریایی *COI* توانست گونه‌های مختلف جنس *Barbus* را از یکدیگر تفکیک نماید، اما این ژن به تنهایی نمی‌تواند روابط میان گونه‌ها را در سطح بالاتر (نظیر جنس، گونه و خانواده) به وضوح مشخص کند. لذا در این موارد افزایش تعداد آرایه‌ها و استفاده از آن همراه با نشانگرهای دیگر (مانند ژن *Cyt b* و هسته‌ای) توصیه می‌شود.

روش‌های سنتی شناسایی (براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی)، تشخیص گونه‌های جنس *Barbus* به‌ویژه اعضای دو گونه *B. lacerta* و *B. cyri*، به‌علت همپوشانی بالای ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بسیار مشکل و گاهی غیر ممکن می‌باشد (Khaefi et al. 2014a, b; Motamedi et al. 2017a, b). علاوه بر شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف، توالی‌یابی DNA می‌تواند به‌عنوان ابزاری مفید برای بررسی و رفع مشکلات تبارشناسی اعضای یک تاکسون مورد استفاده قرار بگیرد (Hebert et al. 2004).

با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی با استفاده از توالی ژن *COI*، اعتبار چهار گونه *B. lacerta*، *B. karunensis*، *B. cyri* و *B. miliaris* در آب‌های داخلی ایران قابل تأیید است. بنابراین فرضیه حضور صرفاً یک گونه (*B. lacerta*) از این جنس در آب‌های داخلی ایران رد می‌شود (Esmaili et al. 2010). براساس مطالعات (Levin et al. 2012) گونه *B. lacerta* از گونه *B. cyri* کمتر از ۲۰۰ هزار سال قبل (به‌طور میانگین حدود ۶۰ هزار سال) انشقاق یافته است. *B. lacerta* گونه جوانی است که چندان از لحاظ ژنتیکی از *B. cyri* تمایز نیافته است. در مراجعه به ویژگی‌های ریختی نیز می‌توان دریافت این دو گونه چندان از لحاظ ریختی متمایز نشده‌اند.

با توجه به نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P جمعیت‌های *B. cyri* ساکن حوضه‌های کاسپین و ارومیه نیز کمتر از ۰/۴ درصد با یکدیگر اختلاف دارند. بنابر مطالعات (Khaefi et al. 2017a) بین جمعیت‌های حوضه کاسپین و ارومیه در گذشته جریان ژنی وجود داشته است. پیش از این نیز جریان ژنی بین ماهیان کاسپین، دریای سیاه و آرال با توجه به شباهت‌های هاپلوتایپ‌های صید شده گونه‌های ماهیان به اثبات رسیده است (Osinov and Bernatchez 1996). به نظر می‌رسد می‌توان دو مسیر احتمالی

### منابع

Borkenhagen K (2014) A new genus and species of cyprinid fish (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Arabian Peninsula, and its phylogenetic and zoogeographic affinities. *Environmental biology of fishes* 97:1179-1195.

Coad BW (1998) Systematic biodiversity in the freshwater fishes of Iran. *Italian Journal of Zoology* 65: 101-108.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9:772-772.

Eagderi S, Nikmehr N, Çiçek E, Esmaili HR, Vatandoust S, Mousavi-Sabet H (2019) *Barbus urmianus* a new species from Urmia Lake basin, Iran (Teleostei: Cyprinidae). *International Journal of Aquatic Biology* 7:239-244.

- Esmaili HR, Coad BW, Gholamifard A, Nazari N, Teimori A (2010) Annotated checklist of the freshwater fishes of Iran. *Zoosystematica Rossica* 19:361-386.
- Esmaili HR, Mehraban H, Abbasi K, Keivany Y, Brian BW (2017) Review and updated checklist of freshwater fishes of Iran: Taxonomy, distribution and conservation status. *Iranian Journal of Ichthyology* 4:1-114.
- Freyhof J (2016) Redescription of *Garra elegans* (Günther, 1868), a poorly known species from the Tigris River drainage (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa* 4173:496-500.
- Freyhof J, Abdullah YS, Ararat K, Ibrahim H, Geiger MF (2016) *Eidinemacheilus proudlovei*, a new subterranean loach from Iraqi Kurdistan (Teleostei; Nemacheilidae). *Zootaxa* 4173:225-236.
- Ghanavi HR, Gonzalez EG, Doadrio I (2016) Phylogenetic relationships of freshwater fishes of the genus *Capoeta* (Actinopterygii, Cyprinidae) in Iran. *Ecology and Evolution* 6:8205-8222.
- Hall TA (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* 2.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PD (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7:544-548.
- Jouladeh-Roudbar A, Ghanavi HR, Doadrio I (2020) Ichthyofauna from Iranian freshwater: annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment. *Zoological Studies* 59:303.
- Jouladeh-Roudbar A, Vatandoust S, Eagderi S, Jafari-Kenari S, Mousavi-Sabet H (2015) Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* 8:855-909.
- Khaefi R, Esmaili HR, Geiger MF, Eagderi S (2017a) Taxonomic review of the cryptic *Barbus lacerta* species group with description of a new species (Teleostei: Cyprinidae). *FishTaxa* 2:90-115.
- Khaefi R, Vatandoust S, Esmaili HR (2017b) Re-description of *Barbus miliaris* de Filippi, 1863 (Teleostei: Cyprinidae) from the endorheic Namak Lake basin of Iran. *FishTaxa* 2:33-42.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33:1870-1874.
- Levin BA, Freyhof J, Lajbner Z, Perea S, Abdoli A, Gaffaroglu M, Özuluğ 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.
- Levin BA, Gandlin AA, Simonov ES, Levina MA, Barmintseva AE, Japoshvili B, Muge NS, Mumladze L, Mustafayev NJ, Pashkov AN, Roubenyan HR (2019) Phylogeny, phylogeography and hybridization of Caucasian barbels of the genus *Barbus* (Actinopterygii, Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 135:31-44.
- Motamedi M, Madjdzadeh SM, Teimori A, Esmaili HR, Mohsenzadeh S (2014) Morphological and molecular perspective on geographical differentiation of *Barbus* populations (Actinopterygii; Cyprinidae) within Iranian freshwater drainages. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14:339-351.
- Naseka AM, Bogutskaya NG (2009) Fishes of the Caspian Sea: zoogeography and updated check-list. *Zoosystematica Rossica* 18:295-317.
- Osinov AG, Bernatchez L, (1996) "Atlantic" and "Danubian" Phylogenetic groupings of brown trout *Salmo trutta* complex: genetic divergence, evolution, and conservation. *Journal of Ichthyology* 36:723-746.
- Perea S, Sousa-Santos C, Robalo J, Doadrio I (2020) Multilocus phylogeny and systematics of Iberian endemic *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Zoologica Scripta* 49:440-457.
- Rambaut A (2009) FigTree v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAXML. *Organisms Diversity and Evolution* 12:335-337.
- Ward RD, Costa FO, Holmes BH, Steinke D (2008) DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquatic Biology* 3:71-78.
- Ward RD, Zemiak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B* 360:1847-1857.