

تهیه بارکد ژنتیکی ماهیان چاه نیمه‌های زابل

Genetic Barcoding of fishes in Chahnimeh-ha, Zabol, Iran

نوشین لطیفی^۱، ایرج هاشم‌زاده سقرلو^{۲*}، یونس شیخ^۳، محمدرضا اشرف‌زاده^۴، روح الله رحیمی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۲- دانشیار، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۴- استادیار، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

Latifi N¹, Hashemzadeh Segherloo I^{*2}, Sheikh Y³, Ashrafzadeh MR⁴, Rahimi R⁴

1. MSc Student, Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, ShahreKord University, ShahreKord, Iran

2. Associate Prof, Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, ShahreKord University, ShahreKord, Iran

3. MSc Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, ShahreKord University, ShahreKord, Iran

4. Assistant Prof, Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, ShahreKord University, ShahreKord, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: irajhashemzade@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

چاه نیمه‌های زابل در سال‌های اخیر به دلیل خشکسالی‌های مختلفی که باعث عدم پایداری آب در تالاب هامون گشته است، برای حیات آبریان که در آن قسمت زیست می‌کنند، دارای اهمیت فراوان شده‌اند. این شرایط، شناسایی گونه و تنوع زیستی ماهیان این منطقه را جهت ایجاد اطلاعات پایه مورد نیاز، در مدیریت و حفاظت از ماهیان ضروری می‌سازد. به منظور شناسایی و تهیه بارکد ژنتیکی گونه‌های ماهی در چاه نیمه‌های زابل، عملیات نمونه‌برداری در سال ۱۳۹۵ انجام شد. در مجموع ۲۹ نمونه شامل *Carassius sp.*, *Schizothorax zaradunyi*, *Shizocypris altidorsalis*, *Cyprinus carpio*, *Gonorrhynchus adiscus*, *Ctenopharingodon idella*, *Paracobitis rhadinaeus* صید شدند. برای انجام تحلیل‌های شجره‌شناسی، انتهای 5' ژن COI در نمونه‌های مورد بررسی تعیین شد. جهت بررسی‌های شجره‌شناسی، از روش الحاق همسایگی (Neighbor-Joining)، استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش وجود شش گروه شجره‌شناسی را نشان داد. بر همین اساس بیشترین میزان تمایز ژنتیکی ۲۷/۱ درصد، بین گونه *C. P. rhadinaeus* و *C. idella* کمترین میزان تمایز ژنتیکی ۱۰/۸ درصد، بین گونه *S. zarudyni* و *C. carpio* مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

چاه نیمه‌ها

زابل

شجره‌شناسی

ماهی

COI

DNA Barcoding

مقدمه

تالاب بین‌المللی هامون یکی از تالاب‌های مهم دنیا و بزرگ‌ترین دریاچه آب شیرین در سراسر فلات ایران محسوب می‌شود (Noori 2000). خشک‌سالی‌های چند دهه اخیر و عدم پایداری آب باعث شده‌است حیات این تالاب دچار بحران شود (Noori et al. 2008). بنابراین با خشک شدن تالاب هامون اهمیت چاه نیمه‌های سیستان در تداوم حیات انسانی و جانوری مشهود است. در حال حاضر در سیستان چاه نیمه‌ها تنها زیستگاه گونه‌هایی است که سابقاً در دریاچه زیست می‌کرده‌اند. در واقع حوادث طبیعی و انسانی همچون خشک سالی و معرفی گونه‌های غریبومی در کنار سایر عوامل حیات و بقای ماهیان بومی این دریاچه را به خطر انداخته است. از آنجا که حفظ گونه‌های بومی آسیب‌پذیر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، تلاش جهانی برای دستیابی به این هدف رو به افزایش است (Abdoli 2000). مطالعه بر روی ماهیان دراکوسیستم‌های آبی از لحاظ تکاملی، بوم‌شناسی، رفتارشناسی، حفاظت و مدیریت درحوضه منابع آبی و بهره‌برداری دارای اهمیت بالایی است و به بیانی دیگر مطالعه بر روی ماهیان جهت رسیدن به درک صحیحی از زیست‌شناسی آن‌ها و مطالعه محیط‌های آبی اولین قدم در اقدامات حفاظتی محسوب می‌شود (Szlachciak and Zabkiewicz 2008).

برای شناسایی ماهیان و تنوع جمعیتی و گونه‌ای آن‌ها رویکردهای مختلفی شامل ریخت‌شناسی، کالبدشناسی، سیتولوژی و روش‌های مولکولی وجود دارد. با توجه به این که شکل و ویژگی ریختی ماهیان تحت تأثیر محیط می‌باشد، نمی‌توان تنها با استناد به این صفات در مورد تفاوت رده‌بندی ماهیان متعلق به گونه‌های نزدیک و جمعیت‌های یک گونه قضاوت نمود. زیرا امکان دارد به دلیل شرایط مشابه یا متفاوت محیطی و اثرات محیط بر ریخت‌شناسی ماهیان، تشخیص گونه‌ها یا جمعیت‌ها با خطا انجام شود (Hashemzadeh Segherloo et al. 2012). به همین دلیل بهتر است از روش‌ها و معیارهایی استفاده شود که تحت تأثیر محیط قرار نداشته باشند. یکی از روش‌های یاد شده روش‌های سلول‌شناسی مثل بررسی کروموزوم‌ها است که این روش به دلیل پرزحمت بودن، استفاده از آن در مطالعات مطلوبیت چندانی ندارد. یکی دیگر از این روش‌ها، روش‌های مولکولی است. برای

بررسی‌های مولکولی می‌توان از ژن‌های موجود در هسته و میتوکندری استفاده کرد. فرآیند پلی پلوئیداسیون طبیعی یکی از فرآیندهای گونه‌زایی در ماهیانی مثل کپورماهیان (Cyprinidae)، آزادماهیان (Salmonidae)، ماهیان خاویاری (Acipenseridae) و ماهیان مکنده (Catostomidae) است (Hallerman 2003). با توجه به این موضوع، استفاده از ژن‌های میتوکندریایی به دلیل ماهیت هاپلوئید 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 همچنین شناسایی گونه‌های جدید از طریق مطالعه الگوهای تمایز توالی در یک قطعه ۶۴۸ جفت‌بازی از ژن میتوکندریایی COI معطوف شده‌است، 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 متمایز، با تغییرات درون گونه‌ای کم و تمایز بین گونه‌ای بالا نسبت به گونه‌های نزدیک بوده‌اند و گونه‌های ماهیان هم در این گروه قرار می‌گیرند (Hubert et al. 2008; Ward et al. 2006; Hajbabaie et al. 2005).

با توجه به ویژگی‌های این ژن، امروزه جنبشی در سراسر جهان آغاز شده که به‌واسطه آن پژوهشگران کشورهای مختلف توالی ژن یاد شده را همراه با تهیه بانک‌های نمونه و تصویر نمونه‌ها تهیه کرده و آن‌ها را در پایگاه اطلاعاتی خاصی برای استفاده سایر پژوهشگران ذخیره می‌کنند. با انجام این امور و تکمیل اطلاعات برای همه گونه‌های جانوری، امکان شناسایی سریع گونه‌ها با کمترین هزینه و انرژی فراهم خواهد شد. یکی از مزایای تهیه بارکد ژنتیکی در کنار شناسایی گونه‌ها، کشف گونه‌های مخفی است، به این مفهوم که ممکن است گونه از نظر ژنتیکی تمایز داشته باشند، اما از نظر ریخت‌شناسی به‌عنوان گونه‌های یکسانی طبقه‌بندی شوند (Freeland 2005). کاهش در ذخایر ژنتیکی جمعیت‌های ماهیان طبیعی یکی از مشکلات مهم مدیریتی شیلاتی محسوب می‌شود. امروزه نه تنها تنوع ژنتیکی بسیاری از جوامع ماهیان تغییر پیدا کرده است، بلکه هزاران جمعیت و گونه در اثر آلودگی، بهره‌برداری‌های بیش از اندازه، تخریب زیستگاه، سد

شدن مسیر مهاجرت و سایر توسعه های انسانی به کلی نابود شده اند (Ferguson 1995).

با توجه به این که در مورد شناسایی تنوع گونه ای ماهیان شرق کشور کار منسجمی انجام نشده است و متأسفانه به دلیل مشکلات مرتبط با خشکسالی امکان از بین رفتن تنوع ژنتیکی و حتی انقراض گونه های آبزیان وجود دارد، در نتیجه اولین گام در مدیریت شناسایی تنوع ژنتیکی و رده بندی ماهیان این مناطق است، به همین علت در این مطالعه منطقه چاه نیمه های زابل برای مطالعه و تعیین تنوع گونه ای ماهیان انتخاب شده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری از ماهیان مورد استفاده در این مطالعه در سال های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ با استفاده از تور ساچوک و دام در چاه نیمه های زابل انجام شد (شکل ۱). در زمان نمونه برداری باله سینه ای یا باله شکمی سمت راست ماهیان قطع و در الکل اتانل ۹۶ درصد برای مطالعات ژنتیکی تثبیت شد. برای شناسایی نمونه ها از چک لیست های موجود شامل (Esmaili et al., 2018)، (Esmaili et al., 2017) و (Abdoli 2000) استفاده شد.

نمونه های DNA با استفاده از روش Chelex100 استخراج شدند (Estoup et al. 1996). برای تکثیر ژن COI، از آغازگرها با توالی (5'-AACCTCTGTCTTCGGGGCTC-3') *FCOI20* و (5'-TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG-3') *RCOI20III* استفاده شد (Hashemzadeh Segherloo et al. 2012). برای انجام عملیات تعیین توالی ژن COI، ابتدا این ژن از طریق واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) تکثیر شد. هر واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم 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 پلیمرز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه ای 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 دقیقه ای در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. در نتیجه واکنش PCR، یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز تکثیر شد. برای 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 (*FCOI120*) استفاده شد.

توالی های خام به صورت چشمی با استفاده از نرم افزار Bioedit V 7.1.33 ویرایش شدند. عملیات انطباق توالی های *COI* با استفاده از نرم افزار ClustalX انجام شد. پس از انطباق و یکپارچه کردن توالی ها، یک قطعه به طول ۶۱۴ جفت باز انتخاب شد، که در بین ماهیان مورد مطالعه مشترک بود. برای مشاهده هاپلوتایپ ها و تعیین تعداد آن ها شبکه هاپلوتایپی TCS با استفاده از نرم افزار PopArt ترسیم شد. برای اینکه شاخص 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 MEGA7 استفاده شد. برای ترسیم دارنگاره از روش مبتنی بر مدل یعنی روش بیشترین احتمال (Maximum Likelihood) و Neighbor-joining (NJ) موجود در نرم افزار MEGA7 استفاده شد. مدل تکاملی دارای بیشترین برازش برای داده های مورد بررسی با روش احتمال بیشینه توسط نرم افزار MEGA7 بر پایه شاخص اطلاعاتی بایسی (BIC: Bayesian Information Criterion) انتخاب شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه تعداد ۹ قطعه *Carassius sp.*، ۷ قطعه *Paracobitis rhadinaeus*، ۲ قطعه *Schizothorax zarudnyi*، ۱ قطعه *Gonorhynchus adiscus*، ۴ قطعه *Cyprinus carpio* و ۶ قطعه *Ctenopharyngodon idella* از مناطق مورد مطالعه استفاده شد که سه گونه *Carassius sp.*، *C. carpio* و *C. idella* از ماهیان غیربومی هستند. در مجموع متوسط ترکیب نوکلئوتیدها در این توالی شامل ۲۸/۹ درصد تیمین، ۲۸/۶ درصد سیتوزین، ۲۵/۱ درصد آدنین و ۱۷/۷ درصد گوانین بود.

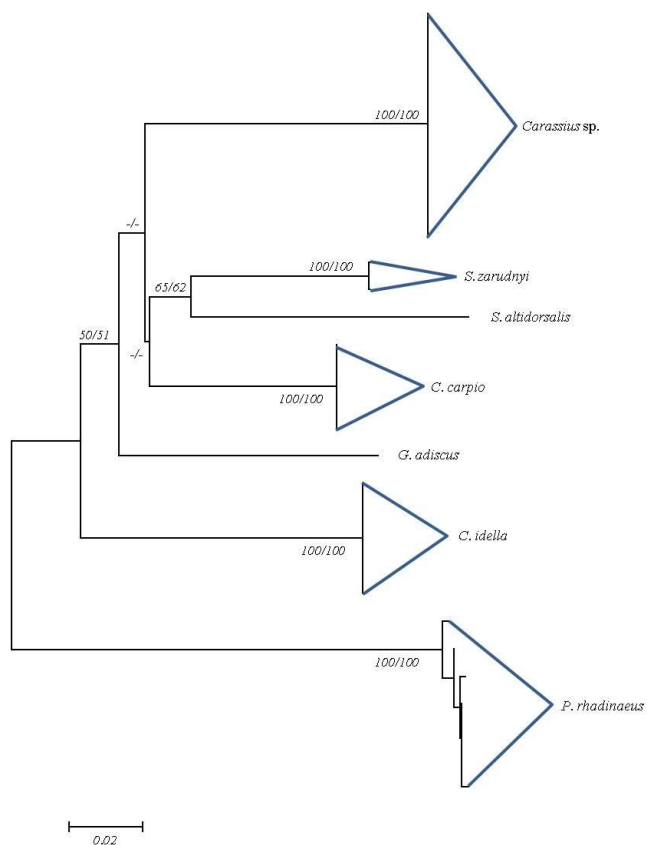
در بین نمونه های مورد بررسی ۱۲ هاپلوتایپ مشاهده شد که شامل پنج هاپلوتایپ برای *P. rhadinaeus*، یک هاپلوتایپ برای

درخت تبارشناسی ترسیم شده مربوط به نمونه‌های مورد مطالعه با دو روش الحاق همسایگی (NJ) و احتمال بیشینه (ML) نتایج مشابهی را نشان داد. به همین دلیل تنها دارنگاره الحاق همسایگی به همراه ضرایب بوت‌استرپ مربوط به روش احتمال بیشینه ارائه شده است (شکل ۳). در دارنگاره یادشده می‌توان شش گروه شجره‌شناسی شامل (۱) *Carassius* sp.، (۲) *S. zarudnyi* و *S. altidorsalis* (۳) *C. carpio*، (۴) *G. adiscus*، (۵) *C. idella* و (۶) *P. rhadinaeus* را تشخیص داد (شکل ۳). نمونه‌های *Carrasius* با ضریب بوت‌استرپ صد در هر دو دارنگاره در یک خوشه قرار گرفتند و گونه‌های *S. zarudnyi* و *S. altidorsalis* در یک خوشه تک‌شجره‌ای با ضریب بوت‌استرپ پایین (۶۵/۶۲) در یک گروه شجره‌شناسی قرار گرفتند.

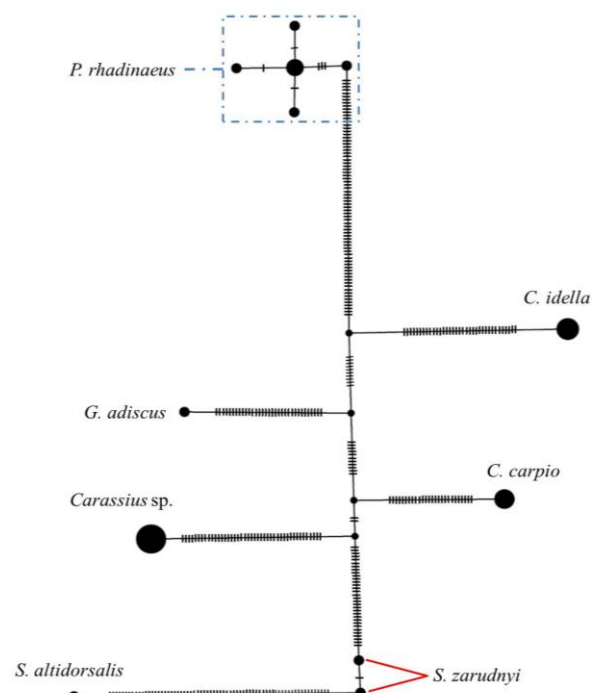
C. idella، یک هاپلوتایپ برای *G. adiscus*، یک هاپلوتایپ *C. carpio*، یک هاپلوتایپ برای *C. auratus*، دو هاپلوتایپ برای *S. zarudnyi* و یک هاپلوتایپ برای *S. altidorsalis* مشاهده شد (شکل ۲). عدم مشاهده هاپلوتایپ‌های متنوع را برای برخی گونه‌ها شاید بتوان به اندازه نمونه بسیار کوچک آن‌ها نسبت داد که این مورد یکی از معایبی است که ممکن است قضاوت‌های ارائه شده در رابطه با تنوع ژنتیکی در این مطالعه را با خطا همراه کند.



شکل ۱- موقعیت منطقه مورد مطالعه



شکل ۳- درخت تبارشناسی الحاق همسایگی و احتمال بیشینه ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 برای توالی‌های به دست آمده در این مطالعه. اعداد درج شده در امتداد شاخه‌های دارنگاره مقادیر Bootstrap محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار به ترتیب از چپ به راست مربوط به روش‌های ML و NJ هستند. شاخه‌های دارای ضریب بوت‌استرپ کمتر از ۵۰ درصد با خط تیره (-) مشخص شده‌اند.



شکل ۲- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده با برای توالی‌های تهیه شده در این مطالعه.

غیربومی یاد شده معمولاً در مراکز تکثیر با تعداد محدودی مولد تکثیر و در منابع آبی رهاسازی می‌شوند و همین موضوع نیز ممکن است یکی از دلایل عدم مشاهده تنوع در ژنوم mtDNA ماهیان یاد شده باشد. در مورد گونه‌های بومی که دارای تنوع هاپلوتایپی بودند (*S. zarudnyi* و *P. rhadinaeus*) مقادیر تمایز ژنتیکی درون گونه‌ای مشاهده شده که برابر با ۰/۳-۰/۲ بود با سایر مطالعات مطابقت دارد. تمایز توالی ژن COI در سطح درون گونه‌ای برای گروه‌های مختلف جانوری شامل خفاش‌ها ۰/۶ درصد (Clare et al. 2006)، پرندگان آمریکای شمالی ۰/۲۷ درصد (Hebert et al. 2004)، ماهیان دریایی ۰/۳۹ درصد (Ward et al. 2005) و در ماهیان آب شیرین کانادا ۰/۲۷ درصد (Hubert et al. 2008)، گزارش شده‌است. بیشترین تمایز ژنتیکی بین گونه‌های *P. rhadinaeus* و *C. idella* (۲۷/۱ درصد) و کمترین تمایز بین گونه‌های *S. zarudnyi* و *C. carpio* (۱۰/۸ درصد) بود (جدول ۱). در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه تنها چهار گونه بومی در چاه‌نیمه‌های زابل شناسایی شد. اما با توجه به اینکه در این مطالعه از ابزار نمونه‌برداری محدودی استفاده شده‌است نمی‌توان تنوع گونه‌ای ماهیان منطقه یاد شده را محدود به آنچه که در این مطالعه مشخص شد دانست. احتمالاً با استفاده از ابزار نمونه‌برداری دقیق‌تر و متنوع‌تری به توان تنوع گونه‌ای بیش‌تری را در این منطقه شناسایی و مطالعه نمود.

گونه *G. adiscus* با ضریب بوت‌استرپ پایین با گونه‌های *S. altidorsalis zarudnyi*، *Carassius sp.* و *C. carpio* در یک گروه قرار گرفتند، البته باید به این موضوع اشاره شود که این گروه‌بندی به دلیل عدم استفاده از سایر گونه‌ها و تنها استفاده از انواع گونه‌های موجود در منطقه مورد مطالعه رخ داده است و طبیعی است که با افزودن گونه‌های خویشاوند هرکدام از گونه‌های مورد بررسی الگوی خوشه‌بندی در دارنگاره تغییر خواهد کرد. گونه *P. rhadinaeus* در مقایسه با سایر گونه‌ها در هیچ یک از گروه‌های شجره‌شناسی فوق قرار نگرفت، که با توجه به تفاوت رده‌بندی این گونه و تفاوت آن با اعضای خانواده کپورماهیان این مشاهده طبیعی است.

فاصله ژنتیکی K2P درون گونه‌ای در گونه‌های *Carassius sp.*، *C. carpio* و *C. idella* صفر درصد بود. با توجه به این موضوع که این ماهیان از ماهیان غیربومی اقتصادی بوده و برای اهداف خوراکی صید می‌شوند ممکن است عدم وجود تنوع در آنها را بتوان به فعالیت‌های صید یاد شده و حساسیت نسبی بالای mtDNA نسبت به تنگناهای جمعیتی و یا انحراف ژنتیکی تصادفی دانست. به این مفهوم که صید در محیط محدود چاه نیمه‌ها به صورت فرایندی عمل می‌کند که اندازه جمعیت را کاهش داده و در این فرایند ژنوم mtDNA به دلیل کوچک بودن اندازه مؤثر جمعیت آن سریع تحت تأثیر قرار گرفته و ممکن است تنوع آن با سرعت بیش‌تری در مقایسه با ژنوم هسته‌ای کاهش پیدا کند (Hallerman 2003). از سوی دیگر ماهیان

جدول ۱- فواصل ژنتیکی K2P محاسبه شده در دو سطح درون گونه‌ای و بین گونه‌ای. در مواردی که تنها یک نمونه از یک گونه موجود بوده است فاصله درون گونه‌ای برای گونه یادشده با خط تیره مشخص شده‌است.

گونه	فاصله درون گونه	۲	۳	۴	۵	۶	۷
<i>G. adiscus</i>	-						
<i>P. rhadinaeus</i>	۰/۳	۲۳/۶					
<i>S. altidorsalis</i>	-	۱۶/۳	۲۳/۵				
<i>S. zarudnyi</i>	۰/۲	۱۴/۱	۲۲/۲	۱۲/۴			
<i>Carassius sp</i>	۰/۰۰	۱۵/۴	۲۳/۱	۱۶/۵	۱۳/۷		
<i>C. idella</i>	۰/۰۰	۱۴/۱	۲۷/۱	۱۶/۹	۱۶/۳	۱۷/۲	
<i>C. carpio</i>	۰/۰۰	۱۲/۶	۲۲	۱۴	۱۰/۸	۱۲/۸	۱۴/۳

منابع

- Abdoli A (2000) The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. 378 p.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI.
- Esmaeili HR, Mehraban H, Abbasi K, Keivany Y and Brian WC (2017) Review and updated checklist of freshwater fishes of Iran: Taxonomy, distribution and conservation status. Iranian Journal of Ichthyology 4: 1-114.
- Esmaeili HR, Sayyadzadeh G, Eagderi S, abbasi K (2018) Checklist of freshwater fishes of Iran. FishTaxa 3:1-95.
- 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.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, Mcmeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of Salmo. Journal of fish Biology 47:103-126.
- Freeland JR (2005) Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd. 400 pp.
- Hallerman (2003) Population Genrtic: principles and Applications for fisheries Scientists. American fisheries society, Bethesda, Maryland.
- Hashemzadeh segherloo I, Bernatchez L, Golzarianpour K, Abdoli A, Primmer CR, Bakhtiary M (2012) Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran care barb *Iranocypris typhlops*. Journal of fish Biology 81:1747-1753.
- Hebert PDN, Stoeklem Zemlak T, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biology 20:1657-1668.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandark NE, Laviolette N, Taylor E, Burrige M, Wathinson D, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April S, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian Freshwater fishes through DNA Bacodes. *PLoS one* 3: p.e2490.
- Kerr KCR, stoeckle MY, Dove CT, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN (2007) Comprehensive DNA brocade coverage of North American birds. Molecular Ecology Notes 7:535-716.
- kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions though comparative studies of nucleotide sequences Journal of Molecular Evolution 16:11-120.
- 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.
- Noori GR, Arbabi T, Noori S (2008) Hamoon wetland the life of Sistan. Sepeher Publication Center Tehran, Iran, 150 P. (In Persian).
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia fish species. Philosophical Transactions of the Royal society: Biological Sciences 360:1847-1857.