

بررسی روابط فیلوژنی باربوس ماهیان جنوب ایران براساس توالی ژنی سیتوکروم *b*

Investigation of phylogenetic relationship of Barbinae species in south of Iran

میثم رئیسی عزیزی^۱، احمد قرایی^{۲*}، مصطفی غفاری^۳
۱، ۲ و ۳- دانشجوی کارشناسی و استادیاران، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل

Rais Azizi M¹, Gharaei A^{*2}, Ghaffari M³

1,2,3. BSc Student and Assistant Professors, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: agharaei551@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲۳- تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

به منظور بررسی روابط فیلوژنی شش گونه از باربوس ماهیان جنوب کشور شامل *Schizothorax zarudnyi*، *Schizocypris altidorsalis*، *Barbus sharpeyi*، *B. subquinciatus*، *B. xanthopterus* و *B. esocinus* به ترتیب تعداد ۱۰، ۱۰، ۳، ۵ و ۴ قطعه نمونه ماهی از مناطق چاه نیمه‌های سیستان و رودخانه کارون صید و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از استخراج DNA از بافت باله آنها از روش فنل - کلروفرم، با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، ناحیه‌ای به طول تقریبی ۹۸۰ جفت باز از ژن سیتوکروم *b* نمونه‌های ماهی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. پس از اطمینان از صحت محصولات تکثیری بدست آمده با استفاده از کیت تخلیص DNA، خالص‌سازی و مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که دو گونه *Schizothorax zarudnyi* و *Schizocypris altidorsalis* در ارتباط نزدیک باهم (گروه‌های خواهری) و هم گروه با گونه *Barbus sharpeyi* نسبت به سایر گونه‌های دیگر قرار گرفتند. همچنین براساس مقایسه توالی ژن سیتوکروم *b* گونه‌های باربوس در سراسر جهان مشخص شد که تمامی گونه‌های خانواده باربوس ماهیان مورد بررسی در این تحقیق در چنگال جداگانه‌ای دسته‌بندی شدند. این موضوع در حقیقت این فرضیه را تقویت می‌نماید که دگرگونی و تغییرات ایجاد شده در گونه‌های داخل ایران در طی سالیان طولانی و مستقل از سایر مناطق دیگر جهان اتفاق افتاده است. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند اطلاعات سودمندی جهت برنامه‌های حفاظتی و مدیریتی این گونه‌های با ارزش بومی ایران فراهم سازد.

واژه‌های کلیدی

باربوس ماهیان،
توالی‌یابی،
ژن سیتوکروم *b*،
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز،
فیلوژنی

مقدمه

امروزه شناسایی گونه‌ها، زیرگونه‌ها و جمعیت‌های آبزیان از اهمیت فراوانی برخوردار است زیرا علاوه بر مدیریت صحیح و بهره‌برداری مناسب از منابع، سبب اجرای برنامه‌های اصولی در راستای حفاظت از گونه‌ها و جمعیت‌های با ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در گونه‌های مختلف می‌شود. تنوع ژنتیکی آبزیان یکی از شاخص‌های مهم تعیین شرایط اکولوژیک منابع آبی می‌باشد (Zhu et al. 2002). کاهش تنوع ژنتیکی برای جمعیت‌های مختلف مضر و بر میزان برداشت آنها تأثیرگذار است. بهره‌برداری از ذخایر گونه‌های مختلف نیاز به شناخت کافی از وضعیت ذخایر گونه‌ها، نژادها و جمعیت‌های متعدد آن دارد تا بتوان مدیریت اصولی بر ذخایر اعمال نمود.

کپور ماهیان بزرگترین گروه از فون ماهیان نژاد اروپایی - آسیایی ساکن در آب‌های شیرین هستند و تا کنون محققان بسیاری، ساختار ژنتیکی این خانواده را مورد بررسی قرار داده‌اند (Durand et al. 2002). باربوس‌ها با بیش از ۸۰۰ گونه، از جمله گونه‌های غالب کپور ماهیان می‌باشند که در سرتاسر اروپا، آفریقا و آسیا گسترش یافته‌اند (Wang et al. 2004). رابطه فیلوژنتیک و شناسایی تاکسونومیک باربوس ماهیان سالها مورد بحث و جدل بوده است (Tsigenopoulos et al. 1999). تا قبل از سال ۱۹۹۰ این مطالعات در اروپا بر اساس اطلاعات ریخت‌شناختی و توزیع جغرافیایی بود و در برخی از مطالعات، کاراکترهای استخوان شناسی نیز برای تعیین رابطه بین گونه‌های مختلف به کار گرفته شد (Doario 1990). با این همه، بدلیل تنوع مورفولوژیکی بسیار زیاد باربوسها، در برخی موارد تفسیر این اطلاعات بسیار مشکل و سخت می‌شود (Encina and Granad 1988). با این حال مطالعات مورفولوژیک، استخوان‌شناختی، اکولوژیک و ژنتیکی موجب توسعه و تکمیل اطلاعات فیلوژنی باربوس‌ها شده است (Encina and Granado 1988, 1997; Aparicio and Sostoa 2000) (Callejas and Ochando 1998)، هرچند که سوالات اساسی مربوط به جدایی تکاملی آنها همچنان بی پاسخ مانده است (Tsigenopoulos and Berrebi 2000). جنس *Schizothorax* قبلا در زیر خانواده *Schizothoracinae* از خانواده *Cyprinidae* طبقه بندی می‌شد (Coad 1992)، اما در منابع جدید همراه با جنس

Barbus در زیر خانواده *Barbinae* آورده شده است (Nelson 2006). ماهیان زیر خانواده *Schizothoracinae* که متعلق به خانواده کپورماهیان می‌باشند به لحاظ داشتن دو سری فلس بزرگ در دو طرف مجرای تناسلی و مخرج از بقیه ماهیان متمایز هستند و بومی فلات مرکزی آسیا محسوب می‌شوند (Chen and Chen 2001). ماهیان *Schizothorax zarudnyi* و *Schizocypris altidorsalis* در جهان منحصراً در شرق کشور ایران (تالاب هامون) گزارش شده است (Nikolskii 1897; Coad 1998). این گونه متعلق به عرض‌های جغرافیایی بالا و آبهای بالا دست رودخانه هیرمند بوده که به مرور با سیستم این رودخانه از آب-های مناطق هندوکش و بطور احتمالی از جمعیت ماهیان قدیمی که ابتدا در سیستم رودخانه آمودریا گسترده بودند به طرف پایین دست گسترش پیدا نمودند (Annandale et al. 1920). این ماهی در گویش محلی منطقه سیستان ماهی سفیدک و وطنی خوانده می‌شود و بیش از هر ماهی دیگری مورد پسند مردم می‌باشد. در محیط طبیعی این ماهی در دمای ۱۴ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد و هنگام جریان‌های سیلابی رودخانه هیرمند تخم‌ریزی می‌کند. خشکسالی‌های طولانی مدت (از سال ۱۳۸۹-۱۳۷۶) موجب از بین رفتن زیستخوان‌های (nich) تخم‌ریزی این ماهی شده است و ورود گونه‌های غیر بومی مانند کپورماهیان چینی به تالاب هامون باعث شد تا به تدریج از جمعیت این ماهی کاسته شود و هم اکنون پراکنش آن محدود به مخازن چاه نیمه‌های سیستان می‌باشد و جزء گونه‌های آسیب‌پذیر و در معرض خطر محسوب می‌شود (Abdoli 2000; Rahdari et al. 1390).

گونه‌های *B. subquinciatus*, *Barbus sharpeyi* و *B. esocinus* همگی از گونه‌های بومی حوزه دجله و کارون در جنوب ایران هستند که دارای ارزش صید اقتصادی و ورزشی می‌باشند (Abdoli 1378). در سالهای اخیر حفاظت و بازسازی ذخایر این گونه‌ها مورد توجه جدی سازمان شیلات ایران قرار است.

مطالعات ژنتیکی بر اساس الکتروفورز پروتئین برای تعیین اختلاف و برآورد رابطه بین گونه‌ای گروه‌هایی از ماهیان بسیار موثر بوده است (Avis 1994; Ruiz et al. 2003) اما این تکنیک قادر به تشخیص کامل گونه‌های باربوس نبوده است (Wilson et

استخراج DNA از نمونه‌های باله به روش فنل-کلروفرم (Brook and Russell 2001) با کمی تغییر در روش استخراج انجام گرفت. DNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر تا زمان انجام مطالعات در فریزر 20°C - نگهداری شد. بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده نیز با الکتروفورز آنها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و طیف سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی H145915 (GACTTGAAAAACCACCGTTG) و H14724 (CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC) جهت تکثیر ناحیه ژن سیتوکروم *b* (Cyt b) موجود در DNA میتوکندریایی (mtDNA) نمونه‌ها توسط دستگاه PCR انجام شد. حجم واکنش پی سی آر، ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA هدف، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر با غلظت ۱۰ μM ، ۴۰۰ μM dNTP، یک واحد آنزیم Tag DNA polymerase (Sinagene, Iran)، بافر (۱X) PCR، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl_2 و آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم مورد نظر بود. برنامه سیکل‌های حرارتی بترتیب: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله دوم اتصال (Annealing) ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای یک دقیقه و مرحله سوم بسط نهایی (Extention) ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. پس از بررسی کیفیت محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، این محصولات توسط کیت تخلیص Vinvantis (GF-GC-050) جداسازی شدند و کمیت آنها بواسطه طیف سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و برای تعیین توالی فرستاده شدند. داده‌های حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit، GeneRunner و انجام Blasting آنالیز شدند و ابتدا و انتهای قطعات مورد نظر مشخص و میزان شباهت آن با سایر توالی‌های مشابه موجود در بانک جهانی ژن (جدول ۲) بررسی شد.

al. 1985). علاوه بر پروتئین‌ها و نشانگرهای مبتنی بر DNA هسته‌ای، توالی‌های مختلف ژنهای mtDNA برای تعیین سطوح تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای بسیار مفید گزارش شده است. چرا که نرخ سریع تکامل mtDNA (تقریباً ۵-۱۰ برابر ژنهای هسته‌ای) و به ارث رسیدن آن به همراه رشته مادری، mtDNA را به یک سیستم ژنتیکی بسیار مفید برای مطالعات گونه‌ها تبدیل کرده است (Maria Habib et al. 2010). از بین ژنهای میتوکندریایی، ژن سیتوکروم *b* (Cyt b) برای مطالعات اختلاف ژنتیکی بسیار مناسب گزارش شده است (McVeigh and Davidson 1991; Delin et al. 2006). با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در زمینه تنوع ژنتیکی و بررسی رابطه فیلوژنی مابین گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق صورت نگرفته است، لذا بررسی تنوع ژنتیکی و جایگاه سیستماتیک این گونه‌های مهم اکولوژیکی به عنوان هدف اصلی در تحقیق حاضر دنبال شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از ماهیان مورد آزمایش با استفاده از تور سالیک و گوشگیر از مناطق چاه نیمه‌های سیستان و کارون انجام شد (جدول ۱). به ترتیب از تعداد ۱۰، ۱۰، ۵، ۳ و ۴ ماهی *Barbus*، *Schizocypris altidorsalis*، *Schizothorax zarudnyi*، *B. esocinus* و *B. xanthopterus*، *B. subquinciatus*، *sharpeyi*، ۱ تا ۲ گرم بافت نرم باله پشتی جدا و در اتانول ۹۵ درصد نگهداری شد.

جدول ۱- مختصات نقاط نمونه برداری نمونه‌های باربوس ماهیان

ایستگاه	مختصات جغرافیایی
۱	N ۳۰° ۴۶' ۹۷" E ۶۱° ۴۱' ۳۰"
۲	N ۳۰° ۴۷' ۴۸" E ۶۱° ۴۲' ۲۵"
۳	N ۳۱° ۳۴' ۴۵" E ۵۰° ۱۶' ۲۰"
۴	N ۳۰° ۴۶' ۹۷" E ۳۱° ۳۸' ۵۰"
۵	N ۳۲° ۱۴' ۶۳" E ۴۹° ۴۵' ۸۷"

نتایج و بحث

به منظور اطمینان از کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده و محصولات پی سی آر، نمونه ها بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. مشاهده الگوهای بانندی محصولات مشخص نمود که علاوه بر کیفیت و کمیت مناسب محصولات، ناحیه تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دقیقاً ناحیه مورد نظر در ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی نمونه های ماهیان مورد آزمایش است. بطوریکه با بررسی توالی های حاصل از محصولات PCR و انجام blasting در بانک ژن (NCBI) مشخص شد که قطعات حاصل از واکنش پی سی آر با وزن مولکولی تقریبی ۹۰۰ جفت باز دارای شباهت زیادی با ژن سیتوکروم *b* گونه های نزدیک به این ماهیان است. سپس توالی ژن های سیتوکروم *b* شناسایی شده در نمونه های مورد آزمایش به بانک جهانی ژن معرفی و به ترتیب با شماره های دستیابی ارائه شده در جدول (۳) برای اولین بار ثبت شد.

جدول ۳- نام گونه های ثبت شده و شماره دستیابی آنها

ردیف	گونه	شماره دستیابی
۱	<i>Schizocypris altidorsalis</i>	JN790240
۲	<i>Schizothorax zarudnyi</i>	JN790241
۳	<i>Barbus subquincunciatus</i>	JN790242
۴	<i>Mesopotamichthys sharpeyi</i>	JN790243
۵	<i>Barbus xanthopterus</i>	JN790244
۶	<i>Luciobarbus esocinus</i>	JN790245

نتایج آنالیز فایلوژنی به دو روش متفاوت و براساس توالی نوکلئوتیدی در بین نمونه های ایرانی زیر خانواده باربوس ماهیان و همچنین با سایر گونه های باربوس در جهان که در بانک جهانی ژن توالی سیتوکروم *b* ثبت شده داشتند، مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل ۱)

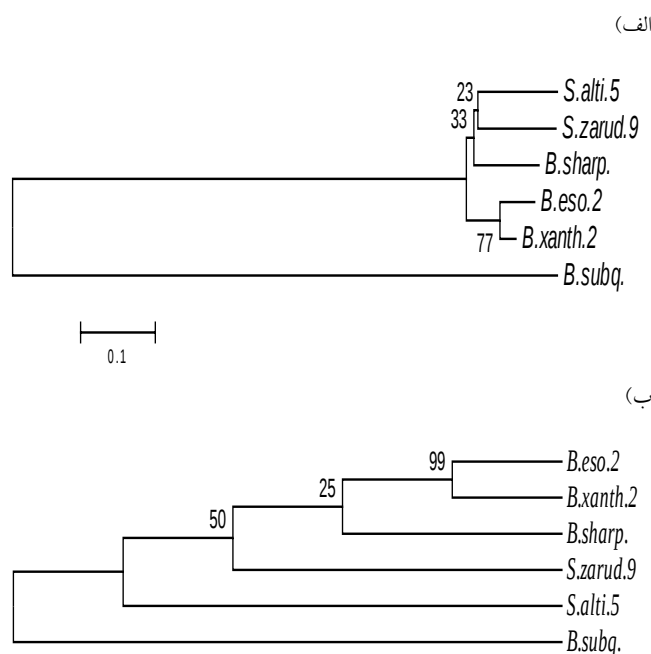
براساس دندروگرام حاصل از هر دو روش Neighbor-joining و Maximum likelihood parsimony مشخص شد که دو گونه *Schizocypris altidorsalis* و *Schizothorax zarudnyi* در ارتباط نزدیک باهم (گروه های خواهری) و هم گروه با گونه

جدول ۲- نام گونه ها و شماره دستیابی ژن سیتوکروم *b* آنها در بانک ژن

ردیف	گونه	شماره دستیابی
۱	<i>Barbus rebeli</i>	AF090791
۲	<i>Barbus prespensis</i>	AF090790
۳	<i>Barbus Cyclolepis</i>	AF090784
۴	<i>Barbus peloponnesius</i>	AF090787
۵	<i>Barbus euboicus</i>	AF090785
۶	<i>Barbus tauricus escherichii</i>	AY331036
۷	<i>Barbus borysthenicus</i>	AY331026
۸	<i>Barbus barbus</i>	AY004754
۹	<i>Barbus massaensis</i>	AF145930
۱۰	<i>Barbus sclateri</i>	AF334083
۱۱	<i>Barbus bocagei</i>	AF334067
۱۲	<i>Barbus steindachnerii</i>	AF045968
۱۳	<i>Barbus comizo</i>	AF334049
۱۴	<i>Barbodes schwanenfeldii</i>	AF180823
۱۵	<i>Onychostoma simum</i>	HM536801
۱۶	<i>Puntius snyderi</i>	AY856099
۱۷	<i>Hypsibarbus malcolmi</i>	JQ346149
۱۸	<i>Sprinibarbus denticulatus yunnanensis</i>	AF051878
۱۹	<i>Poropuntius opisthoptera</i>	HM536793
۲۰	<i>Carassius carassius</i>	FJ478014

برای مقایسه ترادف های بدست آمده^۱ ابتدا کلیه توالی های بدست آمده در نرم افزار Bioedit (Version 5.0.9; Hall 1999)، به فرمت Fasta تبدیل شدند و پس از آنکه توسط نرم افزار Mega همتراز شدند، برای رسم درخت فیلوژنی به کار گرفته شدند (Kumar et al. 2001). درخت های فیلوژنی حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* نمونه های ماهی مورد آزمایش و گونه های موجود در بانک ژن توسط روش های (Saitou and Nei 1987) neighbor-joining-1000 و parsimony-1000 maximum likelihood و براساس مدل (Tamura 1992) 3- Tamura parameter تحت نرم افزار Mega 3.1 تولید شدند (Kumar et al. 2001).

¹ Alignment



شکل ۱- (الف) دندروگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* توسط روش neighbor-joining-1000 (saitou and Nei 1987) و روش maximum likelihood parsimony-1000 (ب) براساس مدل Tamura 3- parameter (Tamura 1992) تحت نرم افزار Mega 3.1 (Kumar et al. 2001)

Barbus sharpeyi نسبت به سایر گونه‌های ایرانی دیگر قرار گرفتند. همچنین دندروگرام حاصل از مقایسه توالی ژن سیتوکروم *b* گونه‌های باربوس در سراسر جهان نشان داد (شکل ۲) که تمامی گونه‌های خانواده باربوس ماهیان موجود در کشور ایران در کلاستر جداگانه منحصر به فردی قرار گرفتند. این موضوع در حقیقت این فرضیه را تقویت می‌نماید که دگرگونی و تغییرات ایجاد شده در گونه‌های داخل ایران در طی سالیان طولانی و مستقل از سایر مناطق دیگر جهان اتفاق افتاده است.

با استفاده از نرم افزار GeneDoc و همتراز کردن توالی‌های نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* در نمونه‌های خانواده باربوس ماهیان در ایران، فرآیندهای جابجایی، حذف و اضافه شدن در هر یک از بازها بر اساس شدت رنگ مشخص شد (شکل ۳).



شکل ۲- درختان فایلوژنتیک ترسیم شده براساس توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* توسط روش الف) neighbor-joining-1000 (saitou and Nei 1987) و روش ب) maximum parsimony-1000 (ب) توسط مدل Tamura 3-parameter در نرم افزار Mega

S. zar.	: CCGAGTT-TCTTAGGATCCACCGCAGATCCCGTAGGCAAAACAGCAATATCACTCTCGTTTAAATCTGTTGGTGGGTAACCAAGCGGTTAGCG :	368
S. alti.	: CCAAGCT-TATTAGGAATAGATCGTGAATTCATAGGCGCAACAAATATCATCTCGGCTTCATATGCGAGGAGTAACCTAGGGGCTTGGCG :	367
B. shar.	: CCAAGCT-TCTTTGGGATTCATCGTGAATTCGCGTATGCCAAATAGCAAAATATCATCTCGGCTTCATATGAGGTTGAGTAACCTAGGGGCTTGGCG :	368
B. xanth.	: CCTAGCT-TATTAGGATCCATCGTGAATTCGCGTATGCCAAATAGCAAAATATCATCTCGGCTTCATATGAGGTTGAGTAACCTAGGGGCTTGGCG :	368
B. esoc.	: CCTAGCT-TCTTTGGGATTCATCGTGAATTCGCGTATGCCAAATAGCAAAATATCACTCTCGTTTAAATCTGTTGGAGGGTAACCTAGGGGCTTGGCG :	366
B. subq.	: ATCCCGCGTCCATATAGCGGATATCTGCTTCG-ATGAATCTCGGCTGG-ATT----TTCAGTACATAATCAACACTAACCACTATTCTTC :	368
B. barbus	: CTCCCGCGTACCATATATAGGAGACTACTACTCC-ATGAATCTCGGCTGG-ATT----TTCAGTACATAAACCAACTGACCACTATTCTTC :	368
	c G T A T G A AA gA t t T T t G A A G TT	
S. zar.	: GGGCTGAAGTTTCTCGGCTCTCTAGCAGGTTGGGGGAAA--ATAATCTAGTAACTAAAGGGCTACCACTTACCTACCAACCAAGTAAGTC :	460
S. alti.	: GGGCTGAAGTTTCTCGGATCCCTAACAGGTTTGGGCAAA--ATAATCAGACTAGCTGAGGCGCTACCACTATCAACCAACCAAGTAAGTC :	459
B. shar.	: GGGCTGAAGTTTCTCGGCTCTCTAGCAGGTTGGGAGAAA--ATAAGTCCAAAGAGCTGAGGCGCTAACCAATATGATTACCAACCAAGTAAGTC :	460
B. xanth.	: GGGCTGAAGTTTCTCGGCTCTCTAGCAGGTTGGGAGAAA--ATAATCTAGCACTCTGAGCGGCTACCACTATCAACCAACCAAGTAAGTC :	460
B. esoc.	: GGGCTGAAGTTTCTCGGCTCTCTAGCAGGTTGGGAGAAA--ATAATCTAGCACTCTGAGCGGCTACCACTATCAACCAACCAAGTAAGTC :	458
B. subq.	: GCATTCCACTTCTCTATTACATTTTATTTGCACTCCCAACCATTTCTAACCCTCTATTATTCACCAACAGGCTCAACCAACCAAGTAAGTC :	462
B. barbus	: GCATTTCACCTCTCTACTACATTTTATTTGCTCCCGCAACCATTTCTAATCTCTCTACCAACAGGCTCAACCAACCAAGTAAGTC :	462
	G T A TT C A A G G A A A T t t T t T C t T C g A A A C C A A G C	
S. zar.	: TTTATATGCGAAGTATCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	551
S. alti.	: TTTATATGCGAAGTATCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AGCCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	550
B. shar.	: TTTATATGCGAAGTATCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	551
B. xanth.	: TTTATATGCGAAGTATCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AGTCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	551
B. esoc.	: TTTATATGCGAAGTATCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AGTCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	549
B. subq.	: TAAAC---TCGACCGCAGACAAATTTCCCTCCACCCATACATTTCCCGATAAAGACCTGCTTGGATTCTGTAATATACTTCTAGCCCTCTTAAT :	553
B. barbus	: TAAAC---TCGACCGCAGACAAATTTCCCTCCACCCATACATTTCCCGATAAAGACCTGCTTGGATTCTGTAATATACTTCTAGCCCTCTTAAT :	553
	T t A G AA TT C A T A CC a t G T t At TeC G A A	
S. zar.	: AGATCGAGCGGTTTCTCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	641
S. alti.	: AGATCGAGCGGTTTCTCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AGCCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	640
B. shar.	: AGATCGAGCGGTTTCTCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	641
B. xanth.	: AGATCGAGCGGTTTCTCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	641
B. esoc.	: AGATCGAGCGGTTTCTCGGCTGAAGAGAGATTTTATCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	639
B. subq.	: ACTAGCATTAT--TTTCCCAAAACCTGTTAGCTGATCCAGAAACCTTTTACCCCGCCCAACCCCTAGTACCCTCCACATATTAACCCAGAA :	645
B. barbus	: ACTAGCATTAT--TTTCCCAAAACCTGTTAGCTGATCCAGAAACCTTTTACCCCGCCCAACCCCTAGTACCCTCCACATATTAACCCAGAA :	645
	A G A A TT C C T tG AA T A C AA C T t C C TA t Aa AAt	
S. zar.	: C-CACCTCAAAATTCAC-TGAAGTATCTCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	733
S. alti.	: C-CACCTCAAAATTCAC-TGAAGTATCTCTCGGCTCTGAGTTT--AGCCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	732
B. shar.	: C-CACCTCAAAATTCAC-TGAAGTATCTCTCGGCTCTGAGTTT--AACCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	733
B. xanth.	: C-CACCTCAAAATTCAC-TGAAGTATCTCTCGGCTCTGAGTTT--AGTCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	733
B. esoc.	: C-CACCTCAAAATTCAC-TGAAGTATCTCTCGGCTCTGAGTTT--AGTCCAATTGCAATGTTTCATCTCTTTTGGTCAAGGAATAGG :	731
B. subq.	: GATACCTCTTATTCGCTATGCTATTTTACGCTCCCGCAAC-AGTAGGAGCGGCTCCCGCTTACTATCTCTGATCTCTACTAATAG :	738
B. barbus	: GATACCTCTTATTCGCTATGCTATTTTACGCTCCCGCAAC-AGTAGGAGCGGCTCCCGCTTACTATCTCTGATCTCTACTAATAG :	738
	aC TC ATTc T C A T C AT A C AG G t t aTACT T C Tc A tA T G	
S. zar.	: AGCTCATCGGAGGAGCTAGCCCAAGGAGGCTTTATCTAATAGTAAATAGCAGAGAAATACCCCAATGTTTC---TTTCTTTCTAGAGATAAGA :	823
S. alti.	: TCCCTCAGCGGAGGAGCTAGCCCAAGGAGGCTTTATCTAATAGTAAATAGCAGAGAAATACCCCAATGTTTC---TTTCTTTCTAGAGGATAGA :	824
B. shar.	: TCCCTCAGCGGAGGAGCTAGCCCAAGGAGGCTTTATCTAATAGTAAATAGCAGAGAAATACCCCAATGTTTC---TTTCTTTCTAGAGGATAGA :	823
B. xanth.	: GCTCTCATCGGAGGAGCTAGCCCAAGGAGGCTTTTCTAATAGTAAATAGCAGAGAAATACCCCAATGTTTC---TTTCTTTCTAGAGGATAGA :	826
B. esoc.	: GCTCTCATCGGAGGAGCTAGCCCAAGGAGGCTTTTCTAATAGTAAATAGCAGAGAAATACCCCAATGTTTC---TTTCTTTCTAGAGGATAGA :	824
B. subq.	: TCTACCACTCTCTACACACTCAGCAACCAAGGAGGCT--TCAGATTTCCCGCAATACCCCAATTCCTGTTTGAACCTCTAGTACCACTATAAT :	830
B. barbus	: TCTACCACTCTCTACACACTCAGCAACCAAGGAGGCT--TCAGATTTCCCGCAATACCCCAATTCCTGTTTGAACCTCTAGTACCACTATAAT :	830
	c T g AC A C A A C g T AC G AA A TGTT T T g A A TA	
S. zar.	: TCCATA-TATAGGCTCCGGGCAATATG----- : 849	
S. alti.	: ACCGTA-TATAGGCTCCGGGCAATATG----- : 850	
B. shar.	: TCCATA-TATAGGCTCCGGGCAATATG----- : 850	
B. xanth.	: ACCGTA-TATAGGCTCCGGGCAATATG----- : 852	
B. esoc.	: GCGGTA-TATAGGCTCCGGGCAATATG----- : 850	
B. subq.	: ATGCTAACATCGATGGAGGTATACCACTAGAACACCCCTT : 870	
B. barbus	: ATGCTAACATCGATGGAGGTATACCACTAGAACACCCCTT : 870	
	C TA at c ggG A	

شکل ۳- چیدمان توالی نوکلئوتیدی ژن ژن سیتوکروم *b* گونه‌های باربوس موجود در ایران با استفاده از نرم افزارهای CLUSTAL X و GeneDoc.

های مورد بررسی براساس تشابه توالی ناحیه مورد بررسی (جدول ۴) نشان داد که بیشترین تشابه بین *Schizothorax zarudnyi* و *Schizocypris altidorsalis* و کمترین تشابه بین *Schizocypris altidorsalis* و *B. subquincatus* وجود دارد.

بطوریکه در شکل ۴ هر چه شدت رنگ بیشتر باشد نشان دهنده حفاظت بیشتر آن نوکلئوتید در ناحیه مورد نظر است. از بین ۸۵۰ نوکلئوتید مورد بررسی ۱۵۴ عدد (۱۸/۱۱ درصد) از آنها در طول ناحیه مورد بررسی کاملاً حفاظت شده بودند. درصد تشابه نمونه-

مستقل از گونه‌های اروپای مرکزی هستند که احتمالاً بدلیل توانایی کم پراکنده شدن ماهیان آب شیرین اولیه اروپایی بوده است. در تحقیق حاضر نیز واگرایی باربوس ماهیان ایران از سایر گونه‌های باربوس ماهیان ممکن است بدلیل عدم توانایی گسترش جغرافیایی ماهیان آب شیرین اولیه ایران باشد.

با توجه به نتایج حاصله در این تحقیق نشان داده شد که گونه های *Schizothorax zarudnyi* و *Schizocypris altidorsalis* در ارتباط نزدیکی با باربوس‌ها هستند و پیشنهاد می‌شود تا مطالعه کاملی بر روی تمامی گونه‌های باربوس ماهیان ایران به منظور بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی بین آنها انجام شود تا اطلاعات دقیقی از وضعیت جمعیتی و اکولوژیکی آنها بدست آید. در نهایت این تحقیق می‌تواند به مسئولین شیلاتی و محیط زیستی کمک می‌نماید تا در حفظ و احیای جمعیت گونه‌های منحصر به فرد روش‌های صحیح مدیریتی را برگزینند و همچنین چنانچه به وجود گونه‌های دو رگه جدیدی جهت پرورش در استخرهای خاکی مورد نیاز باشد با استفاده از گونه‌های بومی نزدیک به هم این امر صورت پذیرد.

منابع

- Abdoli A (2000) The Inland Water Fishes of Iran, Tehran. Iranian Museum of Nature and Wildlife 378. (In Farsi).
- Annandale N, Hora SL (1920) The fish of Seistan. Aquatic Fauna of Seistan. Records of the Indian Museum 18: 150-253.
- Aparicio E, Sostoa A (1998) Reproduction and growth of *Barbus haasi* in a small stream in the N.E. of the Iberian Peninsula. Archiv Für Hydrobiologie 142: 95-110.
- Awise JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution 511.
- CWilson A, Cann R, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helmbychowiski KM (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionaiy genetics. Biological Journal of the Linnean Society 26: 375-400.
- Callejas C, Ochando MD (2000) Recent radiation of Iberian barbel fish (Teleostei, Cyprinidae) inferred from cytochrome b genes. Journal of Heredity 91: 231-238.
- Carus RR, Alcocer MU (2003) Phylogenetic assessment of *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri*, and *Diapterus auratus* (Pisces: Gerreidae) based on allozyme and mtDNA analyses. Caribbean Journal of Science 39: 109-115.
- Chen ZM, Chen YF (2001) Phylogeny of the specialized schizothoracine fishes (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). Zoological Studies 40: 147-157.

جدول ۴- درصد شباهت حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم *b* در گونه‌های خانواده باربوس ماهیان در ایران

	B.eso.	B.xanth.	S.alti.	B.sharp.	S.zarud.
B.eso.					
B.xanth.	۰/۷۷				
S.alti.	۰/۸۱	۰/۶۸			
B.sharp.	۰/۷۵	۰/۷۶	۰/۷۱		
S.zarud.	۰/۸۰	۰/۶۳	۰/۸۹	۰/۸۲	
B.subq.	۰/۵۴	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۶۸	۰/۶۵

تنوع ژنتیکی باربوس‌های استان خوزستان با استفاده از ژنوم میتوکندریایی mtDNA به روش PCR-RFLP نشان داد که دو گونه *B. grypys* و *B. sharpeyi* و دو گونه *B. xanthopterus* و *B. pectoralis* خویشاوندی زیادی با هم دارند و در کل این چهار گونه با هم قرابت زیادی داشتند (Fayazi 1385) که نتایج این تحقیق نیز این یافته را تایید می‌کند.

بررسی روابط ژنتیکی ۲۴ جمعیت باربوس ماهیان بر اساس توالی ژن سیتوکروم *b* در ایتالیا و ناحیه آدریاتیک نشان داد که سه گونه *Barbus caninus*, *B. petenyi*, *B. rebeli* نسبت به سایر گونه‌ها متحمل بیشترین دگرگونی ژنتیکی بوده‌اند که نیازمند حفاظت و مدیریت جداگانه هستند (Tsigenopoulos et al. 2002).

Habib et al. (2011) تنوع ژنتیکی گونه *Channa muralius* را در رودخانه‌های Teesta, Muhanandi, Yamuna بنگلادش براساس توالی ژن سیتوکروم *b* مورد بررسی قرار دادند و توانستند جمعیت های جداگانه‌ای از این گونه را در رودخانه‌های مذکور مشخص نمایند که نشان‌دهنده حساسیت بالای روش ارزیابی مستقیم توالی های ژنتیکی است.

بر اساس بررسی رابطه فیلوژنتیک ۱۰۶ گونه از کپور ماهیان اروپایی با استفاده از ژن Cyt b، نظریه کلاسیک جغرافیای زیستی کپور ماهیان اروپایی مبنی بر پراکندگی (تجزیه) فون کپور ماهیان از اروپای مرکزی به اروپای جنوبی و آفریقای شمالی در دوران میوسن رد شد و قرابت نژادی نزدیک بین برخی گونه‌های کپور ماهیان بومی قفقاز و یونان مانند *B. capito* و *B. graecus*، *Leuciscus keadicus* و *brachycephalus* به اثبات رسید (Zardoy et al. 1999). این محققین دریافتند که براساس شواهد مولکولی جمعیت گونه‌های مدیترانه

- Coad BW (1992) Freshwater fishes of Iran. A checklist and bibliography. Ichthyology Section. Canadian Museum of Nature Ottawa, Ontario, Canada 66 .
- Coad BW (1998) Systematic biodiversity in the freshwater fishes of Iran 65: 101-108 .
- Delin Q, Taiping L, Xinquan Z, Songchang G, Junxiang L (2006) Mitochondrial cytochrome b Sequence Variation and Phylogenetics of the Highly Specialized Schizothoracine Fishes (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibet Plateau. *Biochemical Genetics* 44: 270-285 .
- Doadrio I (1990) Phylogenetic relationships and classification of western palaearctic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquatic Living Resources* 3: 265-282 .
- Durand JD, Tsigenopoulos CS, Unlu E, Berrebi P (2002) Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the middle east inferred from cytochrome b DNA-evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 91-100 .
- Encina L, Granado C (1998) Multivariate analysis of some morphometric characters in the genus *Barbus* (Pisces, Cyprinidae). *Folia Zoologica* 37: 273-288 .
- Encina L, Lorencio GC (1988) Multivariate analysis of some morphometric characters in the genus *Barbus* (Pisces, Cyprinidae). *Folia Zoologica* 37: 273-288 .
- Encina L, Lorencio GC (1997) Food habits and food resource partitioning in three coexisting *Barbus* species. *Folia Zoologica* 46: 325-336 .
- Fayazi J, Rahimi Mianchi GA, Moradi Shahre Babak M, Galle Dari H, Miraei Ashtiani SR (2006) Genetic diversity investigation in *barbus* Spp of khozestan, using RFLP-PCR analysis of Mitochondrial DNA. University of Tehran, Iran. (In Farsi)
- Gharaei A, Abdolali. Rahdari, Ghaffari M (2011) Induced Spawning of *Schizothorax zarudnyi* (Cyprinidae) By Using Synthetic Hormones (Ovaprim and HCG). *Fish and Marine Sciences* 6: 518-522 .
- Habib M, Lakra WS, Mohindra V, Khare P, Barman AS, Singh A, Khan AA (2011) Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Molecular Biology Reports* 38: 841-846 .
- 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 .
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, AZ .
- McVeigh HP, Davidson WS (1991) A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Fish Biology* 39: 277-28 .
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*, 4th ed John Wiley and Song, Inc 141-622 .
- Nikolskii GV (1961) *Special ichthyology* translated to English in 1961.
- Rahdari A, Gharaei A, Ghaffari M (2011) Investigation on artificial breeding of the Sistan snow trout (*Schizothorax zarudnyi*) using synthetic hormon. University of Zabol, Iran (In Farsi).
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425 .
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL* 1:549-613 .
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687 .
- Tenorio CG, Rodríguez EU, Uribe AM, Díaz JP (2010) Phylogenetic relationships among five marine Catfish species (Pisces: Ariidae) from Mexico. *Hidrobiológica* 20: 266-274 .
- Tsigenopoulos CS, Berrebi P (2000) Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 165-179 .
- Tsigenopoulos CS, Karakousis Y, Berrebi P (1999) The North Mediterranean *Barbus* lineage: phylogenetic hypotheses and taxonomic implications based on allozyme data. *Journal of Fish Biology* 54: 267-286 .
- Tsigenopoulos SS, Kotlík P, Berrebi P (2002) Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 83-99
- Wang JP, Lin H, Huang S, Pan C, Chen X, Chiang T (2004) Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1143-1156
- Zardoya R, Doadrio I (1999) Molecular Evidence on the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49: 227-237.
- Zhu F, Shao Z, Zhao N, May B, Chang J (2002) Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*): estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Applied Ichthyology* 18: 301-306.