



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۹۴

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تهیه بارکد ژنتیکی گونه *Chondrostoma regium* (Hechel, 1843) در

رودخانه‌های کارون و سیروان

عافیة سقلی^۱، ایرج هاشم‌زاده سقرلو^{۲*}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین،

دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۲ استادیار گروه شیلات و محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۸/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۸

چکیده

در این مطالعه تعداد ۱۳ نمونه ماهی *C. regium* از رودخانه‌های سیروان، ارمند، ماربر، شلمزار و کوهرنگ در منطقه زاگرس نسبت به سایر گونه‌های جنس *Chondrostoma* و دیگر گونه‌های زیر خانواده *Leuciscinae* مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۹ هاپلوتایپ به طول ۶۵۲ نوکلئوتید از نمونه‌های مورد مطالعه به‌دست آمد. نتایج نشان داد که جمعیت *C. regium* مربوط به حوزه کارون هم‌تبار (مونوفایلیک) بوده و در مقایسه با افراد هم‌گونه خود در رودخانه لیل در کرمانشاه تفاوت دارند و بیشترین فاصله ژنتیکی در بین هاپلوتایپ‌های مربوط به رودخانه‌های لیل-ارمند و سیروان-ماربر ۰/۸ درصد است. زمان جدایی یا انشقاق گونه‌های *C. kinzelbachi*، *C. nasus* با *C. regium* در حدود ۲ تا ۳ میلیون سال و گونه *C. lemmingii* با *C. regium* در حدود ۱۶ میلیون سال محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی: *C. regium*، ژن COI، هاپلوتایپ

*مسئول مکاتبه: ihashem@nres.sku.ac.ir

مقدمه

اعمال مدیریت صحیح ذخایر آبزیان و توسعه آبی‌پروری زمانی موفقیت‌آمیز است که در مبحث ذخایر ژنی گونه‌های بومی مطالعاتی انجام شده باشد و به همین منظور تشخیص صحیح گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا نژادها برای مدیریت شیلاتی از اهمیت زیادی برخوردار است (Jahangiri et al., 2013). کپورماهیان بزرگ‌ترین گروه ماهیان اروپایی- آسیایی‌اند که در مورد ساختار ژنتیکی این خانواده مطالعات زیادی مطالعاتی انجام شده است (Durand et al., 2002). جنس *Chondrostoma* از خانواده کپورماهیان و زیر خانواده Leuciscinae است (Robalo et al., 2005)، که از ۲۶ گونه معرفی شده، دو گونه *C. regium* و *C. cyri* در ایران شناخته شده است (Elvira, 1997; Coad, 2011). *C. regium* یک گونه بنتوپلاژیک است و در آب‌های راکد و سیلابی زیست می‌کند (Kiani et al., 2012) این گونه در قاره آسیا پراکنش دارد و یک گونه بومی در ایران، ترکیه و سوریه محسوب می‌شود (Erguden Alagoz et al., 2010) گونه *C. regium* در ایران دارای پراکنش زیادی است اما اطلاعات زیست‌شناسی در مورد این گونه در ایران کم است (Ghanbary et al., 2013). در ایران در حوضه رودخانه دجله و در سرچشمه رودخانه‌های کرمانشاه، رودخانه مارون، در مرداب بزرگ هورا، رودخانه بازفت، کوه‌رنگ و در رودخانه زاینده‌رود در حوضه اصفهان پراکنش دارند (Abdoli, 2000). مطالعاتی در مورد جنس *Chondrostoma* و گونه‌های بومی دیگر در رودخانه‌های حوضه مدیترانه، از اسپانیا تا ترکیه، با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی سیتوکروم *b* انجام شده است (Durand et al., 2003). مطالعات رده‌بندی خانواده کپورماهیان و گونه‌های وابسته و روابط درون‌گونه‌ای آن‌ها بیشتر مبتنی بر خصوصیات ظاهری بوده است، ولی امروزه داده‌های مولکولی به‌طور گسترده برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه مطالعات ریخت‌شناسی، استخوان‌شناسی، اکولوژیکی و ژنتیکی موجب توسعه و تکمیل اطلاعات در مورد این جنس شده است. در مطالعات مولکولی در مورد کپورماهیان در اروپا و شبه‌جزیره ایبریا با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم *b* مشخص شده است که گونه‌های جنس *Chondrostoma* با گونه‌های جنس *Rutilus* رابطه نزدیکی دارند (Zardoya and Doadrio, 1998 & 1999). بر اساس مطالعات قبلی هکل (Heckel, 1843) گونه *C. regium* و *C. nasus* به‌عنوان یک تبار از گونه‌هایی که پراکنش گسترده‌ای دارند، طبقه‌بندی شده است (Coad, 2011). برپایه مطالعات (Doadrio and Carmona, 2004) روابط تکامل نژادی و جغرافیای زیستی ۲۸ گونه از جنس *Chondrostoma* با استفاده از ژن سیتوکروم *b* در شبه جزیره ایبریا مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد گونه‌های مختلف جنس *Chondrostoma* از هفت دودمان مختلف انشقاق یافته‌اند. جدایی *Chondrostoma* از دودمان اصلی در دوران میوسن میانی در حدود ۱۱ میلیون سال پیش اتفاق افتاده است (Doadrio and Carmona, 2004) که این مطالعات توسط محققان بعدی مورد تأیید قرار گرفته است (Coad, 2011).

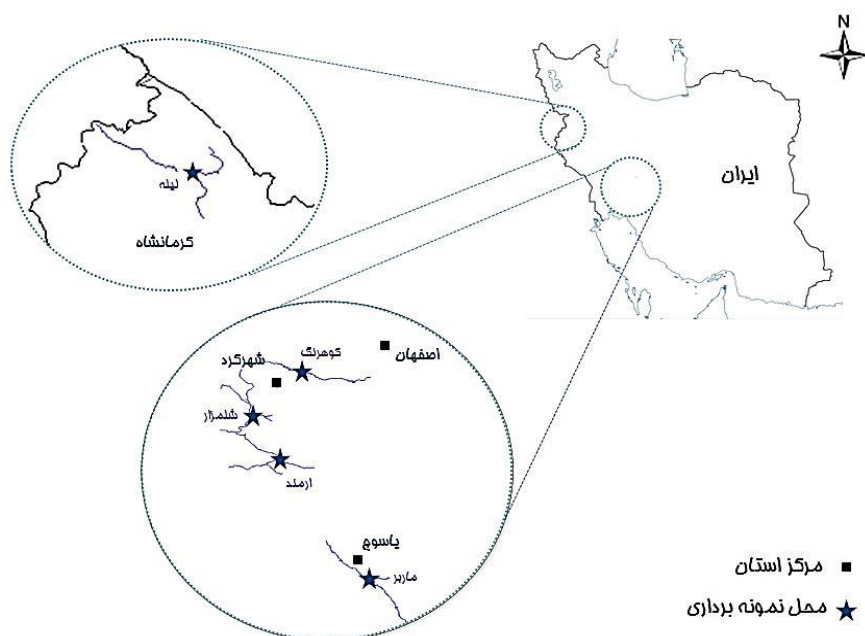
در این بررسی روابط شجره‌شناسی و خویشاوندی *C. regium* در رودخانه‌های ماربر، شلمزار، کوهرنگ و ارمند از زیر شاخه‌های رودخانه کارون و رودخانه ليله در جوانرود (استان کرمانشاه) نسبت به سایر گونه‌های جنس *Chondrostoma* و دیگر گونه‌های زیر خانواده Leuciscinae مورد بررسی قرار گرفت. یکی از روش‌های جدید برای شناسایی گونه‌ها استفاده از توالی‌های بارکد DNA است که امروزه استفاده از آن در حال گسترش است (Hebert et al., 2003). بارکدهای DNA منطقه کوچکی در ژنوم میتوکندریایی هستند که به‌منظور شناسایی گونه‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nassiri and Mahdavi, 2011). ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ (COI) برای مطالعات جمعیت گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای اندازه‌ای با طول ۶۴۸ جفت‌باز است (Hashemzadeh et al., 2013). هدف از تهیه توالی‌های بارکد DNA بهبود شناسایی گونه‌ها و معرفی گونه‌های جدید از طریق مطالعه الگوهای تمایز توالی در یک منطقه استاندارد در ژنوم است. انجام کار شجره‌شناسی بر روی جنس *Chondrostoma* امری ضروری است، زیرا به علت از دست رفتن زیستگاه، آلودگی، معرفی گونه‌های غیربومی و دورگیری در میان گونه‌های دیگر، در حال انقراض می‌باشند (Doadrio and Carmona, 2004). گونه *C. regium* یکی از گونه‌های در خطر انقراض در ترکیه است (Fricke et al., 2007) و تاکنون هیچ گونه مطالعه در مورد توالی ژن COI در مورد گونه *C. regium* انجام نشده است. هدف از این بررسی تعیین روابط شجره‌شناسی و خویشاوندی *C. regium* با دیگر گونه‌های *Chondrostoma* و گونه‌هایی از خانواده Cyprinidae است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گونه *C. regium* در سال ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ در حوضه‌های کارون و سیروان با استفاده از الکتروشوکر با ولتاژ ۲۲۰ ولت انجام شد (شکل ۱ و جدول ۱).

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری گونه *C. regium*

محل نمونه‌برداری	استان	تعداد نمونه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	تاریخ نمونه‌برداری
رودخانه شلمزار	چهارمحال و بختیاری	۳	۳۲:۰۵:۲۳	۵۰:۳۹:۵۹	۱۳۸۹/۵/۲۸
رودخانه ماربر	کهگیلویه و بویراحمد	۱	۳۰:۵۶:۲۵	۵۱:۳۷:۱۴	۱۳۸۹/۵/۳۱
کوهرنگ	چهارمحال و بختیاری	۲	۳۲:۲۶:۱۶	۵۱:۰۲:۱۶	۱۳۸۹/۵/۲۹
رودخانه ارمند	چهارمحال و بختیاری	۲	۳۱:۴۱:۰۸	۵۰:۵۲:۵۳	۱۳۸۹/۵/۳۰
رودخانه ليله	کرمانشاه	۵	۳۴:۵۱:۵۷	۴۶:۲۰:۱۶	۱۳۹۰/۳/۰۶



شکل ۱- محل نمونه‌برداری گونه *C. regium*

رودخانه‌های ارمند، کوه‌رنگ، ماربر و شلمزار جزء رودخانه‌های کارون شمالی محسوب می‌شوند. مساحت حوضه آبخیز کارون شمالی ۱۴۴۷۶ کیلومترمربع است که در حدود ۲۳ درصد از کل مساحت حوضه آبخیز کارون بزرگ تا ایستگاه خرمشهر که قسمت‌های عمده‌ای از استان چهارمحال و بختیاری و قسمت کوچکی از استان اصفهان در آن قرار دارد را شامل می‌شود (Sadaei and Solaimani, 2012). رودخانه لیل در محدوده جغرافیایی غرب کشور، در دامنه غرب و جنوب غربی سلسله جبال زاگرس در استان کرمانشاه واقع شده است و جزء حوضه دجله محسوب می‌گردد و به رودخانه بزرگ سیروان می‌ریزد و در خاک عراق به رود دیاله می‌پیوندد (Yamaani, 2007).

در زمان نمونه‌برداری باله سینه‌ای سمت راست ماهیان قطع و در الکل اتانل ۹۶ درصد تثبیت شده و برای انجام آزمایش‌های بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها برای مطالعه ژنتیکی تا زمان استخراج DNA در فریزر دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، زیرا در دمای معمولی محتوای DNA نمونه‌های تثبیت شده در الکل نیز پس از مدتی تخریب می‌شوند.

جدول ۲- اسامی گونه‌های مورد مطالعه، زیر خانواده‌ها، شماره دسترسی در بانک ژن (NCBI)			
شماره (بانک ژن)	گونه	شماره (بانک ژن)	گونه
DQ536424	<i>Gila robusta</i>	AP009305	<i>Abramis brama</i>
KJ553381	<i>Iberochondrostoma almacai</i>	AB239593	<i>Alburnus alburnus</i>
JX573111	<i>Leuciscus waleckii</i>	KF534726	<i>A. Chalcoides</i>
AP010779	<i>Mylocheilus caurinus</i>	AP009304	<i>Blicca bjoerkna</i>
AB127393	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	KJ552825	<i>C. beysehirense</i>
AB239597	<i>Pelecus cultratus</i>	HM560292	<i>C. genei</i>
HM560287	<i>Phoxinellus dalmaticus</i>	KJ553066	<i>C. holmwoodii</i>
JN028211	<i>Phoxinus eos</i>	KJ553200	<i>C. kinzelbachi</i>
AP009061	<i>Phoxinus perenurus</i>	KJ552799	<i>C. knerii</i>
KJ554200	<i>Rutilus rubilio</i>	HM560267	<i>C. lemmingii</i>
KC354967	<i>Rutilus rutilus</i>	HM989722	<i>C. miegii</i>
HQ600767	<i>Rutilus prespensis</i>	HQ960429	<i>C. nasus</i>
KC354967	<i>Rutilus rutilus</i>	KJ552824	<i>C. ohridanus</i>
HM560375	<i>Telestes sp</i>	HM560257	<i>C. phoxinus</i>
KC355018	<i>Squalidus cephalus</i>	HQ600708	<i>C. prespense</i>
AB626854	<i>Tribolodon brandtii</i>	KJ552873	<i>C. soetta</i>
		HQ600710	<i>C. vardarensis</i>

استخراج DNA با استفاده از روش کیلاکس (Chelex 100) صورت گرفت (Estoup et al. 1996) در این تحقیق جهت تکثیر ژن *COI* از پرایمرهای (5'-AACCTCTCTGTCTTCGGGGCTA-3' و (3'-TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG-5') استفاده شد (Hashemzadeh et al., 2014). برای واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر از ۱۸ میکرو لیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرو لیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرو لیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرو لیتر محلول ۱۰ میلی مولار از هر آغازگر، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP ۲۵ میلی مولار، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم بیوتگ، ۲ میکرو لیتر DNA استفاده شد. چرخه دمایی PCR در این آزمایش شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بود (Hashemzadeh et al., 2014). یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۰۴۰ جفت باز در طی واکنش PCR تکثیر شد و توالی انتهای 5' ژن *COI* به وسیله دستگاه ABI 3100 تعیین شد.

برای انجام تعیین توالی از آغازگر *FCOI20* استفاده شد و توالی‌های به دست آمده با توجه به فایل‌های کروماتوگرام و توالی‌های مشابه در بانک ژن مقایسه و در صورت وجود ابهام ویرایش شدند. با توجه به این که ژن مورد مطالعه از ژن‌های کدکننده و مؤلف است، معمولاً تنها جهش‌هایی در توالی آن حفظ می‌شوند که توالی آمینواسیدهای کدشده توسط ژن را تغییر ندهند. در صورت مشاهده

تغییرات یادشده ممکن است بتوان یکی از علل آن را به خطا در تکثیر ژن در آزمایشگاه نسبت داد، اما در مورد توالی‌های به‌دست آمده چنین موردی ملاحظه نشد. مقدار فاصله ژنتیکی K2P (Kimura, 1980) در بین گونه‌های جنس *Chondrostoma* و سایر گونه‌های کپور ماهیان با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 محاسبه شد. برای ترسیم درخت شجره‌شناسی در نرم‌افزار MEGA از روش اتصال مجاور (Neighbor-Joining) با آزمون بوترپ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. برای تعیین تفاوت هاپلوتایپ‌های گونه‌های مورد بررسی، شبکه هاپلوتایپی با استفاده از نرم‌افزار TCS 2.1 ترسیم شد.

نتایج و بحث

در مجموع ۹ هاپلوتایپ (۵ هاپلوتایپ در رودخانه ليله، یک هاپلوتایپ برای ارمند، ۲ هاپلوتایپ برای شلمزار و برای ۳ نمونه از کوه‌رنگ و ماربر، تنها یک هاپلوتایپ) به‌دست آمد (جدول ۳ و شکل ۲).

جدول ۳- فاصله ژنتیکی (به صورت درصد) در بین گونه‌های مورد مطالعه براساس تمایز توالی ژن COI با استفاده از مدل K₂P در نرم‌افزار MEGA6

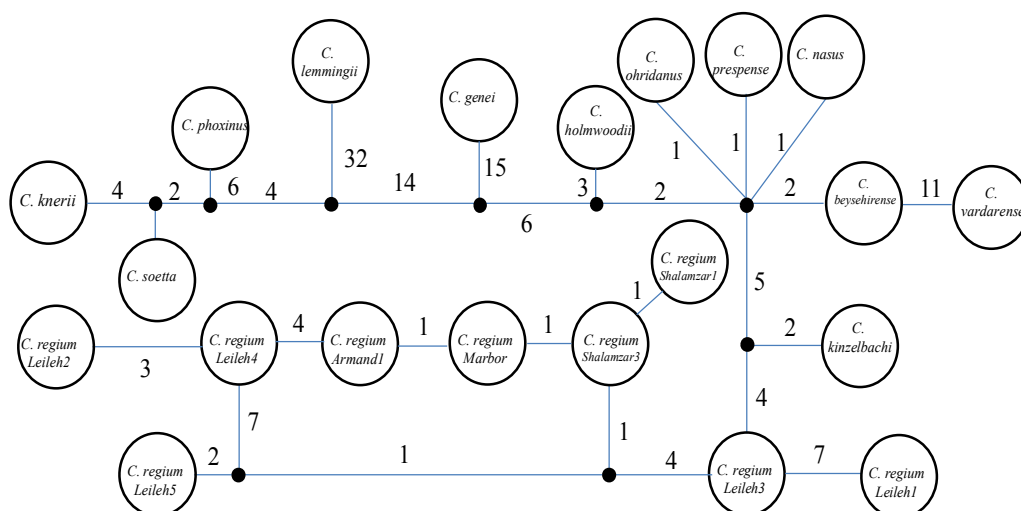
گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
(۱) <i>C. regium_armand</i>									
(۲) <i>C. kinzelbachi</i>	۱/۶								
(۳) <i>C. lemmingii</i>	۸/۶	۸/۰							
(۴) <i>C. nasus</i>	۱/۶	۱/۳	۸/۰						
(۵) <i>C. regium_Kohrang</i>	۰/۲	۱/۴	۸/۴	۱/۴					
(۶) <i>C. regium_Leileh</i>	۰/۸	۱/۲	۸/۱	۱/۶	۰/۷				
(۷) <i>C. regium_Marber</i>	۰/۱	۱/۵	۸/۵	۱/۵	۰/۱	۰/۸			
(۸) <i>R. rutilus</i>	۸/۰	۸/۳	۱۱/۸	۷/۴	۷/۸	۸/۲	۷/۹		
(۹) <i>C. regium_Shalamzar</i>	۰/۳	۱/۴	۸/۴	۱/۴	۰/۱	۰/۷	۰/۲	۷/۸	
(۱۰) <i>Telestes sp.</i>	۶/۶	۶/۹	۱۰/۱	۶/۳	۶/۶	۶/۶	۶/۷	۸/۹	۶/۶

میانگین فاصله ژنتیکی درون جمعیتی برای نمونه‌های رودخانه ارمند و کوه‌رنگ ۰/۲ درصد، برای نمونه‌های ماربر ۰/۳ درصد و برای نمونه‌های رودخانه شلمزار ۰/۱ درصد بود. همچنین کمترین میانگین فاصله ژنتیکی بین جمعیتی مربوط به جمعیت‌های شلمزار و جمعیت‌های کوه‌رنگ برابر ۰/۱ درصد و بیشترین میانگین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های رودخانه ليله با رودخانه ارمند برابر ۰/۸ درصد بود.

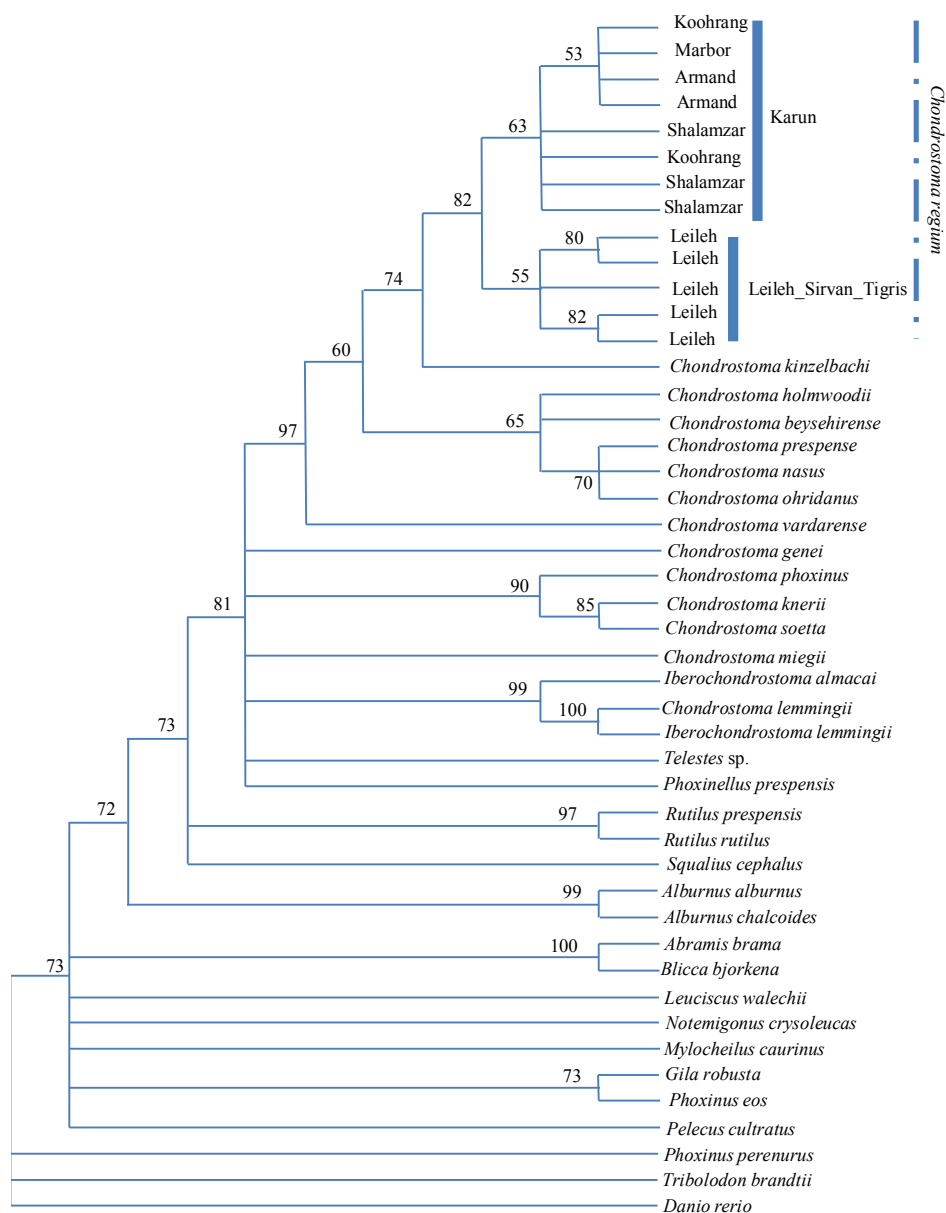
تهیه بارکد ژنتیکی گونه *Chondrostoma regium* (Hechel, 1843) در...

جدول ۴- اختلاف در جایگاه نوکلئوتیدهای گونه *C. regium* شماره‌های ارائه شده در ردیف اول جدول نشان‌دهنده شماره جایگاه‌ها است

شماره نوکلئوتید	۳۹	۱۴۷	۱۹۵	۲۳۱	۲۹۱	۳۰۶	۳۳۶	۶۰۳
توالی مرجع	G	A	G	G	G	G	T	C
۱ Armand	.	.	.	.	.	.	.	.
۱ Leileh	A	G	A	A	A	C	.	.
۲ Leileh	A	G	.	A	A	.	.	.
۳ Leileh	A	G	A	A	A	C	.	.
۴ Leileh	A	G	.	A	A	.	.	.
۵ Leileh	A	G	A	A	A	.	C	.
Marber	.	.	A	.	.	.	.	.
۱ Shalamzar	A	.	A	.	.	.	.	T
۳ Shalamzar	A	.	A	.	.	.	.	.



شکل ۲- شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده برای ژن COI ماهیان مورد مطالعه. اعداد موجود در کنار خطوط نشان‌دهنده تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت (جهش) در بین هاپلوتایپ‌ها است.



شکل ۳- دارنگاره ترسیم‌شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 به روش Neighbor-Joining برای توالی‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه و توالی‌های موجود در بانک ژن. اعداد درج شده در محل گره‌های دارنگاه مقادیر Bootstrap محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار هستند.

کمترین فاصله ژنتیکی در بین رودخانه‌های مورد بررسی مربوط به جمعیت‌های *C. regium* در رودخانه ارمند-ماربر و کوه‌رنگ-ماربر و شلمزار-کوه‌رنگ، برابر با ۰/۱ درصد است و همچنین بیشترین میزان فاصله برای جمعیت‌های ارمند-لیله و ماربر-لیله برابر ۰/۸ درصد بود. براین اساس می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های مورد مطالعه در ابتدا دارای یک منشاء بوده‌اند که در جمعیت‌های رودخانه لیله در استان کرمانشاه با توجه به جدایی جغرافیایی و عدم ارتباط ژنتیکی با جمعیت‌های حوضه کارون به مرور زمان تغییراتی در خزانه ژنی آن‌ها پدیدار گشته که این عوامل موجب جدایی جمعیت آن‌ها از جمعیت‌های حوضه کارون شده است. نمونه‌هایی که در رودخانه‌های حوضه کارون قرار دارند فاصله ژنتیکی کمتری نسبت به رودخانه لیله در استان کرمانشاه دارند. در نمونه‌های مربوط به حوضه کارون کمترین فاصله ژنتیکی براساس روش K_2P مربوط به رودخانه‌های شلمزار-کوه‌رنگ با ۰/۱ درصد، ارمند-ماربر، کوه‌رنگ-ماربر و بیشترین فاصله ژنتیکی در این حوضه مربوط به نمونه‌های رودخانه‌های شلمزار-ارمند با ۰/۳ درصد است. مقدار فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد نظر در این مطالعه و گونه‌های بانک ژن در جدول ۲ ارائه شده است که بر اساس آن کمترین فاصله ژنتیکی گونه مورد مطالعه با گونه‌های بانک ژن مربوط به هاپلوتایپ *C. kinzelbachi* نسبت به هاپلوتایپ‌های رودخانه لیله ۱/۲ درصد بوده و بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به گونه *C. lemmingii* نسبت به نمونه رودخانه ماربر ۸/۵ درصد است. همچنین فاصله ژنتیکی گونه *C. nasus* با نمونه رودخانه لیله با ۱/۶ درصد و *Telestes sp.* با نمونه ماربر با ۶/۷ درصد و فاصله گونه *Rutilus rutilus* با نمونه رودخانه لیله ۸/۲ درصد است.

در دارنگاه ترسیم شده به روش Neighbor-Joining هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در مناطق مورد مطالعه را می‌توان در دو خوشه خاوه‌ری تقسیم‌بندی نمود که در آن هاپلوتایپ‌های مربوط به حوضه کارون در یک گروه و هاپلوتایپ‌های مربوط رودخانه سیروان (لیله) در خوشه دیگر قرار می‌گیرند. گروه‌های یادشده با ضریب بوسترپ نسبتاً بالا (۸۲٪) تأیید می‌شوند. در فاصله‌های ژنتیکی محاسبه شده نیز می‌توان این گروه‌بندی را ملاحظه نمود. وجود فاصله ژنتیکی بیشتر در بین گروه‌های یادشده را می‌توان به فاصله جغرافیایی و در نتیجه جدایی جمعیت‌های رودخانه سیروان و حوضه رودخانه کارون نسبت داد، به این مفهوم که در طی زمان و به واسطه زیستن در شرایط محیطی متفاوت جمعیت‌های مورد مطالعه از هم تمایز حاصل کرده و هاپلوتایپ‌های متفاوتی را ایجاد کرده‌اند. در مجموع باید در رابطه با تفسیر اطلاعات دقت کرد، زیرا احتمال خطا نیز وجود دارد اما با توجه به الگوهای مشاهده شده توصیه می‌شود در نقاط مورد مطالعه، بررسی‌های دقیق‌تر با سایر نشانگرها به‌ویژه نشانگرهای هسته‌ای انجام شود.

محققان با توجه به داده‌های فسیلی به‌دست‌آمده و بررسی ژن *Cytb*، ضریب ساعت مولکولی ۰/۵۲ درصد را برای گونه‌های جنس *Capoeta* به‌دست آورده‌اند (Levin et al., 2012). همچنین ضریب ۰/۷۶ برای ژن سیتوکروم b گزارش شده است (Zardoya and Doadrio, 1999). با توجه به ضریب ساعت مولکولی ۰/۵۲ درصد، زمان جدایی یا انشقاق گونه‌های *C. kinzelbachi*، *C. nasus* با *C. regium* در حدود ۲ تا ۳ میلیون سال و گونه *C. lemmingii* با *C. regium* در حدود ۱۶ میلیون سال محاسبه شد. با توجه به این ضریب، انشقاق سایر گونه‌های مورد مطالعه، در این فاصله زمانی بوده است. همچنین با توجه به دارنگاره ترسیم شده (شکل ۳)، گونه‌های این جنس، در خوشه‌ای جداگانه از گونه‌های مورد مطالعه از کپورماهیان قرار گرفته است و گونه *C. regium* با گونه *C. kinzelbachi* در یک خوشه قرار گرفته و به‌عنوان نزدیک‌ترین گونه، به گونه *C. regium* با ضریب بوسترپ ۷۴ درصد در دارنگاه Neighbor-Joining محسوب می‌شود. همچنین گونه *C. lemmingii* در دارنگاه ترسیم شده نسبت به سایر گونه‌های جنس *Chondrostoma* به‌عنوان خوشه‌ای پایه (اجدادی) محسوب می‌شود.

در جنس *Chondrostoma* تنها گونه *C. lemmingii* فاقد لایه شاخی در لب پایین است و این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پیدایش لایه شاخی شکل در سایر اعضای این جنس که در این مقاله مورد توجه قرار گرفته‌اند، به‌صورت یک صفت هم جد (مونوفایلیک) بوده و شاید همین فرآیند از نظر اکولوژیک موجب جدایی اکولوژیک و تمایز گونه‌های بعدی شده است. از ۲۰ گونه معرفی‌شده برای این جنس تمامی گونه‌ها در قاره آسیا یا اروپا پراکنش دارند که این توزیع غیر یکنواخت گونه‌ها و عدم حضور آن‌ها در قاره آمریکا و آفریقا را می‌توان به این مفهوم دانست که این گونه‌ها پس از جدایی قاره آمریکا، در اوراسیا به وجود آمده‌اند و به دلیل آنکه محدود به آب‌های شیرین هستند، موفق به مهاجرت به قاره آفریقا و آمریکا نشده‌اند. در این بررسی همچنین در جدول فاصله ژنتیکی گونه *C. regium* به غیر از گونه‌های جنس *Chondrostoma* با دو گونه *Rutilus rutilus* و *Telestes sp.* که متعلق به زیرخانواده Leuciscinae هستند مورد بررسی قرار گرفت که جنس *Telestes* دارای کمترین فاصله نسبت سایر گونه‌های متعلق به زیر خانواده Leuciscinae بود، که این موضوع در دارنگاه نیز قابل مشاهده است (شکل ۳) و گونه‌های *Rutilus*، *Abramis*، *Alburnus* و *Blicca* نسبت به این گونه دارای فاصله بیشتری هستند که با نتایج مطالعات قبلی (Zardoya and Doadrio, 1999) مشابه است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که نگارندگان از حمایت‌های یادشده قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Abdoli A. 2000. The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. 378 P. (In Persian).
- Coad B.W. 2011. Freshwater fishes of Iran. [Cited June 2016]. Available from www.braincoad.com.
- Doadrio I., Carmona J.A. 2004. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 802-815.
- Durand J.D., Tsigenopoulos C.S., 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.
- Durand D., Bianco P.G., Laroche J., Gilles A. 2003. Insight into the Origin of Endemic Mediterranean Ichthyofauna: Phylogeography of *Chondrostoma* Genus (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Heredity*, 94(4): 315-328.
- Elvira B. 1997. Taxonomy of the genus *Chondrostoma* (Osteichthyes, Cyprinidae): an updated review. *Folia Zoologica*, 46 (Suppl. 1): 1-14.
- Estoup A., Largiadere C.R., 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.
- Erguden Alagoz S., Goksu M.Z.L., Celikkol C. 2010. The Digestive System Content of King Nase Fish, *Chondrostoma Regium* (Heckel, 1843) Inhabiting in Seyhan Dam Lake (Adana/Turkey). BAE/Lattakia Conference, 13-15 December, Lattakia- Syria.
- Fricke R., Bilecenoglu M., Sari H.M. 2007. Annotated checklist of fish and lamprey species (Gnathostomata and Petromyzontomorpha) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde, Serie A (Biologie)*, 706:169-169.
- Ghanbary K., Poria M., Nouri F., Ejraee F., Heshmatzad P. 2013. Interrelationships between morphometric variables and total weight in male fish *Chondrostoma regium* (Heckel, 1843) evaluated by path analysis in Ghamasiab river Kermansha, Iran. *International Journal of Biosciences*, 3(12): 120-126.
- Hashemzadeh Segherloo I., Abdoli A., Purahmad R., Puria M., Golzarianpour K. 2014. Genetic barcoding of *Capoeta* species in Karoon and Tigris tributaries. *Modern Genetics*, 2(9): 171-178. (In Persian).
- Hashemzadeh Segherloo I., Rahmati S., Purahmad R., Golzarianpour K., Abdoli A. 2013. Analysis of the systematic status of the blind Iran cave barb, *Iranocypris typhlops*, using *COI* gene. *Modern Genetics*, 8(1): 59-66. (In Persian).

- Hebert N., Cywinska A., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Jahangiri L., Shabany A., Rezaei H.R. 2013. Analysis of the population genetics of three Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) populations in Golestan Province using microsatellite marker. *Modern Genetic*, 8: 423-434. (In Persian).
- Kiani F., Keivany Y., Peykan-Heyrati F., Farhadian O. 2012. Length-Weight Relationship of King Nase (*Chondrostoma regium*) from Bibi Sayyedani River, Semirom, Isfahan. The 17th National & 5th international Iranian Biology Conference. Kerman, Iran. (In Persian).
- 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 B.A., Freyhof J., Lajbner Z., Perea S., Abdoli A., Gaffaroglu M., Özulug M., Rubenyan H.R., Salnikov V.B., Doadrio I. 2012. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 542-549.
- Nassiri M.R., Mahdavi M. 2011. Genetic and phylogenetic analysis of cytochrome *b* region in Jebeer of Iran. *Agricultural Biotechnology*, 3: 91-104.
- Robalo J.I., Doadrio I., Almada V.C., Kottelat M. 2005. *Chondrostoma oligolepis*, new replacement Name for *Leuciscus macrolepidotus* Steindachner, 1866 (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 16(1): 47-48.
- Sadaei N., Solaimani K. 2012. Comparison of two estimation formulae with the measured values and implication of path analyzing method in Armand River. *Iranian Society of Irrigation & Water Engineering*, 3: 53-64. (In Persian).
- Yamaani M. 2007. Geomorphology of Zardkooh Glaciers the Investigation of Morphological features and the bounfary of their extension. *Geographical Research Quarterly*, 39(59): 125-139. (In Persian).
- Zardoya R., Doadrio I. 1998. Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265: 1365-1372.
- Zardoya R., Doadrio I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49: 227-237.