جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی فیلوژنتیک پنج گونه از کپورماهیان دریای خزر با استفاده ازتوالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی

مهتاب قریب خانی[1*]، محمد پورکاظمی[2]، لیلا عزیز زاده[2]، فریبا فلاح باقری[3] و مصطفی تاتینا[1]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، گروه شیلات، آستارا، ایران

۲ـ انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران

۳ـ دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، اصفهان، ایران

مسئول مکاتبات: m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir

چکیده

خانواده کپورماهیان بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین محسوب می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های سیستماتیک قبلی که جنس‌ها و گونه‌های مختلف خانواده کپورماهیان را مورد بررسی قرار می‌دادند بیشتر بر پایه خصوصیات ظاهری متکی بوده‌اند. اما امروزه از داده‌های مولکولی به طور گسترده‌ای برای این منظور استفاده می‌شود. هدف از این بررسی تعیین روابط فیلوژنی و خویشاوندی ۵ گونه از کپورماهیان دریای خزر شامل: سیاه کولی(*Vimba vimba persa*)، ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، سس-ماهی سر بزرگ (*Barbus capito*)، کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با توالی یابی ژن سیتوکروم b (cytb) میتوکندریایی می باشد. بدین منظور تعداد ۳ عدد نمونه بالغ از هر یک از گونه‌های ذکر شده از تالاب انزلی جمع‌آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید. DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از یک جفت پرایمر ژن سیتوکروم b انجام گرفت. پس از الکتروفورز، محصولPCR همراه با پرایمرهای مورد نظر برای توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. جهت تمایز ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنی توالی‌های ژن سیتوکروم b نمونه‌های ماهیان ذکر شده از نرم افزار Mega 4 استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که نمونه‌های کپور معمولی و کلمه خزری هر دو در یک کلاستر قرار گرفته‌اند و فاصله تکاملی نمونه‌های این دو گونه بسیار کم است. نمونه‌های ماهی سفید نیز با دارا بودن فاصله ژنتیکی قدری بیشتر، بر روی کلاستر مجزایی قرار دارند. به همین ترتیب سیاه کولی و سس‌ماهی سر بزرگ با دارا بودن فواصل تکاملی بیشتر بر روی کلاسترهای مجزایی قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر تمامی این پنج گونه با فاصله تکاملی زیاد از گونه سوف سفید قرار گرفته‌اند که این امر می‌تواند تأیید کننده وجود جد مشترک برای این پنج گونه و به عبارت دیگر قرار داشتن آنها در یک خانواده مشترک باشد. از این رو نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از روش توالی‌یابی ژن سیتوکروم b روشی مناسب و قابل اعتماد در تمایز گونه‌های کپورماهیان ایران است.

کلمات کلیدی: کپورماهیان، فیلوژنتیک، ژن سیتوکروم b، ایران

مقدمه

خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) با داشتن ۲۱۰ جنس و ۲۰۱۰ گونه، بزرگترین خانواده ماهیان آب شیرین محسوب می‌شود [۱۷]. در طی سال‌ها، خانواده کپورماهیان با تقسیم بندی‌های تاکسونومیک به گروه‌های مختلفی تقسیم شده‌اند. این گروه‌بندی‌ها معمولاً در سطح زیر خانواده یا پایین‌تر بوده‌اند [۷،۱۱ و ۱۷]. تجزیه و تحلیل‌های سیستماتیک قبلی که گونه‌های وابسته به یک نسل و روابط درون گونه‌ای

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خانواده کپورماهیان را مورد بررسی قرار می‌دادند بیشتر بر پایه خصوصیات ظاهری متکی بوده‌اند. Chen و همکاران (۱۹۸٤) اولین افرادی بودند که فرضیه فیلوژنتیک را در کپورماهیان بر پایه خصوصیات ظاهری مطرح کردند. اما امروزه داده‌های مولکولی به ابزار قدرتمندی برای آشکار کردن روابط تاکسونومیک و مشخص کردن حدود گونه‌ها در گروه‌های بسیار متنوع و حتی ظاهراً مشابه کپورماهیان تبدیل شده است.

مواد ژنتیکی اعم از کروموزومی یا خارج از کروموزومی در معرض تغییرات و جهش های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون و یا بیرون ارگانیسم در هنگام همانندسازی، سبب جابجایی در ترکیب نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند. در اکثر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می شود و از آنجایی که چنین داده‌هایی کمتر تحت تاثیر انتخاب (Selection) قرار می گیرند، بهتر می توانند روابط فیلوژنی واقعی را نمایان سازند. تجزیه و تحلیل های فیلوژنتیک بر اساس ترسیم درخت ژنی ملاکی برای جداسازی جمعیت های خاص و تشخیص گونه‌های نیازمند به حفاظت است [۲۳].

ژنوم میتوکندری بعنوان یک نشانگر ژنتیکی بطور گسترده‌ای برای مطالعات ژنتیکی بکار می رود [٤]. از این رو آنالیز mtDNA می‌تواند تفاوت‌های ژنتیکی را که ممکن است بین گونه‌ها یا جمعیت‌های درون یک گونه وجود داشته باشد آشکار سازد، بنابراین از توان قابل ملاحظه ای جهت حل تناقض‌های رده‌بندی آبزیان برخوردار است [٦]. DNA میتوکندریایی (mt DNA) در بسیاری ازمطالعات فیلوژنتیک و تاکسونومیک به عنوان یک نشانگر مناسب ژنتیکی محسوب می شود زیرا میزان جهش در آن بالا بوده و نوترکیبی در آن اتفاق نمی افتد [۱۵]. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدهای mtDNA در مهره داران عالی تقریبا ۱۰ – ۵ برابر سرعت تعویض در ژنوم هسته است که موجب افزایش قدرت تفکیک در سطح مطالعات جمعیتی شده و حساسیت آن نسبت به کاهش تنوع ژنتیکی در تنگناهای ژنتیکی بیشتر است. در mtDNA برای بررسی روابط درون گونه-ای و روابط بین گونه‌هایی که دارای روابط خویشاوندی نزدیک هستند، توالی‌های با تکامل متوسط مانند سیتوکروم b استفاده می‌شود [۳]. با توجه به این نکته که امروزه توالی یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی یکی از بهترین روش‌ها در مطالعات فیلوژنتیک است [۲۲]، مطالعات مختلفی با استفاده از این روش در زمینه روابط فیلوژنیک کپورماهیان در جهان انجام شده است [۹،۸،۷،٦و۲۱]. در این بررسی نیز روابط فیلوژنی و خویشاوندی ۵ گونه از کپورماهیان دریای خزر شامل: سیاه کولی(*Vimba vimba persa*)، ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، سس‌ماهی سر بزرگ (*Barbus capito*)، کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تعداد ۳ عدد نمونه بالغ از هر یک از گونه های سیاه کولی، ماهی سفید، سس ماهی سر بزرگ، کلمه خزری و کپور معمولی از تالاب انزلی جمع آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و در الکل ۹٦ درصد نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در جوار سد سنگر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رشت منتقل شد. DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها به روش استات آمونیوم [۱٤] استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای DNA نمونه های مورد نظر با استفاده از یک جفت آغازگر ژن سیتوکروم b که با استفاده از نرم افزار Genrunner از ژن میتوکندریایی ماهی *Rutilus alburnoides*، به شماره ثبت AJ427838 در NCBI طراحی گردید انجام گرفت. توالی آغازگر Forward و Reverse به شرح زیر بود:

Forward primer: 5′ CGG CGC ACT AGT CGA CCT TCC AAC A 3′
Reverse primer: 5′ GCT TTA TTT TCC ATT CAC CCT GC 3′

برای آماده کردن مواد مورد نیاز جهت PCR ابتدا بافر و محلول های dNTP پس از خروج از فریزر در شرایط دمایی اتاق در زیر هود لامینار قرار داده شد تا از حالت انجماد خارج شود. برای یکسان شدن مخلوط، مواد به مدت نیم دقیقه ورتکس شد. برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید. سپس ترکیبات ضروری برای انجام PCR روی یخ با مقادیر مشخص به ویال‌ها افزوده شد. محتویات ویال‌ها توسط سمپلر خوب به هم زده شد و سپس ویال ها به مدت ۱۰ ثانیه سانترفیوژ شدند تا محتویات آنها در ته آنها جمع شود. برای بهینه کردن PCR در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو بدست آمد و در مرحله بعد جهت ظاهر شدن خوب باندها و حذف شکستگی (اسمیر) غلظت MgCl2، DNA ژنومی و dNTPs بهینه سازی گردید. به این منظور برای هر نمونه یک ویال ۰/۲ میلی لیتری استریل انتخاب و ترکیبات مورد نظر (جدول۱) بر روی یخ به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر با چرخه های حرارتی مشخص قرار داده شد (جدول ۲). بمنظور مشاهده تک باند بدست آمده از محصول PCR ژن سیتوکروم b از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید. برای اینکار پس از تهیه ژل و قرار دادن آن داخل تانک الکتروفورز، برای هر یک از نمونه های ماهی مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۳ میکرولیتر بافر لودینگ داخل هر یک از چاهک ها ریخته شد و در یکی از چاهک های دیگر بمنظور تعیین اندازه باندی هر یک از نمونه‌ها از مارکر مولکولی به وزن bp ۱۰۰ استفاده گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR، طول باند تکثیر شده ۱۰۵۰ جفت باز تعیین گردید. سپس محصول PCR همراه با پرایمرهای مورد نظر برای توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. جهت تمایز ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنی توالی‌های ژن سیتوکروم b نمونه‌های ماهیان ذکر شده از نرم افزار Mega 4 [۲۰] استفاده گردید.

جدول ۱- نوع ومقدار مواد استفاده شده درواکنش زنجیره ای پلیمراز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۵۰ میکرولیتری
DNA	۵۰ نانوگرم	میکرولیتر ۳- ۲
پلیمراز Taq DNA آنزیم	۵ u/µ	۰/۵ میکرولیتر
DNTPs	۱۰ میلی مولار	۱/۲ میکرولیتر
MgCl2	۵۰ میلی مولار	۲ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰X	۵ میکرولیتر
پرایمر۱	۱۰ میلی مولار	۱/۵ میکرولیتر
پرایمر۲	۱۰ میلی مولار	۱/۵ میکرولیتر
آب مقطر	—	تا ۵۰ میکرولیتر

جدول ۲ - چرخه های حرارتی PCR با استفاده از آغازگر Cyt b

تعداد چرخه (سیکل)	(دقیقه) زمان	درجه حرارت (سانتی گراد)	مراحل	لوکوس
۱	۵	۹٤	واسرشته سازی اولیه	Cyt b
۳۵	۱	۹٤	واسرشته سازی	
	۰/۵	٦٤-۵۸	الحاق	
	۲	۷۲	بسط	
۱	۷	۷۲	بسط نهایی	

نتایج

جهت مقایسه فراوانی نوکلئوتیدی ژن سیتوکروم b در این پنج گونه ماهی، فراوانی هر یک از بازهای تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین با استفاده از نرم افزار MEGA4 محاسبه گردید (جدول ۳).

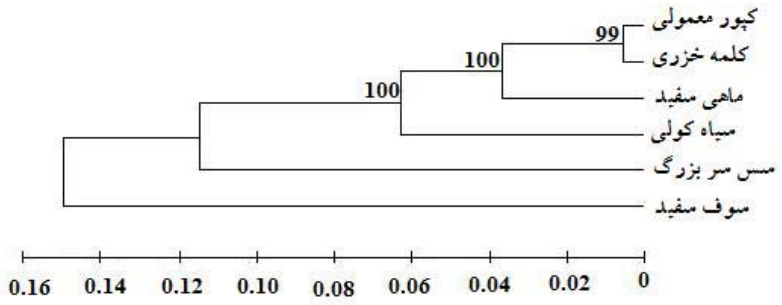
نتایج حاصل از بررسی تاریخچه تکاملی نمونه‌های این پنج گونه ماهی با استفاده از روش رابطه خویشاوندی [۱۸] و با در نظر گرفتن بیشترین شباهت ژنتیکی [۱۹] در نمودار ۱ ترسیم گردیده است. توالی ژن سیتوکروم b ماهی سوف سفید با شماره ثبت QC214532 در بانک ژن بعنوان گروه خارجی (Outgroup) در نظر گرفته شده است. این نمودار نشان می‌دهد که نمونه‌های کپور معمولی و کلمه خزری هر دو در یک کلاستر قرار گرفته‌اند و فاصله تکاملی نمونه های این دو گونه به دلیل طول شاخه ناچیزی که از آنها مشتق می شود بسیار کم است. نمونه‌های ماهی سفید نیز با دارا بودن فاصله ژنتیکی قدری بیشتر، بر روی کلاستر مجزایی قرار دارند. به همین ترتیب سیاه کولی و سس سر بزرگ با دارا بودن فواصل تکاملی بیشتر بر روی کلاسترهای مجزایی قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر تمامی این پنج گونه با فاصله تکاملی زیاد از گونه سوف سفید قرار

گرفته‌اند که این امر می‌تواند تأیید کننده وجود جد مشترک برای این پنج گونه و به عبارت دیگر قرار داشتن آنها در یک خانواده مشترک باشد. در این نمودار مجموع طول کل شاخه‌ها (SBL) که بیانگر مقدار کلی فاصله تکاملی می‌باشد با توجه به مقیاس نشان داده شده در پایین نمودار، ۰/۵۱۳ محاسبه شده است.

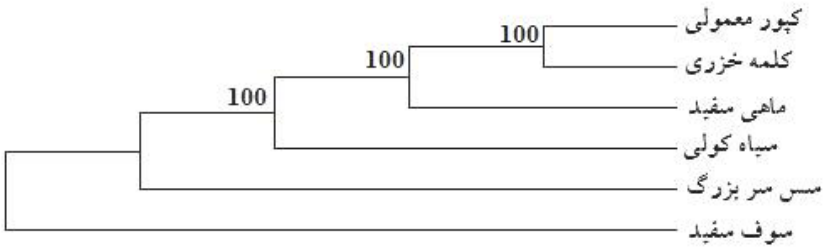
نتایج حاصل از بررسی تاریخچه تکاملی این پنج گونه کپورماهی با استفاده از روش حداکثر رابطه خویشاوندی [۱۰] و الگوریتم تبادل نزدیک [۱٦] در نمودار ۲ ترسیم گردیده است. توالی ژن سیتوکروم b ماهی سوف سفید با شماره ثبت QC214532 در بانک ژن بعنوان گروه خارجی (Outgroup) در نظر گرفته شده است. این نمودار نیز بیانگر آن است که منشأ این پنج گونه کپورماهیان مشترک بوده و این گونه ها دارای یک جد مشترک در زمان های بسیار دور بوده‌اند. همچنین تمامی این گونه‌ها از نظر تاریخچه تکاملی با گونه سوف سفید فاصله بسیاری دارند.

جدول ۳- درصد فراوانی بازهای تیمین (T)، سیتوزین (C)، آدنین (A) و گوانین (G) در توالی های بدست آمده برای ۵ گونه از کپورماهیان دریای خزر

گونه ماهی	T	C	A	G
کلمه خزری	۲۸/۲	۲۹/۲	۲۵/۹	۱٦/۷
ماهی سفید	۲۸/۸	۲۸/۷	۲۷/۰	۱۵/٤
سیاه کولی	۳۰/۱	۲۷/۳	۲۷/۷	۱٤/۹
کپور معمولی	۲۸/٤	۲۹/۲	۲٦/۲	۱٦/۳
سس سر بزرگ	۲٦/٤	۳۰/۵	۲۷/۲	۱۵/۹



نمودار ۱- دندوگرام رابطه خویشاوندی(Neighbor-Joining) بر اساس روش (Saitou & Nei, 1987) بین نمونه های کپورماهیان و سوف سفید (بعنوان Outgroup) با ۵۰۰ بار تکرار (اعداد کنار شاخه ها ، درصد تکرار در آزمون bootstrap است).



نمودار ۲- دندوگرام حداکثر رابطه خویشاوندی (Maximum Parsimony) بر اساس روش (Nei & Kumar, 2000) بین نمونه های کپورماهیان و سوف سفید (بعنوان Outgroup) با ۵۰۰ بار تکرار (اعداد کنار شاخه ها ، درصد تکرار در آزمون bootstrap است).

بحث

سرعت تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنوم میتوکندری متفاوت است [۵] و ژن سیتوکروم b یکی از ژن‌هایی است که دارای محل‌های اطلاعاتی مناسبی برای شناسایی ارتباط فیلوژنی بین گونه هایی است که از نظر مورفولوژیکی خیلی بهم نزدیک هستند [۲۱]. لذا این ژن، یک نشانگر ژنتیکی قابل اعتماد و مناسب برای مطالعات فیلوژنتیک محسوب می‌شود.

در این بررسی ترکیب نوکلئوتیدهای حاصل از توالی یابی گونه‌های مختلف کپورماهیان حاکی از درصد پایین نوکلئوتید G و مقادیر نسبتاً مشابه در سه نوکلئوتید دیگر (A، C و T) بود. چنین الگویی از ترکیب نوکلئوتیدی در سایر گونه‌های ماهیان نیز به طور وسیع گزارش گردیده است [۱۲].

از سوی دیگر نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از روش توالی‌یابی ژن سیتوکروم b روش مناسبی در تمایز گونه‌ها است بطوری که حتی قادر است دو گونه نزدیک به هم یعنی ماهی سفید و کلمه خزری را از هم متمایز نماید و این مطلب با نتایج مشابهی که در خصوص قابلیت توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم b در شناسایی و تمایز گونه‌ها بدست آمده است کاملاً مطابقت دارد [۱۳].

نمودارهای ۱ و ۲ هر دو حاکی از ارتباط نزدیک گونه‌های ماهی سفید، کلمه خزری و سیاه کولی می-باشند. مطالعات سیستماتیک این سه گونه ماهی بر اساس خصوصیات ریخت شناسی نیز نشان دهنده این است که هر سه آنها متعلق به زیرخانواده عروس ماهی‌سان‌ها (Leuciscinae) می‌باشند [۲]. لذا نتایج حاصل از مطالعات ژنتیکی این بررسی با نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیکی پیشین تا حد زیادی تطابق دارد.

پیش از این روابط فیلوژنیک ۲۹ گونه از خانواده کپورماهیان اروپایی با توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفت [٦]. این اولین بررسی انجام شده بر روی فیلوژنی و تنوع کپورماهیان با استفاده از روش‌های مولکئولی بود و نتایج حاصل از آن همگی منطبق بر یافته های مورفولوژیک پیشین بودند. بعدها فیلوژنی و جغرافیای زیستی ٦٢ گونه از خانواده کپورماهیان مناطقی از خاور میانه (به غیر از ایران) با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی در مطالعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت [۹] اما شاخه‌های مشاهده شده در درخت فیلوژنیک بدست آمده در این بررسی با اطلاعات مورفومتریک یا کاریولوژیک پیشین متناقض بودند. در ایران به عنوان یکی از مهمترین مناطق خاورمیانه، پیش از این در مطالعه ای ژن سیتوکروم b پنج گونه از کپورماهیان دریای خزر شامل ماهی سفید، سس‌ماهی بزرگ سر،

سیم، ماش و کلمه با بکار گیری روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفته و هاپلوتیپ‌های اختصاصی برای هر یک از پنج گونه مورد بررسی و شناسایی شده و بعنوان نشانگر ژنتیکی در تمایز گونه ها معرفی شدند [۱] اما مطالعه حاضر برای اولین بار است که با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم b بر روی کپورماهیان ایران انجام می‌گیرد و نتایج آن نیز تا حد زیادی موید یافته‌های مورفولوژیک پیشین است.

در مجموع نتایج حاصل از این بررسی کارایی بالای ژن سیتوکروم b میتوکندریایی را در مطالعات مربوط به فیلوژنتیک گونه‌های مختلف کپورماهیان تأیید نمود. با این حال پیشنهاد می‌گردد به منظور انجام بررسی های دقیق تر در ارتباط با کپورماهیان ایران از تعداد گونه‌های بیشتری استفاده شده و منشأ تکاملی این گونه‌ها در سطح وسیع تر و با تلفیق با سایر مطالعات انجام گرفته در این زمینه در خاور میانه تکمیل گردد.

منابع

۱- رضوانی گیل کلائی، س.، لالوئی، ف.، عقیلی، ر.، ابراهیم‌زاده موسوی، ح. ۱۳۸۵. معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی پنج گونه از خانواده کپورماهیان دریای خزر به روش PCR- RFLP. مجله علمی شیلات ایران. سال پانزدهم. شماره ٤. صفحات ۵۸- ٤۹.

۲- کیوانی، ی. ۱۳۸۷. خلاصه رده‌بندی فیلوژنتیکی ماهی‌ها. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحات ۷۵- ۷٤.

۳- من، الف. ۱۳۸٤. اصول و روش‌های مطالعات ژنتیکی ماهیان (جلد اول و دوم)، ترجمه ایرج هاشم‌زاده سقرلو، انتشارات نقش مهر، تهران.

4- Arbogast, B. S., S. V. Edwards, J. Wakeley, P. Beerli, and J. B. Slowinski (2002), Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. Annual Review of Ecology, Evolution and systematics, 33: 707–740.

5- Beckenbach, A. T. (1991), Rapid mtDNA sequence analysis of populations using polymeras chain reaction. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 48: 125-134.

6- Briolay, J., N. Galtier, R. M. Brito, and Y. Bouvet (1998), Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 9: 100–108.

7- Cavender, T.M., and M. Coburn (1992), Phylogenetic relationships of North American Cyprinidae. In: Mayden, R. L. (Ed.), Systematics, Historical Ecology and North American Freshwater Fishes. Standford University Press, Stanford, 328–378.

8- Chen, X., P. Yue, and R. Lin (1984), Major groups within the family Cyprinidae and their phylogenetic relationships. Acta Zoology Sinica, 9: 424–440.

9- Durand, J. D., C. S. Tsigenopoulos, E. Unlu, and P. Berrebi (2002), Phylogeny and Biogeography of the Family Cyprinidae in the Middle East inferred from Cytochrom b DNA Evolutionary Significance of this Region. Molecular Phylogenetics and Evolution, 22 (1): 91-100.

10- Eck R. V. and M. O. Dayhoff (1966), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical

Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

11- Howes, G. J. (1991), Systematics and biogeography: an overview. In: Winfield, I. J., Nelson, J. S. (Eds.), Cyprinid Fishes Systematics, Biology and Exploitation. Chapman and Hall, London, 1–33.

12- Johns, G. C., and J. C. Avise (1998), A comparative summary of genetic distances in vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. Molecular Biology and Evolution, 15: 1481–1490.

13- Lin, Y. S., Y. P. Poh, S. M. Lin and C. S. Tzeng (2002), Molecules Techniques to identify fresh water eels: RFLP analysis of PCR amplified DNA fragments and Allele-specific PCR from mtDNA. Zoological Studies, 41(4): 421-430.

14- McQuown, E. C., B. L. Sloss, R.J. Sheehan, J. Rodzen, G. Tranah, and B. May (2000), Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new sturgeon primer sequences for Scaphirhynchus and Acipenser. Transactions of the American Fisheries Society, 139: 1380-1388.

15- Na-Nakorn, U., S. Sukmanomon, M. Nakajima, N. Taniguchi, W. Kamonrat, S. Poompuang, and T. T. T. Nguyen (2006), MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas Chevey*, 1913) and closely related species: implications for conservation, Animal Conservation, 9: 483–494.

16- Nei, M. and S. Kumar (2000), Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

17- Nelson, J. S. (2006), Fishes of the World, fourth ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

18- Saitou, N. and M. Nei (1987), The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4:406-425.

19- Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar (2004), Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101:11030-11035.

20- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar (2007), Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute, Arizona State University. 229p.

21- Zardoya, R. (1998), Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographically implication. Proceedings of the Royal Society of London, 265:1365-1372.

22- Zardoya, R., and A. Meyer (1996), Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 13: 933–942.

23- Zhang, D. X., and G. M. Hewitt (2003), Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology, 12: 563–584.