13 (1) 109-118, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

DNA Barcoding of Bird of prey of Mazandaran Province

Jalil Imani Harsini *[1], Masoad Nazri zadeh [2], HamidReza Rezaei [3], Atefeh Asadi [4], Mohamad Kaboli [2]

[1] Department of Environmental Science and Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3] Department of Environment, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4] CEFE, PSL-EPHE (Biogéographie et Ecologie des Vertébrés), CNRS, University Montpellier, Univ Paul Valéry Montpellier 3, IRD, Montpellier, France

Key Words

Predator Birds
DNA Barcoding
COI
Mazandaran

Abstract

Introduction: Identifying the species richness and diversity is one of the basic steps to protect of the biodiversity. The proper identification of predator birds based on the morphological characteristics of the species is difficult, so species differentiation using molecular data has become an efficient technic for taxonomists.

Materials & Methods: In this study, the nucleotide sequencing of the (COI) gene was studied for 36 samples of the Bird of prey of Mazandaran province. DNA extraction was done using blood and feather of collected samples. 660 pairs of nucleotides from the sequence of the mentioned gene were amplified using the polymerase chain reaction and sequenced.

Result: The results of phylogenetic tree shows the separation of four families of Falconidae, Accipitridae, Tytonidae and other Strigidae of Mazandaran province with a total of 27 clads in 14 different Genus of Bird of prey. The average of Interspecies genetic divergence was estimated about 5.8 for Falconidae and 11.8 and 15.4 for Accipitridae and Tytonidae respectively. The Interspecies genetic distance was estimated between 1.5 to 12.3 for Falconidae, 3.9 to 16.3 for Accipitridae and 14.3 to 20.8 for Tytonidae.

Conclusion: In this way, it can be possible to determine the range of species identification in the Bird of prey according to the mentioned range, and each of these clads can be described as an evolutionary unit which has a special genetic integrity and are qualified for protection.

* Corresponding Author's email: jalil.imani@ut.ac.ir
Received: 6 February 2020; Reviewed: 30 April 2020; Revised: 22 May 2020; Accepted: 1 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.132906

مقاله پژوهشی

DNA بارکدینگ پرندگان شکاری استان مازندران

جلیل ایمانی‌هرسینی[۱]* ، مسعود نظری‌زاده[۲]، حمیدرضا رضایی[۳]، عاطفه اسدی[۴]، محمد کابلی[۲]

[۱] *گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[۲] *گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه تهران، کرج، ایران*

[۳] *گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*

[٤] *آزمایشگاه بیوجغرافی و اکولوژی مهره‌داران، مرکز مطالعات علمی ملی مونت پلیه، مونت‌پلیه، فرانسه*

کلمات کلیدی

پرندگان شکاری
DNA بارکدینگ
COI
مازندران

چکیده

مقدمه: شناسایی غنا و تنوع گونه‌ای یکی از مراحل اساسی برای حفاظت از تنوع زیستی است. شناسایی صحیح پرندگان شکاری براساس ویژگی‌های ظاهری گونه‌ها دشوار بوده و برهمین اساس تفکیک گونه‌ها به کمک داده‌های مولکولی به تکنیکی کارآمد برای متخصصان علم رده‌بندی تبدیل شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن (COI) برای ۳٦ نمونه از پرندگان شکاری استان مازندران مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA از نمونه‌های جمع آوری شده از خون و پر پرندگان شکاری استان مازندران انجام شد. ٦٦٠ جفت نوکلئوتید از توالی ژن مذکور با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و توالی‌یابی گردید.

نتایج: نتایج درخت تبارشناسی جدایی چهار خانواده شاهین‌ها (Falconidae)، عقاب‌ها (Accipitridae)، جغد انبار (Tytonidae) و سایر جغدهای (Strigidae) استان مازندران را در مجموع ۲۷ گونه در ١٤ جنس مختلف پرندگان شکاری شناسایی نمود. میانگین واگرایی ژنتیکی بین گونه‌ای‌در راسته شاهین‌شکلان ۸/٥ و دو راسته‌عقاب‌شکلان و جغدشکلان به‌ترتیب ۱۱/۸ و ١٥/٤ محاسبه‌شد. فاصله‌ژنتیکی بین گونه‌ای در راسته شاهین‌شکلان بین ٥/۱ تا ۱۲/۳، درعقاب‌شکلان بین ۳/۹ تا ۱٦/۳ ودرجغدشکلان درمحدوده ١٤/۳ تا ۲۰/۸ قرار گرفت.

نتیجه‌گیری و بحث: بدین‌ترتیب می‌توان محدوده شناسایی گونه‌ها در پرندگان شکاری مورد مطالعه را براساس محدوده مذکور به‌خوبی تعیین نمود و هر کدام از این کلادها را به‌عنوان یک واحد تکاملی معرفی نمود که دارای یک‌پارچگی ژنتیکی ویژه و شایسته حفاظت است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:jalil.imani@ut.ac.ir

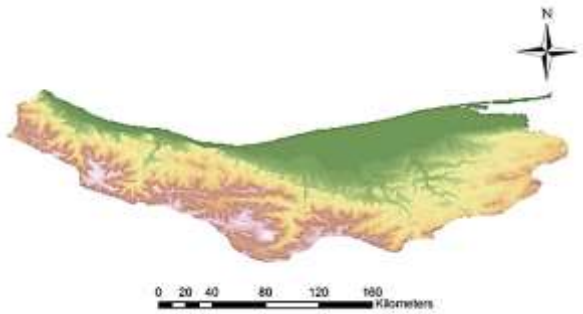
تاریخ دریافت: ۱۷ بهمن ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۱۱ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ خرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.132906

مقدمه

پرندگان شکاری در ایران شامل سه راسته عقاب‌شکلان (Accipitriformes)، شاهین‌شکلان (Falconiformes) و جغدشکلان (Strigiformes)می‌باشند که در مجموع حدود ۶۰ گونه را شامل می‌شوند (کابلی و همکاران، ۱۳۹۵). استان مازندران به‌دلیل تنوع زیستگاهی شامل دریا، سواحل، مناطق دشتی، زمین‌های کشاورزی، جنگلی، کوهستانی، مرتعی و ترکیبی از یک‌سو و قرار گرفتن در مسیر مهاجرت پرندگان مهاجر از سوی دیگر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین زیستگاه‌های پرندگان ازجمله پرندگان‌شکاری محسوب می‌شود، در استان مازندران تاکنون ۲۸ گونه از راسته عقاب‌شکلان، شش گونه از راسته شاهین شکلان و شش گونه از راسته جغدشکلان گزارش شده است (کابلی و همکاران، ۱۳۹۱). شناسایی غنا و تنوع گونه‌ای یکی از مراحل اساسی و پایه‌ای برای حفاظت از تنوع زیستی است. تشخیص پرندگان شکاری به‌واسطه مشکلاتی از قبیل شباهت ظاهری بالا، تغییر رنگ‌آمیزی بدن درطی فصول مختلف، تغییر رنگ‌آمیزی پر و بال در طی‌سال‌های قبل از بلوغ و مواردی از این قبیل، دشوار و نیازمند کسب تجربه فراوان است. از سوی دیگر وجود دو ریختی جنسی در رنگ پر و بال بین نر و ماده، وجود زیرگونه‌های مختلف و نیز امکان وجود هیبریداسیون بین‌گونه‌های نزدیک‌نیز بر این دشواری‌ها می‌افزاید(بختیاری، ۱۳۹۳). بر این اساس شناسایی دقیق و صحیح پرندگان شکاری براساس ویژگی‌های ظاهری و تفاوت‌های مورفولوژیک گونه‌ها دشوار بوده و نیازمند روش‌های نوینی است. روش شناسایی بر اساس مورفولوژی دارای محدودیت‌های زیادی، ازجمله انعطاف‌پذیری فنوتیپی و تغییرپذیری ژنوتیپی در صفات است که برای تشخیص گونه‌ها به‌کار می‌رود. به این جهت متخصصان به استفاده از روش‌های جدید و دقیقی روی آورده‌اند که به شناسایی دقیق و قطعی منتهی می‌شود. داده‌های سلولی-مولکولی و استفاده از شناساگرهای مولکولی مناسب برای تفکیک گونه‌ها در سال‌های اخیر پیشرفت زیادی کرده است. تفکیک گونه‌ها و زیرگونه‌ها به کمک داده‌های‌مولکولی به‌روشی کارآمد برای متخصصان علم رده‌بندی تبدیل شده است. درحال حاضر روش استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰ bp می‌باشد، به‌عنوان یکی از ابزارهای سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز گونه‌ها به‌کار می‌رود (قایدی و همکاران، ۱۳۹۷) که روشی سریع و کم هزینه جهت شناسایی گونه‌ها و ارائه دیدگاه‌هایی نوین در ارتباط با تاریخ تکامل حیات است (Stoeckle، ۲۰۰۳). DNA Barcoding، اطلاعات سیستماتیکی و تاکسونومیکی در رابطه با منشأ، زمان‌انشعاب و رده‌بندی گونه‌ها دراختیار می‌گذارد (Blaxter، ۲۰۰۴). این روش در بسیاری از علوم ازجمله اکولوژی، زیست‌پزشکی، اپیدمیولوژی، زیست‌شناسی تکاملی، بیوجغرافی و زیست‌شناسی حفاظت، صنعت زیستی و کشاورزی (تشخیص گونه‌های آفت) کاربرد دارد(Stoeckle، ۲۰۰۸؛ Leblois و Frezal، ۲۰۰۳).از دیگر کاربردهای این روش می‌توان به کمک برای شناسایی و حفاظت از گونه‌های در خطر انقراض، جلوگیری از شناسایی نادرست بسیاری از گونه‌های تجاری، تعیین ترکیب گونه‌ای یک زیستگاه و شناسایی گونه‌های خواهری اشاره‌کرد (Herbert و همکاران، ۲۰۰۳؛ Dawnay و همکاران، ۲۰۰۷؛ Valentini و همکاران، ۲۰۰۸). این روش یکی از بهترین روش‌های مورد استفاده در رده‌بندی پرندگان معرفی شده است (Aliabadian و همکاران، ۲۰۰۹). ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) با ۶۰۰ تا ۸۰۰ جفت نوکلئوتید در ناحیه ژن میتوکندری به عنوان وسیله‌ای برای تعیین تنوع زیستی در جهان مطرح شده است (Rubinoff، ۲۰۰۶)، این ژن نسبت به سایر ژن‌های کد کننده پروتئین تفاوت‌های بیش‌تری را نشان می‌دهد. Hebert و همکاران (۲۰۰۴) از ژن میتوکندریایی COI به طول ۶۴۸ جفت نوکلئوتید به‌عنوان مارکر مولکولی برای شناسایی گونه‌های جانوری استفاده کردند. مطالعات انجام شده درخصوص چندین گروه مهره‌دار و بی مهره‌گان نشان داده است که بارکدهای COI بیش از ۹۵ درصد از گونه‌ها را تشخیص می‌دهند (Wardو همکاران، ۲۰۰۵؛ Hajibabaei و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعه Kerr و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ۶۴۳ گونه پرندگان آمریکای شمالی نشان داد که ۹۴٪ گونه‌های دارای بارکد اختصاصی هستند. ژن میتوکندریایی COI فواید متعددی در تحلیل روابط فیلوژنتیک دارد که از آن جمله می‌توان به جداسازی و آنالیز آسان (Bertolazzi و همکاران، ۲۰۰۹)، امکان طراحی پرایمرهای قوی، سرعت تکاملی بالا و فراوانی جانشینی نوکلئوتیدی در جایگاه سوم نوکلئوتیدی اشاره کرد.توالی‌نوکلئوتیدی مربوط به این‌ژن دارای‌اختلاف چندین درصدی حتی درون گونه‌های کاملاً نزدیک است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳)، سرعت‌تغییر و تبدیل ژنوم میتوکندری ۱۰ تا ۲۰ برابر ژنوم‌هسته است لذا از این ژنوم می‌توان برای نشان دادن تفاوت بین تاکسون‌های با خویشاوندی نزدیک به‌خوبی سود برد (Hebert و همکاران، ۲۰۰۴) در این‌پژوهش‌نیز‌از‌ژن‌میتوکندریایی COIبرای‌بازسازی‌روابط فیلوژنتیکی پرندگان‌شکاری استان‌مازندران استفاده‌شد. از آن‌جاکه کلید شناسایی پرندگان شکاری براساس شکل ظاهری بسیار مشکل بوده است و حتی در بسیاری از مطالعات شناسایی این پرندگان براساس نتایج حاصل از داده‌های ریخت شناسی با داده‌های ژنتیکی متفاوت بوده است(Smith، ۲۰۱۱)، در این مطالعه تلاش گردید تا با استفاده از داده‌های مولکولی روابط فیلوژنتیکی پرندگان شکاری استان مازندران بررسی شده و با تهیه‌بارکدمناسب راهکارعلمی جهت شناسائی قطعی پرندگان شکاری فراهم‌شود.هم‌چنین‌نتایج حاصل از این روش می‌تواند به‌کمک مدیران حفاظت از تنوع‌زیستی کشور آمده و آن‌ها را در شناسایی قطعی مجرمین و نوع جرم آن‌ها یاری دهد.

مواد و روش‌ها

محدوده مورد مطالعه: استان مازندران با مساحت ۴۶هزار و۲۰۰ کیلومترمربع در شمال کشور ایران و در حاشیه جنوبی دریای خزر واقع شده است. موقعیت و وضعیت طبیعی استان مازندران نشانگر دو ناحیه عمده جلگه‌های ساحلی و کوهستانی البرز (شکل۱) است. امتداد و جهت رشته کوه‌های البرز به‌صورت دیواری مرتفع و طولانی، نوار ساحلی و جلگه‌های کناره‌ای دریای مازندران را محصور کرده است. طبیعت استان مازندران تحت تأثیر عرض جغرافیایی، ارتفاعات البرز، ارتفاع از سطح دریا، دوری و نزدیکی به دریا، وزش بادهای محلی و ناحیه‌ای، جابه‌جایی توده‌های هوای شمالی و غربی و حتی پوشش متراکم جنگلی قرار دارد. به همین جهت و با وجود وسعت اندک (و برخلاف تصور عموم که آب و هوای آن را کاملاً معتدل می‌دانند)، این ناحیه از تنوع آب و هوایی ویژه‌ای برخوردار است و مجموع این عوامل شرایط بسیار متنوع زیستگاهی را در سطح استان پدید آورده است که سبب شده تا در این استان بیش از ۴۹۰ گونه جانوری از رده‌های مختلف مهره داران اعم از پرندگان، پستانداران، خزندگان، دوزیستان و ماهی‌ها تاکنون مورد شناسایی قرار گیرد.



شکل ۱: وضعیت توپوگرافیکی استان مازندران (دامنه تغییرات ارتفاعی از کوه‌های مرتفع (صورتی کم‌رنگ) تا جلگه‌ها (سبز پر رنگ) نشان داده شده است)

گونه‌های مورد مطالعه و نمونه‌گیری: در استان مازندران تا کنون ۲۸ گونه از راسته عقاب‌شکلان، شش گونه از راسته شاهین شکلان و شش گونه از راسته جغدشکلان گزارش شده است (کابلی و همکاران، ۱۳۹۱). در این مطالعه تعداد ۳۶ نمونه خون و پر از پرندگان شکاری استان (برحسب میزان دسترسی) تهیه شد. در این مطالعه هیچ نمونه‌ای صید نشد و تنها از نمونه‌های موجود در اسارت و یا نمونه‌های موجوددر موزه‌های استان استفاده شد.نمونه پرهای جمع‌آوری شده در ویال‌های حاوی سیلیکاژل قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شدند.

هم‌چنین برای برخی نمونه‌ها، یک سی‌سی خون از سیاهرگ زیر بال با استفاده از لوله مویین خونگیری و پنج میکرولیتر EDTA یک درصد، برای جلوگیری از انعقاد خون به ظرف نمونه‌گیری اضافه شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از قاعده پر: در ابتدا قسمت کوچکی از قسمت قاعده پر (Calamus) در میکروتیوپ ۰/۲ سی‌سی قرار داده شده و مقدار ۲۰ میکرولیتر NAOH ۰/۲ مولار به تیوب اضافه شد. تیوب محتوی این مواد در دستگاه آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه) تا نمونه‌ها لیز شوند. پس از آن برای آماسیدگی سلولی و آزاد شدن محتویات سلولی (ازجمله ژنوم سلول) مقدار ۱۸۰ میکرولیتر محلول Tris-CHl ۰/۰۴ مولار به میکروتیوپ اضافه شد.

استخراج DNA از خون: جهت استخراج DNA از نمونه‌های خون از پروتکل پیشنهادی کیت GeNet Bio (Genomic Isolation DNA Kit from Tissue100) شماره کاتالوگ K3000 ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR: پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، تکثیر ژن COI از DNA استخراج شده طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از یک جفت پرایمر BirdF1 (5´- TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC -3´) و BirdR1 (5´- ACGTGGGAGATAATTCCAEETCCTG -3) (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳) انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل Applied Biosystems ۲۷۲۰، ساخت آمریکا) مطابق جدول ۱، زیر انجام گرفت (امینی، ۱۳۹۲):

حجم واکنش برابر با ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل یک میکرولیتر DNA، یک واحدآنزیم *Taq* پلیمراز، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، یک میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر آغازگر ۵ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X و ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. به‌منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر و بررسی کیفیت محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. پس از اطمینان از تکثیر و عدم وجود آلودگی، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از دستگاه ABI 3730 به‌روش خودکار توالی‌یابی شد.

دریافت اطلاعات از بانک ژن: به‌منظور تکمیل اطلاعات با استفاده از سایت‌های بانک اطلاعات ژنتیکی توالی‌های ژن COI ده گونه از راسته‌های مورد مطالعه استخراج شد و سپس در آنالیزها به همراه نمونه‌های توالی‌یابی شده مورد استفاده قرار گرفت (http://www.boldsystems.org و http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

جدول ۱: چرخه حرارتی دستگاه PCR

	مرحله اول (واسرشت سازی اولیه)	مرحله دوم			مرحله سوم				مرحله چهارم
		واسرشت سازی	اتصال	بسط	واسرشت سازی	اتصال	بسط		بسط نهایی
چرخه (دفعه)	۱	۵			۳۵				۱
زمان (دقیقه)	۲	۱	۱/۵	۱/۵	۱	۱/۵	۱/۵		۷
دما (درجه)	۹۴	۹۴	۵۱	۷۵	۹۴	۵۳	۷۵		۷۲

تجزیه و تحلیل داده‌ها: کروماتوگرام توالی‌های دریافت شده در ابتدا توسط نرم‌افزار SeqScape ۲,۶ بررسی و خطاهای موجود اصلاح گردید. به‌منظور ارزیابی توالی نمونه‌های مورد مطالعه از اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی ژنتیکی از قبیل سیستم بارکد داده‌های حیاتی (The Barcode of Life Data System (BOLD)) و مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) استفاده گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ۷,۲,۵ و الگوریتم Clustalw توالی‌ها هم‌ردیف و مقایسه شدند (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴). از نرم‌افزار MEGA ۵,۳ (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) برای برآورد فاصله ژنتیکی بین و درون گونه‌ها و بین جنس‌ها براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا (K2P) استفاده شد و سپس آنالیز بارکدینگ گپ (Barcoding Gap) برای تعیین بهترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی از نرم‌افزار JModelTest ۲,۱,۵ استفاده شد (Darriba و Posada، ۲۰۱۴). با توجه به مدل انتخاب شده، از نرم‌افزار Phylm ۳,۱ برای ترسیم درخت حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) (Guindon و Gascuel، ۲۰۰۳) و از نرم‌افزار MrBayes ۳,۲,۲ برای ترسیم درخت بیزین استفاده گردید (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۱۱). تحلیل‌های بیزین براساس چرخه زنجیره مارکو (Markov chain Monte Carlo) با ۵۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه (Sample frequency) ۱۰۰۰ انجام شد. در نهایت درخت‌های ترسیم شده به‌وسیله قانون اکثریت (Majority-rule) یکپارچه (Consensus) شدند.

نتایج

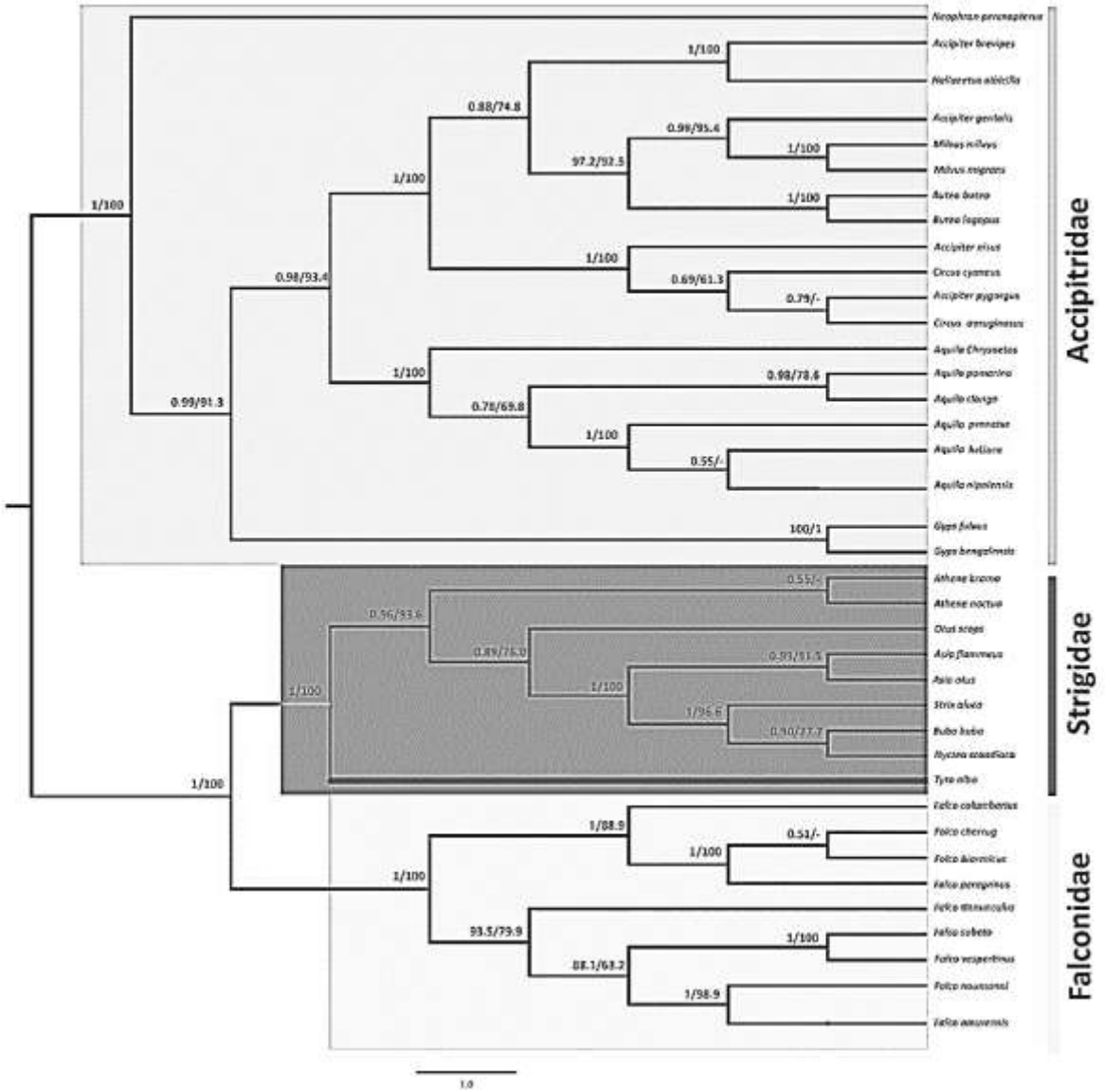
شناسایی پرندگان شکاری تعیین توالی شده استان مازندران: در این مطالعه ۶۶۰ جفت نوکلئوتیداز توالی ژن در ۳۶ نمونه از پرندگان شکاری استان مازندران با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و توالی‌یابی گردید. درخت مولکولی نزدیک‌ترین همسایه برای نمونه‌هایی که در پایگاه‌های داده ژنتیکی به بیش از یک گونه مرجع، شبیه بوده‌اند و یا مواردی که در پایگاه اطلاعات نمونه مرجعی نداشتند، با استفاده از توالی سایر پرندگان شکاری موجود در بانک ژن و مرتب کردن آن‌ها با توالی پرندگان شکاری مازندران در نرم‌افزار MEGA رسم شد. بدین ترتیب در ۳۶ نمونه تهیه شده از استان مازندران، تعداد ۲۷ گونه مربوط به ۱۴ جنس مختلف، شناسایی شد (جدول ۲). درخت تبارشناسی ۲۷ گونه شناسایی شده به‌همراه ۱۰ گونه استخراج شده از بانک‌های ژن ترسیم شد و نتایج حاصل از ترسیم درخت مولکولی بر تمایز خانواده‌های شاهین‌ها، عقاب‌ها، جغد انبار و سایر جغدها تاکید داشت (شکل ۲). این خانواده‌ها در سه راسته عقاب‌شکلان (Accipitriformes)، شاهین‌شکلان (Falconiformes) و جغدشکلان (Strigiformes) قابل تفکیک بودند.

بررسی وضعیت تبارشناسی پرندگان شکاری استان مازندران: در این مطالعه، درخت تبارشناسی ۲۷ گونه شناسایی شده از ۳۶ نمونه به‌دست آمده از استان مازندران همراه با توالی‌های استخراج شده ۱۰ گونه دیگر از دو پایگاه اطلاعاتی NCBI و BOLD، ترسیم شد و تحلیل نهایی برای هر فرد انجام شد. نتایج حاصل از تحلیل روش‌های حداکثر درست‌نمایی و بیزین، توپولوژی یکسانی را نشان دادند، اما تحلیل بیزین نسبت به‌روش حداکثر درست‌نمایی با احتمال بالایی جدایی بین گونه‌ها را نشان داد. نتایج درخت تبارشناسی جدایی چهار خانواده شاهینیان، عقابیان، جغدیان انبار و جغدیان را نشان داد. به‌طورکلی گونه‌های مورد بررسی استان مازندران در ۲۷ کلاد مختلف قرار می‌گیرند که در این میان خانواده Accipteridae با ۱۵ کلاد یکی از متنوع‌ترین اعضای پرندگان شکاری استان مازندران است که افراد این کلاد با احتمال پسین و بوت استرپ بالایی (۱ و ۱۰۰) از سایر کلادها جدا شدند. عقاب استپی به‌عنوان یک کلاد خویشاوندی با احتمال پسین ۰/۹۲ و بوت استرپ ۹۱/۱ درصد از دو کلاد سارگپه‌ی معمولی (*Buteo lagopus*) و سارگپه پرپا (*Buteo buteo*) قابل تفکیک است. هم‌چنین توپولوژی درخت تبارشناسی نشان داد که کرکس مصری (*Neophron percnopterus*) به‌عنوان یک کلاد منحصربه‌فرد، از سایر کلادهای خانواده Accipitridae تکامل یافته است. براساس درخت تبارشناسی، در خانواده Strigida، گونه‌های متعلق به ۵ جنس مختلف شامل (*Strix*، *otus*، *Bubo*، *Athene* و *Asio*) کاملاً از یکدیگر متمایز و قابل تشخیص هستند. هم‌چنین جغد انبار (*Tyto alba*) به‌عنوان تنها نماینده خانواده Tytonidae از سایر پرندگان شکاری استان مازندران جدا شده است. در خانواده Falconidae، گونه‌های دلیجه کوچک (*Falco naumanni*)، دلیجه (*Falco tinnunculus*)، لیل (*Falco subbeto*) و شاهین پاسرخ (*Falco vespertinus*) به خوبی از یکدیگر تفکیک است (شکل ۲).

جدول ۲: شناسایی گونه‌های مورد مطالعه براساس پایگاه‌های اطلاعات ژنتیکی (BOLD و NCBI) و درخت مولکولی نزدیک‌ترین همسایه

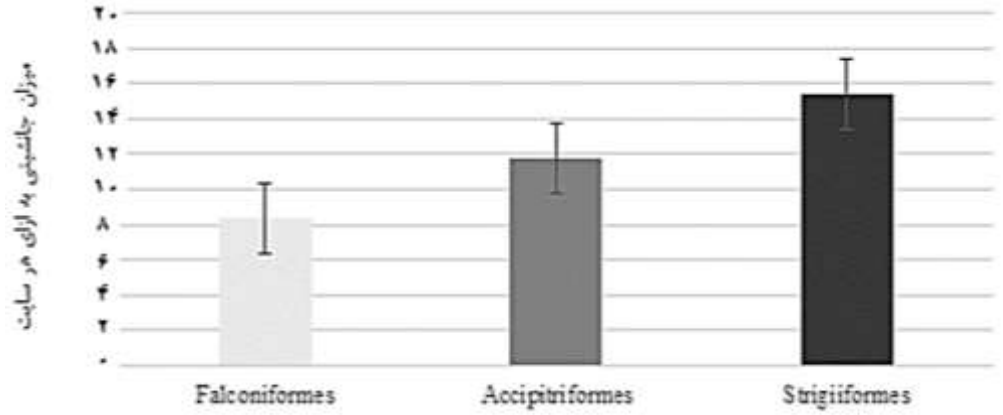
ردیف	اسم فارسی	اسم انگلیسی	گونه	جنس	خانواده
۱	جغد انبار	Long eared owl	*alba*	*Tyto*	Tytonidae
۲	جغد جنگلی	Tawny Owl	***aluco***	*Strix*	Strigidae
۳	مرغ حق	European Scops Owl	***scops***	*Otus*	
۴	شاه بوف	Eurasian eagle owl	*bubo*	*Bubo*	
۵	جغد کوچک	Little owl	*noctua*	*Athene*	
۶	جغد شاخدار	long-eared owl	*otus*	*Asio*	
۷	کرکس مصری	Egiptian vulture	***percnopterus***	*Neophron*	Accipitridae
۸	کورکور حنایی	Red Kite	***milvus***	*Milvus*	
۹	کورکور سیاه	Black Kite	***migrans***		
۱۰	سنقر خاکستری	hen harrier	***cyaneus***	*Circus*	
۱۱	سنقر تالابی	western marsh harrier	***aeruginosus***		
۱۲	عقاب دریای دم سفید	white-tailed eagle	***albicilla***	*Haliaeetus*	
۱۳	عقاب پرپا	Booted Eagle	***pennatus***	*Aquila*	
۱۴	عقاب خالدار بزرگ	Greater Spotted Eagle	***clanga***		
۱۵	عقاب شاهی	Eastern imperial eagl	***heliaca***		
۱۶	عقاب طلایی	Golden Eagle	***chrysaetos***		
۱۷	عقاب استپی	Steppe Eagle	***nipalensis***		
۱۸	قرقی	Sparrowhawk	***nisus***	*Accipiter*	
۱۹	طرلان	Northern goshawk	***gentilis***		
۲۰	سارگپه‌ی پرپا	rough-legged buzzard	***lagopus***	***Buteo***	
۲۱	سارگپه	Common Buzzard	***buteo***		
۲۲	شاهین پاسرخ	Red-footed Falcon	***vespertinus***	*Falco*	Falconidae
۲۳	دلیجه	Common kestrel	***tinnunculus***		
۲۴	بالابان	Saker Falcon	***cherrug***		
۲۵	لیل	Eurasian hobby	***subbuteo***		
۲۶	بحری	Peregrine falcon	***peregrinus***		
۲۷	دلیجه کوچک	lesser kestrel	*naumanni*		

فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای: فاصله‌ژنتیکی بین گونه‌ای پرندگان شکاری استان‌مازندران با استفاده ازفاصله Kimura2 و به‌کمک نرم‌افزار MEGA محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که جغدهای مورد مطالعه بیش‌ترین فاصله بین گونه‌ای را در بین اعضای راسته شاهین‌شکلان و عقاب‌شکلان دارد. هم‌چنین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای در راسته شاهین‌شکلان به‌مراتب کم‌تر از راسته عقاب‌شکلان است (شکل ۳).



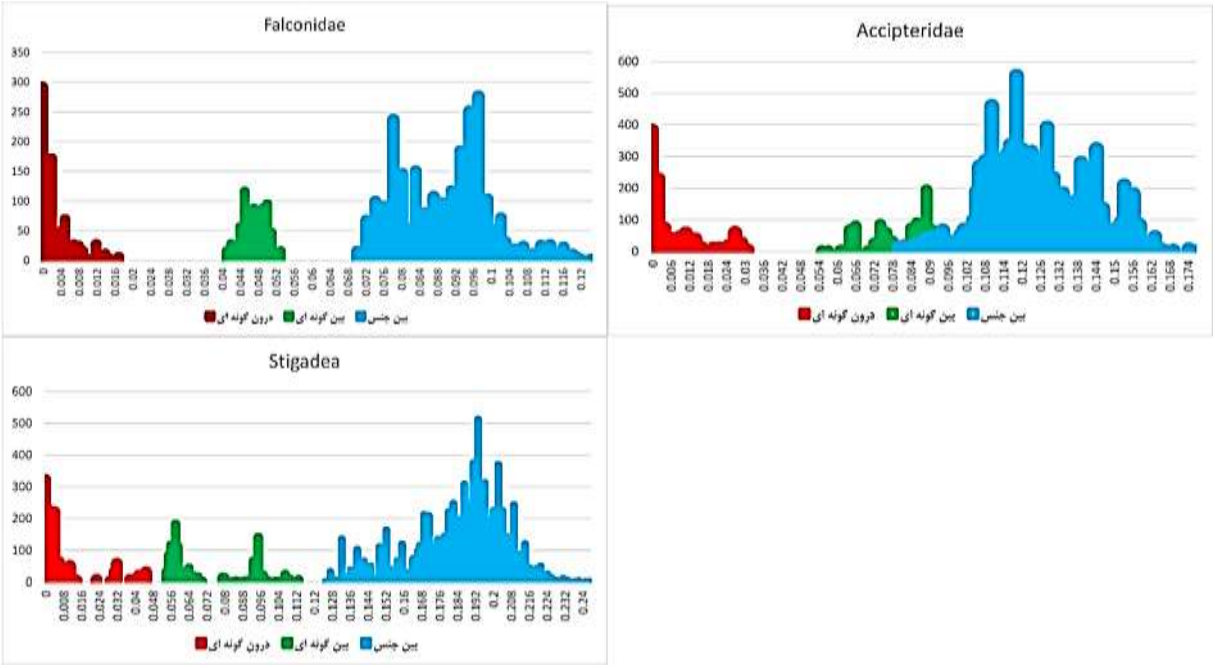
شکل ۲: درخت تبارشناسی ۳۷ گونه پرندگان شکاری استان مازندران

اعداد بالای شاخه‌ها مربوط به احتمال پسین حاصل از آنالیز بیزین و اعداد پایین شاخه‌ها مربوط به بوت استرپ آنالیز حداکثر درست‌نمایی است



شکل ۳: میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای در Falconiformes، Accipitriformes و Strigiformes

شکل ۴، نتایج آزمون بارکدینگ گپ را به تفکیک سه خانواده Falconidae، Acciperidae و Stigidae نشان می‌دهد. به‌ترتیب در خانواده Falconidae ژن COI دو گپ، در خانواده Acciperidae یک گپ و در خانواده Stigidae دو گپ واگرایی ژنتیکی شناسایی شد. حدآستانه فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای برای خانواده Falconidae صفر تا ۱۶ صدم، بین گونه‌ای چهار تا ۵۲ صدم و بین جنس ۶۸ تا ۱/۳صدم برآورد شد. در خانواده Acciperidae آستانه ژنتیکی درون گونه‌ای صفر تا سه صدم و بین گونه‌ای و بین جنس ۵۴ تا ۱/۷۴ صدم بود. در خانواده Stigidae، به‌ترتیب صفر تا ۴۴ صدم، ۴۹ تا ۱/۱۳ صدم و ۱/۴ تا ۲/۶ به‌عنوان آستانه ژنتیکی درون‌گونه‌ای، بین‌گونه و بین‌جنس تخمین زده شد. جدول ۳، میزان فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای اعضای راسته Falconiformes را نشان می‌دهد. بر این اساس بالابان و بحری کم‌ترین فاصله ژنتیکی را در بین اعضای این راسته دارند در حالی‌که دلیجه و بحری بیش‌ترین میزان فاصله‌ژنتیکی را نشان دادند. در راسته عقاب‌شکلان (جدول ۴)، کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین سارگپه معمولی و سارگپه پرپا مشاهده گردید درحالی‌که کرکس مصری و قرقی بیش‌ترین فاصله ژنتیکی را در اعضای این راسته نشان دادند. جغد انبار به‌عنوان یک خانواده مجزا (Tytonidae) در راسته جغدشکلان، بیش‌ترین فاصله ژنتیکی را در بین سایر گونه‌های این راسته دارد. درحالی‌که جغد جنگلی و شاه بوف کم‌ترین فاصله ژنتیکی را در بین گونه‌های مورد مطالعه این راسته نشان دادند (جدول ۵).



شکل ۴: تجزیه و تحلیل آزمون بارکدینگ گپ

جدول ۳: فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای ژن COI در بین گونه‌های راسته شاهین‌شکلان در استان مازندران

	F. tinnunculus	***F. naumanni***	***F. subbuteo***	***F. vespertinus***	***F. cherrug***	***F. peregrinus***
F. naumanni	۶/۱					
F. subbuteo	۷/۹	۸/۹				
F. vespertinus	۹/۸	۸/۱	۹/۶			
F. cherrug	۱۰/۱	۸/۳	۹/۸	۱۰/۲		
F. peregrinus	۱۲/۳	۱۱/۶	۱۱/۵	۱۱/۶	۵/۱	

جدول ۴: فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای ژن COI در بین گونه‌های راسته عقاب‌شکلان در استان مازندران

	Buteo buteo	*Buteo lagopus*	*Neophron* ***percnopteru***	*Haliaeetus albicilla*	*Milvus migrans*	*Milvus milvus*	*Accipiter gentilis*	*Aquila* ***pennatus***	*Circus cyaneus*	*Circus aeruginosus*	*Accipiter nisus*	*Aquila heliaca*	*Aquila nipalensis*	*Aquila chrysatus*	*Aquila clanga*
Buteo buteo															
Buteo lagopus	۱/۵														
Neophron percnopteru	۱۴/۶	۱۵/۴													
Haliaeetus albicilla	۹/۴	۱۰/۱	۱۵/۴												
Milvus migrans	۱۰/۱	۱۰/۸	۱۰/۱	۱۰/۹											
Milvus milvus	۱۰/۹	۱۲/۰	۱۲/۲	۱۰/۱	۱/۵										
Accipiter gentilis	۱۰/۱	۱۱/۷	۱۱/۵	۸/۹	۹/۸	۱۰/۰									
Aquila pennatus	۱۱/۷	۱۳/۴	۱۳/۵	۱۲/۰	۱۳/۴	۱۲/۸	۱۸/۰								
Circus cyaneus	۱۲/۲	۱۲/۹	۱۲/۳	۱۱/۹	۱۲/۹	۱۱/۸	۱۱/۵	۱۳/۱							
Circus aeruginosus	۱۵/۱	۱۳/۴	۱۴/۷	۱۰/۹	۱۱/۴	۱۰/۷	۱۱/۹	۱۴/۴	۷/۵						
Accipiter nisus	۱۲/۱	۱۵/۵	۱۶/۳	۱۲/۲	۱۴/۱	۱۴/۰	۱۱/۷	۱۷/۳	۱۳/۰	۱۲/۷					
Aquila heliaca	۱۱/۷	۱۳/۹	۱۴/۳	۱۴/۱	۱۷/۳	۱۴/۹	۱۲/۹	۱۶/۵	۱۴/۰	۱۳/۶	۱۳/۱				
Aquila nipalensis	۱۲/۹	۱۱/۹	۱۳/۲	۱۱/۹	۱۵/۰	۱۵/۰	۱۱/۹	۱۵/۴	۱۴/۲	۱۱/۵	۱۲/۷	۴/۱			
Aquila chrysatus	۱۴/۵	۱۴/۷	۱۲/۴	۱۲/۰	۱۵/۷	۱۵/۰	۱۴/۲	۱۷/۹	۱۴/۵	۱۳/۴	۱۲/۸	۸/۰	۷/۰		
Aquila clanga	۱۲/۴	۱۲/۴	۱۴/۴	۱۱/۹	۱۴/۹	۱۴/۹	۱۲/۰	۱۳/۲	۱۳/۲	۱۲/۶	۱۴/۷	۷/۹	۷/۲	۸/۳	

جدول ۵: فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای ژن COI در بین گونه‌های راسته جغدشکلان در استان مازندران

	Asio otus	*Strix aluco*	*Bubo bubo*	*Tyto alba*	*Otus scops*	*Athene noctua*
Asio otus						
Strix aluco	۱۵/۱					
Bubo bubo	۱۴/۹	۱۴/۳				
Tyto alba	۲۰/۸	۲۱/۱	۱۹/۵			
Otus scops	۱۵/۵	۱۵/۸	۱۵/۵	۲۰/۵		
Athene noctua	۱۶/۷	۱۷/۹	۱۶/۷	۱۸/۹	۱۷/۴	

بحث

در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن COI در ۳۶ نمونه از پرندگان شکاری استان مازندران مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که نمونه‌های به‌دست آمده، متعلق به ۲۷ گونه از ۴ تیره Falconidae، Accipitridae، Tytonidae و Strigidae است. به این ترتیب هر کدام از این کلادها را می‌توان به‌عنوان یک واحد تکاملی معرفی نمود که دارای یک‌پارچگی ژنتیکی است. لذا برای حفظ این یک‌پارچگی و افزایش سازگاری‌های ژنتیکی در مقابله با تغییرات محیط‌زیستی لازم است تا هر کلاد به‌صورت جداگانه در طرح مدیریتی جداگانه قرار گیرد (Carcraf، ۱۹۸۳؛ Zink و همکاران، ۲۰۰۰).

تمامی ۲۷ گونه شناسایی شده، شباهت توالی نوکلئوتیدی ۹۸ تا ۱۰۰ درصدی در مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی بارکد داده‌های حیاتی و مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری نشان دادند. در مطالعه Park و همکاران (۲۰۱۱) که با تمرکز بر پرندگان شکاری و سایر گونه‌های پرنده کره جنوبی انجام گرفت، نشان داده شد که تمامی گونه‌های شناسایی شده دارای شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصدی با بانک‌های جهانی دی‌ان‌بارکدینگ‌دارندو توالی‌های دی‌ان‌ای که شباهت

۸۲ تا ۹۰ درصدی با توالی‌های ثبت شده دارد، قادر به شناسایی دقیق گونه نخواهد بود.

براساس درخت تبارشناسی بیزین و حداکثر درست‌نمایی، روابط ژنتیکی مورد بازسازی قرار گرفت که در نهایت ۳۶ نمونه به‌دست آمده از پرندگان شکاری استان مازندران در ۲۷ گونه و ۱۴ جنس مختلف قرار گرفت. براین اساس، دو خانواده جغد انبار و جغدها در ابتدا به صورت کلاد خواهری با احتمال پسین و بوت استرپ بالایی (احتمال پسین ۱ و بوت استرپ ۱۰۰) از یکدیگر و هم‌چنین با احتمال پسین ۱ و بوت استرپ ۱۰۰ از خانواده شاهین تفکیک شدند و در نهایت خانواده عقاب‌ها به‌عنوان قدیمی‌ترین گونه‌ها از سایر خانواده‌های پرندگان شکاری جدا شدند. این در حالی است که Prum و همکاران (۲۰۱۵)، با بررسی بیش از ۳۹۰ هزار توالی (۲۵۹ لوکوس هسته‌ای) نوکلوتیدی ۱۹۸ گونه پرنده نشان دادند که خانواده عقاب‌ها یکی از قدیمی‌ترین راسته پرندگان به‌حساب می‌آید که در حدود ۶۵ میلیون سال قبل تکامل یافتند. هم‌چنین وجود دو کلاد خواهری جغدها و جغد انبار با زمان تکاملی حدود ۶۰ میلیون سال قبل در مطالعه مذکور اثبات گردید، بدین‌ترتیب بازسازی روابط تبارشناسی حاصل از نتایج مطالعه حاضر با نتایج قبلی هم‌سویی دارد.

برآورد فاصله ژنتیکی به‌عنوان یک روش رایج برای اعتبارسنجی گونه‌ها براساس‌داده‌های توالی‌ژنتیکی‌است(Zink و همکاران، ۲۰۰۴؛ Burbrink و Castoe، ۲۰۰۹؛ Torstrom و همکاران، ۲۰۱۴)، بدین ترتیب چنان‌چه مقدار فاصله‌ژنتیکی بین دو زیرگونه زیادباشد می‌توان هر کدام از آن‌ها را به‌عنوان یک گونه مجزا (Full species) ارتقا داد، این درحالی است که وجود فاصله ژنتیکی کم در بین دو زیر گونه نشان‌دهنده نزول آن‌ها به یک گونه یک‌پارچه (Single species) بوده است (Burbrink و همکاران، ۲۰۰۰؛ Makowsky و همکاران، ۲۰۱۰). Torstrom و همکاران (۲۰۱۴) در یک مطالعه مروری و با استفاده از فاصله ژنتیکی داده‌های میتوکندریایی به بررسی اعتبارسنجی زیرگونه‌های خزندگان پرداختند. براین اساس آن‌ها دریافتند که بیش از ۶۰ درصد زیرگونه‌های مورد بررسی بایستی به‌عنوان گونه‌های مجزا شناخته‌شوند و ۴۰ درصد زیرگونه‌های خزندگان به یک‌گونه یک‌پارچه معرفی شوند. به‌نظر می‌رسد که آرایه‌شناسی زیرگونه‌های پرندگان هم مانند خزندگان احتیاج به بازنگری اساسی دارد (Zink، ۲۰۰۴؛ Torstrom و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهش حاضر میانگین واگرایی ژنتیکی بین گونه‌ای در راسته شاهین‌شکلان ۸/۵ درصد به‌دست آمد درحالی‌که این میزان در دو راسته عقاب شکلان و جغدشکلان ۱۱/۸ و ۱۵/۴ به‌دست آمد. بالا بودن این میزان نرخ واگرایی در جغدشکلان می‌تواند حاکی از وقوع فرآیندهای تکاملی در بین گونه‌های این راسته باشد. به‌عبارت دیگر وقوع فرآیندهای تکاملی در زمان‌های طولانی باعث افزایش میزان واگرایی در بین گونه‌ها خواهد شد .

همان‌طورکه نتایج و دستاوردهای این پژوهش نشان می‌دهد، درخت‌تبارشناسی پرندگان شکاری استان مازندران بر اساس ژن COI، پرندگان شکاری این استان را به‌خوبی در کلادهای خوشه‌ای مجزا از یکدیگر تفکیک‌وطبقه‌بندی کرده است.هم‌چنین باتوجه به تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌ای، توالی ژن COI به‌خوبی فاصله مولکولی موجود در هر گونه را نشان می‌دهد و با استفاده از معیار واگرایی یا فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای که حداقل ده برابر مقدار واگرایی ژنتیکی درون گونه‌ای است می‌توان کمیتی را برای تمایز بین گونه های مختلف ارائه نمود که این مورد نیز با مطالعات پیشین مطابقت دارد (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳). در این راستا فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای در راسته شاهین‌شکلان بین ۵/۱ تا ۱۲/۳، عقاب‌شکلان بین۳/۹ تا ۱۶/۳ و جغدشکلان درمحدوده ۱۴/۳ تا ۲۰/۸ قرار گرفت، بدین‌ترتیب می‌توان محدوده شناسایی گونه در پرندگان شکاری مورد مطالعه را براساس محدوده مذکور تعریف نمود (Torstrom و همکاران، ۲۰۱۴؛ Kerr و همکاران، ۲۰۱۰) و هم‌چنین از این معیار فاصله ژنتیکی می‌توان برای تشخیص گونه‌ها از یکدیگر در این سه راسته و در مواقع لازم برای تشخیص وقوع جرم و تشخیص گونه مربوطه سود برد.

منابع

۱. **بختیاری، پ.، ۱۳۹۳.** پرنده‌های شکاری ایران. انتشارات ایران شناسی. ۴۵۶ صفحه.

۲. **قایدی، ف.؛ ذوالقرنین، ح.؛ نبوی، م.ب.؛ سواری، ا. و سالاری، م.ع.، ۱۳۹۷.** شناسایی گونه *Callista umbonella* (bivalve: Veneridae)با تاکید بر مطالعات مورفولوژیک و مولکولی. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. دوره۱۰، شماره ۱، صفحات ۳۳۷ تا ۳۴۴.

۳. **کابلی، م.؛ علی‌آبادیان، م.؛ توحیدی‌فر، م.؛ هاشمی، ع. و روزلار، ک.، ۱۳۹۱.** اطلس پرندگان ایران. سازمان حفاظت محیط زیست. ۶۶۵ صفحه.

4. **Aliabadian, M; Kaboli, M; Nijman, V. and Vences, M; 2009.** Molecular Identification of Birds: Performance of Distance-Based DNA Barcoding in Three Genes to Delimit Parapatric Species. Plos One. Vol, 4, pp: 1-8.

5. **Bertolazzi, P.; Felici, G. and Weitschek, E., 2009.** Learning to classify species with barcodes. BMC Bioinformatics. Vol. 10, No. 14, pp: S7.

6. **Blaxter, M.L; 2004.** The promise of a DNA taxonomy. The Royal Society. Vol :359, pp: 669-679.

7. **Burbrink, F.T; Lawson, R. and Slowinski, J.B., 2000.** Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (Elaphe obsoleta): a critique of the subspecies concept. Evolution. Vol. 54, pp: 2107-2118.

8. **Burbrink, F.T. and Castoe, T.A., 2009.** Molecular phylogeography of snakes. Snakes: ecology and conservation. pp: 38-77.

9. **Carcraft, J., 1983.** Species concepts and speciation analysis. Curr. Ornithol. Vol. 1, pp: 159-187.

10. **Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. and Posada, D., 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods. Vol. 9, pp: 772-772.

11. **Dawnay, N.; Ogden, R.; Mcewing, R.; Carvalho, G.R. and Thorpe, R.S., 2007.** Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International. Vol. 15, No. 1, pp: 1-6.

12. **Frezal, L. and Leblois, R., 2008.** Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. Infection, Genetics and Evolution. Vol. 8, pp: 727-736.

13. **Guindon, S. and Gascuel, O., 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic biology. Vol. 52, pp: 696-704.

14. **Hajibabaei, M.; Janzen, D.H.; Burns, J.M.; Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N., 2006.** DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera . Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Vol. 103, pp: 968-971.

15. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Philosophical Transactions of the Royal Society B. Vol. 270, pp: 313-321.

16. **Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemlak, T.S. and Francis, C.M., 2004.** Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biology. Vol. 2, pp: 312.

17. **Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. Vol. 17, pp: 754-755.

18. **Kerr, K.; Stoeckle, M.; Dove, C.; Weigt, L.; Francis, C. and Hebert, P., 2007.** Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Molecular ecology notes. Vol. 7, pp: 535-543.

19. **Kerr, K.C.R.; 2010.** Exploring the efficacy, utility, and limitations of DNA barcoding within the class Aves. 148 p.

20. **Makowsky, R.; Marshall Jr, J.C.; McVay, J.; Chippindale, P.T. and Rissler, L.J., 2010.** Phylogeographic analysis and environmental niche modeling of the plain bellied watersnake (*Nerodia erythrogaster*) reveals low levels of genetic and ecological differentiation. Molecular phylogenetics and evolution. Vol. 55, pp: 985-995.

21. **Park, H.Y.; Yoo, H.S.; Jung, G. and Kim, C.B., 2011**. New DNA barcodes for identification of Korean birds. Genes & Genomics. Vol. 33, pp: 91-95.

22. **Prum, R.O.; Berv, J.S.; Dornburg, A.; Field, D.J.; Townsend, J.P.; Lemmon, E.M. and Lemmon, A.R., 2015.** A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. Nature. Vol. 526, pp: 569-573.

23. **Rubinoff, D., 2006.** DNA barcoding evolution into the familiar. Conservation Biology. Vol. 5, pp: 1548-1589.

24. **Rubinoff, D., 2006.** Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Specie Conservation. Conservation Biology. Vol. 20, pp: 1026-1033.

25. **Smith, M.A.; Poyarkov, N.A. and Hebert, P.D.N., 2008.** CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Molecular ecology resources. Vol. 8, pp: 235-246.

26. **Stoeckle, M.; Janzen, D.; Hallwachs, W.; Hanken, J. and Baker, J., 2003.** Taxonomy DNA, and the Barcode of Life. Draft Conference Report. 10-12 september. New York.

27. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. Vol. 28, pp: 2731-2739.

28. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J.; 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic acids research. Vol. 22, pp: 4673-4680.

29. **Torstrom, S.M.; Pangle, K.L. and Swanson, B.J., 2014.** Shedding subspecies: The influence of genetics on reptile subspecies taxonomy. Mol. Phylogenet. Evol. Vol. 76, pp: 134-143.

30. **Valentini, A.; Pompanon, F. and Taberlet, P., 2008.** DNA barcoding for ecologists. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 24, pp: 110-117.

31. **Ward, R.W.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. and Hebert, P.D.N., 2005.** DNA barcoding Australia's fish species . Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. Vol. 360 , pp: 1847- 1857 .

32. **Zink, R.M.; Barrowclough, G.F.; Atwood, J.L. and Blackwell-Rago, R.C., 2000.** Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California Gnatcatcher. Conserv. Biol. Vol. 14, pp: 1394.

33. **Zink, R.M., 2004.** The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences. Vol. 271, pp: 561-564.