Archive of SID

مجله علمی شیلات ایران (DOI): 10.22092/ISFJ.2019.119160 سال بیست و هشت/ شماره ۳

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

بررسی آرایه‌شناسی گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران با استفاده از زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز COI

سهیل ایگدری*[۱]، آرش جولاده رودبار[۱]، جلیل ایمانی هرسینی[۲]، محسن رستمی[۲]

*soheil.eagderi@ut.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲- گروه مهندسی منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

تاکنون ۱۲ گونه از کپورماهیان جنس *Alburnoides* در ایران بر اساس صفات ریخت‌شناسی توصیف‌شده است. ویژگی‌های کلیدی تخصیص داده شده به این گونه‌ها فاقد کارایی لازم جهت شناسایی آنهاست، بنحوی که با استفاده از این ویژگی‌ها نمی‌توان گونه‌های توصیف شده را از یکدیگر تشخیص داد. از اینرو، این تحقیق به منظور بررسی روابط آرایه‌شناسی و اعتبارسنجی گونه‌های توصیف شده با استفاده از نشانگر مولکولی زیر واحد I ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) به اجرا درآمد. برای این منظور تعداد ۷۰ نمونه از اعضاء این جنس از ۲۰ ایستگاه مختلف در ۶ حوضه آبریز داخلی نمونه‌برداری شد. جهت تعیین تفاوت‌های ژنتیکی و روابط خویشاوندی، DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و ژن سیتوکروم COI طی فرآیند PCR تکثیر و پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شد. نتایج نشان داد که گونه‌های ایرانی جنس *Alburnoides* به هشت شاخه تقسیم می‌شوند. بیشترین فاصله ژنتیکی K2P درون گونه‌ای، مابین نمونه‌های گونه *A. samiii* و کمترین میزان بترتیب در بین نمونه‌های *A. coadi*، *A. holciki*، *A. parhami* و *A. nicolausi* محاسبه گردید. همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی K2P بین‌گونه‌ای به میزان ۷/۵۶ بین دو گونه *A. qanati* و *A. holciki* و کمترین میزان به مقدار ۰/۳۳ بین دو گونه *A. parhami* و *A. holciki* بدست آمد. با توجه به نتایج، به دلیل تمایز اندک ژنتیکی بر اساس ژن COI، اعتبار گونه‌های *A. parhami*، *A. coadi* و *A. nicolausi* تائید نگردید و پیشنهاد می‌گردد که بترتیب مترادف گونه‌های *A. holciki*، *A. namaki* و *A. idignensis* در نظر گرفته شوند.

لغات کلیدی: ماهی خیاطه، تنوع ریختی، تنوع ژنتیکی، آرایه‌شناسی، ایران

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

مقدمه

هر ساله گونه‌های جدیدی از فون ماهیان آبهای داخلی ایران شناسایی و توصیف می‌گردند. بر اساس مطالعه Esmaeili و همکاران (۲۰۱۰) ماهیان آبهای داخلی ایران ۲۰۲ گونه گزارش شده بودند که با توجه به آخرین مطالعات، این تعداد به ۲۹۷ گونه رسیده است (Esmaeili *et al*., 2018). در سالیان اخیر کاربرد روش‌های مبتنی بر تحلیل ساختار ژنتیک موجودات زنده، منجر به تغییرات فراوان در آرایه‌شناسی ماهیان گردیده است. برخلاف گذشته که شناسایی و توصیف ماهیان صرفاً براساس روش‌های ریخت‌شناسی صورت می‌گرفت، امروزه از روش‌های مبتنی بر داده‌های مولکولی نیز استفاده می‌گردد و این امر سبب گردیده است که در برخی موارد جایگاه آرایه‌شناسی گونه‌ها تغییر نماید (Freyhof *et al*., 2014; Jouladeh-Roudbar *et al*., 2015b).

خانواده کپورماهیان در ایران مشتمل بر ۴۲ جنس است که در برگیرنده ۱۲۳ گونه معتبر می‌باشد (Esmaeili *et al*., 2018). جنس *Alburnoides* با داشتن ۹ گونه بومزاد از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده است. تا پیش از سال ۲۰۰۹، این جنس در ایران تنها شامل گونه *A. bipunctatus* بود که به عنوان یک گونه کمپلکس، شامل تعداد زیادی زیرگونه می‌شد. تحقیقات بعدی منجر به توصیف ۱۲ گونه جدید گردید (Bogutskaya and Coad, 2009 a, b; Mousavi-Sabet *et al*., 2015a, b). این گونه‌ها شامل *A. eichwaldii*، *A. samiii*، *A. tabarestanensis* و *A. parhami* از حوضه آبریز دریای خزر، *A. holciki* از حوضه آبریز هریرود، *A. petrubanarescui* از حوضه آبریز ارومیه، *A. namaki* از حوضه آبریز نمک، *A. coadi* و *A. damghani* از حوضه آبریز دشت کویر، *A. nicolausi* و *A. idignensis* از حوضه آبریز تیگریس و *A. qanati* از حوضه آبریز کر و سیرجان می‌باشند (Esmaeili *et al*., 2018). تمامی این گونه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناسی توصیف شده‌اند و از لحاظ ظاهری بسیار شبیه به یکدیگر هستند و تشخیص آنها از یکدیگر مشکل می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که ویژگی‌های کلیدی تخصیص داده شده به این گونه‌ها فاقد کارایی لازم جهت شناسایی آنهاست، بنحوی که با استفاده از این ویژگی‌ها نمی‌توان گونه‌های توصیف شده را از یکدیگر تشخیص داد (جولاده رودبار و همکاران، ۱۳۹۴؛ جعفری و همکاران، ۱۳۹۸).

مطالعات مولکولی اندکی در مورد ماهیان جنس *Alburnoides* در ایران انجام شده است. حقیقی و همکاران (۱۳۹۳) با استفاده از شش جفت نشانگر مولکولی ریزماهواره ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides echiwaldii*) را در رودخانه‌های گرگان‌رود و چالوس مورد بررسی قرار دادند. همچنین جولاده رودبار و ایگدری (۱۳۹۵) روابط تبارشناسی جمعیت‌های مختلف گونه *A. namaki* را با استفاده از ژن COI مورد بررسی قرار دادند. تنها مطالعه جامع انجام شده در مورد آرایه‌شناسی ماهیان جنس *Alburnoides* در ایران براساس ژن COI مربوط به مطالعه Jouladeh-Roudbar و همکاران (۲۰۱۵b) است که در توصیف گونه *A. damghani*، جایگاه تبارزایی برخی گونه‌های این جنس ارائه شده است. همسو با این مطالعه، این تحقیق به منظور بررسی روابط آرایه‌شناسی و اعتبارسنجی گونه‌های توصیف‌شده جنس *Alburnoides* در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ژن COI به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای انجام این مطالعه طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۲ از ۲۰ ایستگاه مشتمل بر ۶ حوضه آبریز با استفاده از دستگاه الکتروشوکر نمونه‌برداری انجام شد (جدول ۱). نمونه‌ها جهت انجام مطالعات مولکولی در الکل ۹۶ درصد تثبیت و به آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل گردیدند. از حوضه آبریز ارومیه، نمونه‌ای از گونه *A. petrubanarescui* صید نگردید.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از روش بهینه‌شده فنل-کلروفروم صورت گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

جدول ۱: ایستگاه‌های نمونه‌برداری جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف جنس *Alburnoides* در این مطالعه.

Table 1: Sampling stations of different populations and species if the studied members of the genus *Alburnoides*.

ردیف	گونه	حوضه	نام ایستگاه	شناسه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	*A. holciki*	هریرود	هریرود	Har۱-۲	۶۱˚۰۵′	۳۵˚۵۷′
۲	*A. parhami*	کاسپین	بابا امان	Bab۱-۳	۵۷˚۲۶′	۳۷˚۲۹′
۳	*A. tabarestanensis*	کاسپین	تجن	Taj۱-٦	۵۳˚۱۹′	۳۶˚۱۱′
۴	*A. tabarestanensis*	کاسپین	سیاه	Sia۱-۳	۵۲˚۵۳′	۳۶˚۲۹′
۵	*A. samiii*	کاسپین	سفید	Sef۱-۳	۴۹˚۳۰′	۳۶˚۵۳′
۶	*A. eichwaldii*	کاسپین	قره‌سو	Qsu۱-۲	۴۸˚۰۱′	۳۸˚۳۰′
۷	*A. eichwaldii*	کاسپین	بالخلوچای	Bal۱-۲	۴۸˚۲۰′	۳۸˚۱۹′
۸	*A. eichwaldii*	کاسپین	ارس	Ars۱-۷	۴۵˚۳۵′	۳۸˚۵۷′
۹	*A. damghani*	کویر	چشمه‌علی	Che۱-۳	۵۴˚۰۴′	۳۶˚۱۶′
۱۰	*A. coadi*	کویر	نمرود	Nam۱-٥	۵۲˚۳۹′	۳۵˚۴۲′
۱۱	*A. namaki*	نمک	قره چای	Qar۱-٦	۵۰˚۰۲′	۳۴˚۵۳′
۱۲	*A. namaki*	نمک	آبکمر	Abk۱-۲	۴۹˚۵۷′	۳۴˚۴۴′
۱۳	*A. idignensis*	تیگریس	آران	Ara-۱	۴۷˚۵۵′	۳۴˚۲۴′
۱۴	*A. idignensis*	تیگریس	بید سرخ	Bid۱-٤	۴۷˚۴۵′	۳۶˚۲۴′
۱۵	*A. idignensis*	تیگریس	ده نو	Deh۱-۳	۴۷˚۸۹′	۳۴˚۴۲′
۱۶	*A. idignensis*	تیگریس	بیستون	Bis۱-۲	۴۷˚۲۶′	۳۴˚۲۳′
۱۷	*A. idignensis*	تیگریس	گاماسیاب	Gam۱-۲	۴۶˚۳۹′	۳۴˚۲۳′
۱۸	*A. nicolausi*	تیگریس	نورآباد	Nor۱-۳	۴۷˚۵۸′	۳۴˚۰۳′
۱۹	*A. holciki*	کر	کر	Kor۱-٤	۵۴˚۴۱′	۳۰˚۰۲′
۲۰	*A. parhami*	کر	پلوار	Pul۱-۳	۵۲˚۵۴′	۲۹˚۵۲′

در این روش قطعات باله سینه‌ای سمت راست در بافر استاندارد STE به همراه پروتئیناز K به‌مدت۲۴ ساعت هضم و سپس خالص‌سازی با استفاده از فنل و کلروفرم انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، در آب مقطر حل شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز انجام شد (نیک‌مهر و همکاران، ۱۳۹۷).

واکنش PCR

آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر بخشی از ناحیه COI شامل آغازگرهای یونیورسال رفت (FishF1-(5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') و برگشت FishR1-(5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') بودند (Ward *et al*., 2005). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرو لیتر شامل ۲۵ میکرولیتر Taq 2X Mastermix red، یک میکرولیتر آغازگر رفت و یک میکرو لیتر آغازگر برگشت (۱۰ µm)، ۵ میکرولیتر DNA کل و ۱۸ میکرو لیتر H_2O بودند (نیک‌مهر و همکاران، ۱۳۹۷). برنامه دمایی PCR به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر پنج میکرولیتر از محصول PCR بر ژل آگارز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) گردید و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. سپس در معرض تابش نور U.V قرار داده شد و

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

باندهای حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر توسط چرخه PCR مشاهده گردید (نیک‌مهر و همکاران، ۱۳۹۷).

توالی‌یابی

به منظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و در نهایت جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعات تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای یونیورسال FishF1 وFishR1 (Ward *et al*., 2005) شدند.

آنالیز داده‌ها

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدند (Hall, 1999). عملیات انطباق توالی‌های ژن COI با استفاده از نرم افزار ClustalX (1.83) انجام شد. به‌منظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی شجره‌شناسی، توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن NCBI با سایر توالی‌های موجود مقایسه شدند. مدل تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار MrModeltest انتخاب گردید (Nylander, 2015)، این نرم‌افزار مدل GTR+I+G و تکرار ۲۰ میلیون نسل را پیشنهاد نمود. برای بررسی شجره‌شناسی به روش Bayesian inference از نرم‌افزار MrBayes v3.1.2 و تکرار ۱/۵ میلیون نسل (Ronquist *et al*., 2012) و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML V 7.2.5 و ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Stamatakis, 2014). برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی از روش K2P و نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد (Kumar *et al*., 2008). همچنین برای ترسیم دارنگاره‌های ایجاد شده نیز از نرم‌افزار FigTree v1.4.2 استفاده گردید (Rambaut, 2015).

نتایج

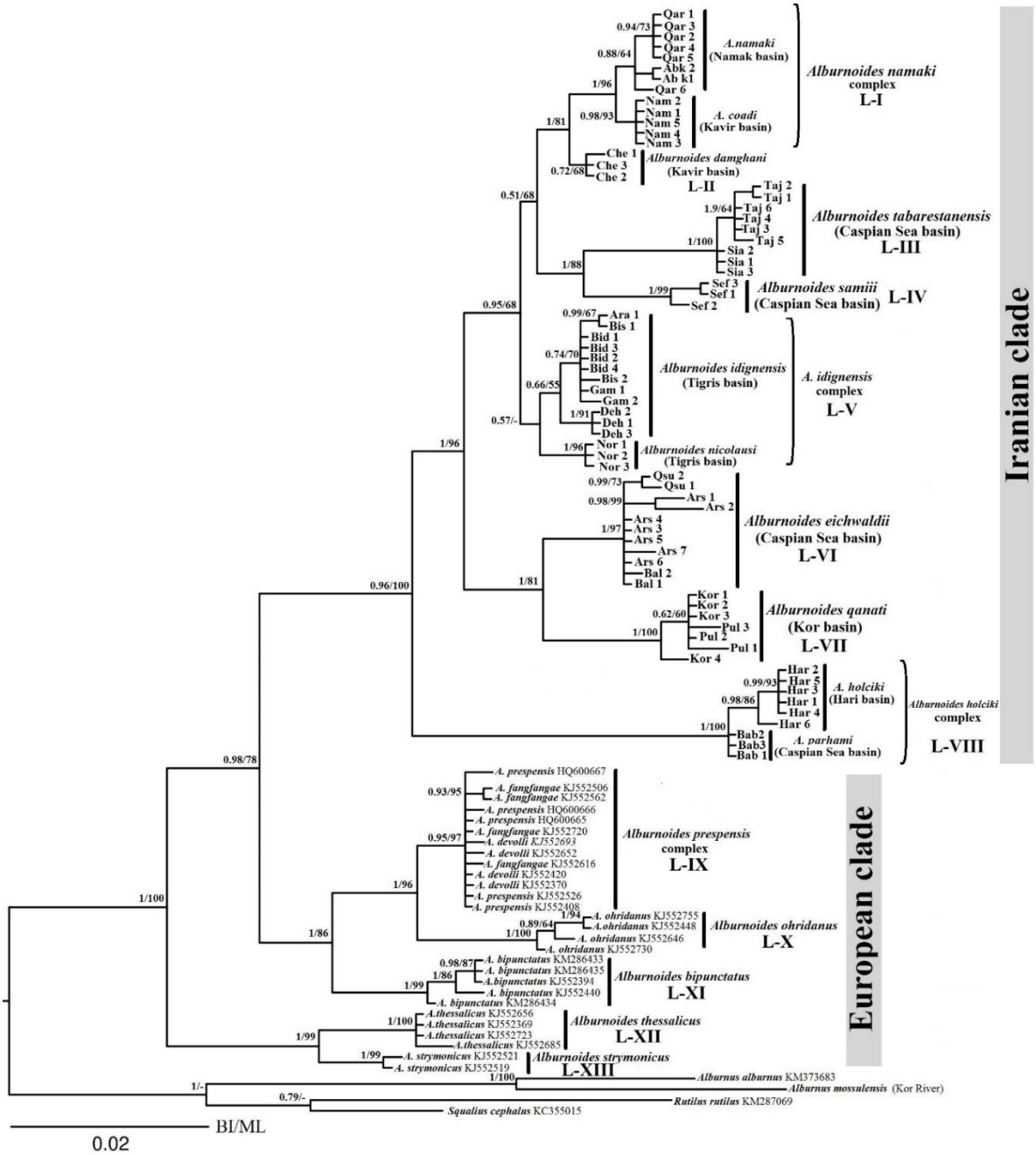
در این مطالعه توالی زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) برای ۷۰ نمونه متعلق به ۱۰ گونه اسمی از جنس *Alburnoides* (به جز گونه *A. petrubanarescui*) به طول ۶۲۰ جفت باز به‌دست آمد. هر دو دارنگاره ترسیم شده با استفاده از روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference دارای شکل مشابهی بودند. به همین دلیل تنها از دارنگاره Bayesian استفاده شده و اعداد بوت استرپ حاصله از هر دو آزمون بر گره‌ها درج گردید. بر اساس دارنگاره ترسیم شده نمونه‌های مورد مطالعه و اعضاء جنس *Alburnoides* که توالی آنها در بانک ژن موجود بود، اعضاء جنس *Alburnoides* به ۱۳ شاخه اصلی تقسیم شد که با اعداد بوت استرپ بالا قابل تأیید بودند. گونه‌های ایرانی جنس *Alburnoides* نیز به ۸ شاخه تقسیم شدند: شاخه اول L-I شامل گونه‌های *A. namaki* و *A. coadi*، شاخه دوم L-II شامل *A. damghani*، شاخه سوم L-III شامل *A. tabarestanensis*، شاخه چهارم L-IV شامل *A. samiii*، شاخه پنجم L-V شامل *A. idignensis* و *A. nicolausi*، شاخه ششم L-VI شامل *A. eichwaldii*، شاخه هفتم L-VII شامل *A. qanati* و شاخه هشتم L-VIII شامل *A. holciki* و *A. parhami* می‌باشد (شکل ۱).

با توجه به نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P درون گونه‌ای نمونه‌های مورد مطالعه، بیشترین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در بین نمونه‌های گونه *A. samiii* و کمترین میزان آن در بین نمونه‌های گونه‌های *A. coadi*، *A. holciki*، *A. parhami* و *A. nicolausi* محاسبه گردید. کم بودن فاصله ژنتیکی (K2P) درون‌گونه‌ای می‌تواند به دلیل خویشاوندی نزدیک نمونه‌های این سه گونه باشد، زیرا هر کدام از این گونه‌ها فقط از یک ایستگاه صید شده‌اند (جدول ۲). همچنین نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین‌گونه‌ای نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۷/۵۶ بین دو گونه *A. qanati* و *A. holciki* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۳۳ بین دو گونه *A. parhami* و *A. holciki* بدست آمد (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019



شکل ۱: دارنگاره ترسیم شده به روش BI و ML . شماره دسترسی نمونه‌های بانک ژن در جلوی آن‌ها نوشته شده است، اعداد بالای گره‌ها عدد Bootstrap بدست آمده است. برای ML حدود ۱۰۰۰ تکرار و برای BI حدود ۱/۵ میلیون نسل محاسبه گردید.

Figure 1: Phylogenetic tree based on Bayesian and Maximum likelihood inferred from COI data. Numbers After each species correspond to the GenBank accession number. Values at nodes correspond to BI posterior probability/ML bootstrap.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

جدول ۲: میانگین فاصله ژنتیکی K2P (درصد) درون گونه‌ای و اطلاعات ایستگاه‌های نمونه‌برداری
Table 2: Intraspecies mean genetic distance K2P (%) and sampling stations data.

ردیف	گونه	میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای	نام ایستگاه و تعداد نمونه	فاصله ایستگاه تا محل تیپ (KM)
۱	*A. coadi*	۰/۰۰	نمرود:۵	۰/۱۰
			ارس:۷	
۲	*A. eichwaldii*	۰/۳۳	قره‌سو:۲	*
			بالخلوچای:۲	
۳	*A. idignensis*	۰/۱۹	آران:۱	۱۰/۸
			بید سرخ:۴	۰/۵
			بیستون:۲	۴۲/۲
			گاماسیاب:۲	۲/۱
			ده نو:۳	۹/۱
۴	*A. qanati*	۰/۴۳	پلوار:۳	۲۰/۲
			کر:۴	۱۲/۱
۵	*A. namaki*	۰/۲۰	آب‌کمر:۲	۹۵/۳
			قره چای:۶	۹۳/۳
۶	*A. tabarestanensis*	۰/۱۸	تجن:۶	۰/۱
			سیاهرود:۳	۳۳/۶
۷	*A. holciki*	۰/۰۰	هریرود	۱/۰
۸	*A. samiii*	۰/۵۶	سفیدرود	۵/۱
۹	*A. parhami*	۰/۰۰	بابا امان	۰/۵
۱۰	*A. nicolausi*	۰/۰۰	نورآباد	۶/۵

*محل تیپ کاملاً مشخص نیست. بنابراین، فواصل ایستگاه‌ها تا محل تیپ ارائه نگردید.

جدول ۳: میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌های مورد مطالعه بر اساس توالی ژن COI
Table 2: Interspecies mean genetic distance K2P (%) of the studied species based on COI gene sequence.

ردیف	گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	*A. coadi*										
۲	*A. eichwaldii*	۲۲/۴									
۳	*A. holciki*	۱۸/۶	۳۵/۷								
۴	*A. idignensis*	۵۵/۱	۲۹/۳	۰۳/۶							
۵	*A. namaki*	۵۰/۰	۴۲/۴	۶۱/۶	۷۳/۱						
۶	*A. nicolausi*	۶۹/۱	۷۷/۳	۳۹/۶	۸۶/۰	۸۷/۱					
۷	*A. parhami*	۷۸/۵	۹۳/۶	۳۳/۰	۶۲/۵	۲۰/۶	۹۸/۵				
۸	*A. qanati*	۰۳/۵	۲۸/۳	۵۶/۷	۱۰/۴	۲۴/۵	۶۳/۴	۱۴/۷			
۹	*A. samiii*	۳۰/۳	۱۵/۵	۰۶/۷	۷۳/۲	۵۰/۳	۹۴/۲	۶۵/۶	۱۹/۶		
۱۰	*A. tabarestanensis*	۶۸/۳	۳۵/۵	۴۱/۷	۱۶/۳	۸۸/۳	۳۰/۳	۴۱/۷	۲۲/۶	۹۰/۳	
۱۱	*A. damghani*	۸۹/۰	۷۲/۳	۰۶/۶	۰۹/۱	۰۶/۱	۲۳/۱	۶۶/۵	۰۸/۴	۷۰/۲	۱۹/۳

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]

Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

بر اساس نتایج، بین دو گونه *A. coadi* و *A. namaki* تنها در نوکلئوتید ۳۹۵ اختلاف وجود دارد C↔A و بین دو گونه *A. holciki* و *A. parhami* تنها یک مورد چندشکلی در جایگاه ۶۱۵ وجود دارد که در آن G↔A تغییر یافته است. این وضعیت در مورد گونه *A. idignensis* و *A. nicolausi* نیز صدق می‌کند در این دو گونه نیز در جایگاه‌های شماره ۸۷ و ۴۸۷ نوکلئوتید C↔T تغییر یافته است.

بحث

توالی ژن COI میتوکندریایی به طور گسترده در مطالعات تبارشناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا تغییرات آن نسبت به DNA هسته بسیار سریع‌تر بوده و در نتیجه توانایی بیشتری در بیان اختلافات بین گونه‌های نزدیک دارد (Ward *et al*., 2005). در پژوهش حاضر روابط خویشاوندی جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف جنس *Alburnoides* در ایران با استفاده از توالی ژن COI به منظور بررسی روابط آرایه‌شناسی و اعتبارسنجی گونه‌های توصیف شده به اجرا درآمد. نتایج نشان داد که آرایه‌شناسی اعضای این گونه در ایران نیازمند بازنگری می‌باشد، زیرا نتایج این پژوهش، نتایج پیشین (Bogutskaya and Coad, 2009 a, b; Seifali *et al*., 2012; Mousavi-Sabet *et al*., 2015) را در مورد تنوع گونه‌ای این جنس در ایران را نقض می‌نماید. اخیراً Mousavi-Sabet و همکاران (۲۰۱۵a, b) سه گونه جدید از جنس *Alburnoides* از حوضه آبریز دریای خزر شامل *A. samiii* از رودخانه سفیدرود، *A. tabarestanensis* از رودخانه تجن و *A. parhami* از رودخانه بابا امان (هر سه گونه از حوضه آبریز دریای خزر) را با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی توصیف نمودند. با توجه به نتایج این تحقیق اعتبار گونه‌های *A. samiii* و *A. tabarestanensis* قابل تأیید است. زیرا در درخت تبارشناسی ترسیم شده به روش ML و BI جمعیت‌های مورد مطالعه این دو گونه در دو خوشه مجزا قرار گرفته‌اند و با اعداد Bootstrap بالا تأیید می‌گردد. علاوه بر این، گونه‌های *A. tabarestanensis* و گونه *A. samiii* با نزدیک‌ترین گونه از جنس *Alburnoides* بترتیب در حدود ۳/۱۶ و ۲/۷۳ درصد تمایز دارند که این فاصله برای جدایی یک گونه قابل قبول می‌باشد (Jouladeh-Roudbar *et al*., 2015b). اما ژن COI گونه *A. parhami* با گونه *A. holciki* تمایز اندک و فاصله‌ای در حدود ۰/۳۳ درصد دارد. بعلاوه، با توجه به نتایج چندشکلی نوکلئوتیدی‌های تشخیصی ژن COI تنها یک نوکلئوتید میان این دو گونه متفاوت است که در آن نوکلئوتید A↔G در جایگاه ۶۱۵ تبدیل شده است. همچنین بر اساس نتایج دارنگاره فیلوژنی، نمونه‌های *A. parhami* در شاخه‌ای با فاصله‌ای بسیار اندک نسبت به گونه *A. holciki* قرار گرفته است. با توجه به این نتیجه اختلاف ۰/۳۳ درصد و تنها تغییر در یک نوکلئوتید نمی‌تواند دلیل کافی برای تمایز این گونه از *A. holciki* باشد. علاوه بر تفاوت اندک در ژن COI، ویژگی‌های ریختی تشخیصی ارائه شده برای گونه *A. parhami* کیل شکمی تیز و بدون فلس و فرمول ستون مهره ۲۰+۲۰ و ۲۰+۲۱ بیان شده است. نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش از محل تیپ *A. parhami* (رودخانه بابا امان، استان خراسان شمالی) دارای کیل شکمی فلس‌دار و نسبتاً گرد بودند (شکل ۲) و فرمول ستون مهره نیز ۱۹+۲۱ شمارش گردید (جولاده‌رودبار و ایگدری، ۱۳۹۵؛ حاجی‌پور و همکاران، ۱۳۹۸).

به علت محدودیت‌ها در استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی در آرایه‌شناسی ماهیان، امروزه صرفاً از ویژگی‌های ریختی استفاده نمی‌گردد. زیرا با تغییرات محیط، فنوتیپ ماهیان تنوع بالایی می‌یابد (Swain and Foote, 1999). بنابراین، برای جلوگیری از این نقیصه، از روش‌های مولکولی به عنوان روشی مکمل در جهت پوشاندن این خطاها استفاده می‌گردد. از اینرو، با توجه به نتایج، تفاوت‌های ریختی مشاهده شده بین دو گونه *A. holciki* و *A. parhami* مربوط به انعطاف‌پذیری ریختی آنها در پاسخ به شرایط محیطی باشد. زیرا تفاوت ژنتیکی میان *A. holciki* و *A. parhami* بسیار اندک است و بنظر می‌رسد سطحی عادی از تمایز درون جمعیتی باشد (Jouladeh-Roudbar *et al*., 2015b).

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]

Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

شکل ۲: نمای کیل شکمی، A: کیل شکمی پوشیده از فلس، *A. parhami*، B: کیل شکمی فاقد فلس، *A. namaki* و C: کیل شکمی نیمه پوشیده از فلس.

Figure 2: Ventral keel of (A) *A. parhami* covered with scales, (B) *A. namaki* without scales and (C) ventral keel partly covered with scales.

همچنین تغییرات بین جمعیت‌های ماهیان تا ۸۰ درصد و بیشتر تحت تأثیر اندازه نمونه‌های مورد مطالعه بواسطه تغییرات رشد ناهمسان نیز می‌تواند باشد (Turan, 2006).

فون ماهیان حوضه آبریز دشت کویر تا حد زیادی شبیه به فون ماهیان حوضه دریاچه نمک است که در مجاورت یکدیگر قرار دارند. علاوه بر این، حداقل شش گونه بومی مشترک در بین این دو حوضه نیز گزارش شده است (Jouladeh-Roudbar *et al*, 2015a). گونه *A. coadi* که از رودخانه نمرود در حوضه آبریز دشت کویر توصیف شده است (Mousavi-Sabet *et al*., 2015a, b)، بر اساس نتایج حاصله از چندشکلی توالی نوکلئونیدهای تشخیصی تنها در یک نوکلئونید A←C (جایگاه ۳۹۵) با *A. namaki* اختلاف دارد و در درخت تبارشناسی نیز نمونه‌های *A. coadi* و *A. namaki* در دو خوشه نزدیک بهم قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، میانگین تمایز ژنتیکی K2P برای این دو گونه ۰/۵ درصد محاسبه گردید که این مقدار برای تمایز یک جمعیت به عنوان گونه‌ای جدید پایین است. برای مثال، تمایز درون جمعیتی گونه *A. samiii* از سایر گونه‌های جنس *Alburnoides* در حدود ۰/۵۶ درصد بدست آمد. اگر تمایز ژنتیکی ۰/۵ درصدی در *A. coadi* به عنوان ملاک در تمایز جمعیت به عنوان گونه‌ای جدید قرار بگیرد، اغلب جمعیت‌های *A. samiii* در رودخانه سفیدرود و جویبارهای اطراف آن پتانسیل تبدیل‌شدن به گونه‌های جدید را دارند. بر اساس نتایج، *A. coadi* جمعیت ناهمبوم *A. namaki* می‌باشد که به علت جدایی جغرافیایی و قرار گرفتن در شرایط متفاوت محیطی دارای تغییرات در ویژگی‌های ریختی شده است. پیش از این نیز وجود جدایی جغرافیایی در بین جمعیت‌های موجود در حوضه‌های آبریز ایران در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (Freyhof *et al*., 2014). وجود شرایط بوم شناختی متفاوت حاکم بر زیستگاه‌ها باعث می‌شود تا تنوع و نحوه سازگاری افراد مربوط به جمعیت‌ها متفاوت باشد. بنابراین، در پاسخ به این نوع سازگاری‌ها ویژگی‌های ریختی و حتی مولکولی افراد در حوضه‌های مختلف با همدیگر متفاوت است (Karakousis *et al*., 1991). تغییرات ریختی در پاسخ به فشارهای محیطی بسیار سریع‌تر از تغییرات ژنتیکی بروز می‌کند که این موجب افزایش بقاء در آنها می‌باشد. این نوع تغییرات سریع ریختی به عنوان سازگاری منطقه‌ای خوانده می‌شود و سبب بروز فنوتیپ‌های متنوع در سطح جمعیت‌ها می‌گردد (Mayr, 1963). در توصیف این گونه *A. coadi* از صفاتی مانند قطر چشم، فرم باله دمی، عرض سر، کیل شکمی و دیگر صفات نسبی استفاده شده است که بیشتر تحت تأثیر اندازه و محیط می‌باشد (Swain and Foote, 1999). Mayr (۱۹۶۳) معتقد است که در اکثر گونه‌های جانوری نسبت‌ها بویژه نسبت‌های مربوط به طول نسبی ضمائم مانند نسبت تنه

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

به سر و باله تغییرات زیادی می‌کند.

محل تیپ گونه *A. idignensis* نهر بید سرخ و محل تیپ گونه *A. nicolausi* رودخانه نورآباد است. محل تیپ این دو گونه به یکدیگر نزدیک است و رودخانه محل زیست آنها به فاصله چندین کیلومتر با یکدیگر تلاقی پیدا می‌کند. با توجه به دارنگاره ترسیم شده، این دو گونه در دو شاخه نزدیک به یکدیگر قرار گرفته‌اند. همچنین با توجه به چندشکلی نوکلئوتیدها، در جایگاه‌های شماره ۸۷ و ۴۸۷ نوکلئونید T↔C تبدیل شده است و میزان تمایز ژنتیکی این دو گونه با یکدیگر ۰/۸۶ محاسبه گردید. با توجه به نتایج بنظر می‌رسد دو گونه فوق دارای تمایز مولکولی چشمگیری از یکدیگر نیستند. جولاده رودبار و همکاران (۱۳۹۴) بیان نمودند که با توجه به کلید شناسایی ارائه شده، این دو گونه قادر به تفکیک از یکدیگر نمی‌باشند.

با توجه به نتایج در ارتباط بافاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در بین نمونه‌های مورد مطالعه، بنظر می‌رسد که نرخ جهش ژنتیکی درون گونه‌ای جنس *Alburnoides* نسبتاً زیاد است و ماهیان این جنس نسبت به تغییرات زیستگاهی، اقلیمی پاسخ سریعی از خود بروز می‌دهند که به تبع آن ساختار ژنتیکی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Levin *et al*., 2016). برای مثال، مطالعات هاشم زاده و همکاران (۱۳۹۳) بر برخی گونه‌های جنس *Capoeta* نشان داد که نرخ تمایز ژنتیکی درون جمعیتی در بین نمونه‌های مورد مطالعه حداکثر ۰/۱۷ درصد است، در حالیکه در این پژوهش این تمایز ۰/۵۶ درصد محاسبه گردید. میزان تمایز ژنتیکی در بین راسته، جنس، گونه و حتی درون جمعیت‌های گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت است و عدد ثابتی نمی‌باشد. برای مثال، بر اساس مطالعات Ward و همکاران (۲۰۰۵) و Hubert و همکاران (۲۰۰۸)، تنوع ژنی درون گونه‌ای حدود ۰/۳۹ درصد برای ماهیان دریایی و ۰/۲۷ درصد برای ماهیان آب شیرین کانادا گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، می‌توان بیان داشت که از حدود نه سال پیش تاکنون ۱۱ گونه جدید از جنس *Alburnoides* در ایران براساس صفات ریختی توصیف شده‌اند. اگر بر اساس این رویه کوچک‌ترین تمایز ریختی به‌عنوان ملاکی برای توصیف گونه‌های جدید قرار گیرد، به احتمال فراوان گونه‌های توصیفی این جنس در ایران بسیار زیاد خواهند شد. با توجه به نرخ تمایز فنوتیپی و ژنتیکی بالا در گونه‌های این جنس پیشنهاد می‌گردد. برای جلوگیری از خطا در توصیف گونه‌های جدید، از مارکرهای میتوکندریایی و هسته‌ای به صورت همزمان استفاده گردد. همچنین براساس نتایج، اعتبار سه گونه *A. coadi*، *A. parhami* و *A. nicolausi* از لحاظ مولکولی تأیید نگردید و بر همین اساس پیشنهاد گردید گونه *A. coadi* مترادف *A. namaki*، گونه *A. parhami* مترادف *A. holciki* و گونه *A. nicolausi* مترادف *A. idignensis* در نظر گرفته شود.

منابع

جعفری، ا.، هدایتی، س.ع.ا.، زین العابدینی، م.، پورباقر، ه.، قربانی، ر.، عبدالحی، ح.، ۱۳۹۸. بررسی تغییرات ریختی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 در طول سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۱): ۱۵۹-۱۶۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118388

جولاده رودبار، آ.، رحمانی، ح.، وطن دوست، ص.، نجفی. م. و رحیمی، ق.، ۱۳۹۴. بازنگری آرایه شناسی چهار گونه توصیف شده از جنس *Alburnoides*با استفاده از ویژگی‌های ریخت شناختی. بوم‌شناسی آبزیان، ۵(۲): ۱۷-۱.

جولاده رودبار، آ. و ایگدری، س.، ۱۳۹۵. بررسی روابط تبارشناسی گونه *Alburnoides namaki* Bogutskaya and Coad, 2009 با استفاده از ژن COI. ژنتیک نوین، ۱۱(۴): ۵۳۸-۵۳۱.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

حاجی‌پور، ن.، سیف ریحانی، م.ر.، اسمعیل نژاد، ب.، ۱۳۹۸. بررسی تغییرات رژیم غذایی ، شاخص‌های تغذیه‌ای و درصد بروز ایکتیوفتریوزیس در ماهی خیاطه (*Alburnoides bipunctatus*) رودخانه کلیبرچای. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۱): ۱۵۸-۱۵۵. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117958

حقیقی، ا.، ستاری، م.، سالار درافشان، س. و کیوانی، ی.، ۱۳۹۳. ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides echiwaldii*)در رودخانه‌های کرگان‌رود و چالوس. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۶(۱۹): ۱۴-۱.

نیک‌مهر، ن.، ایگدری، س. و پورباقر، ه.، ۱۳۹۷. بررسی جایگاه آرایه شناسی گاوماهی ایرانی *Ponticola iranicus* (Teleost, Gobiidae) براساس زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز COI. نشریه شیلات، ۷۱ (۲): ۱۱۷-۱۱۲.

هاشم‌زاده، ا.، عبدلی، ا.، پوراحمد، ر.، پوریا، م. و گلزاریان پور، ک.، ۱۳۹۳. تهیه بارکد ژنتیکی ماهیان جنس *Capoeta* در سر شاخه های کارون و دجله. نشریه شیلات، ۹(۲): ۱۷۸-۱۷۱.

Bogutskaya, N. and Coad, B., 2009a. *Alburnoides qanati*, a new species of cyprinid fish from southern Iran (Actinopterygii, Cyprinidae). *ZooKeys*, 7(13): 67-74. DOI: 10.3897/zookeys.579.7665

Bogutskaya. N. and Coad, B., 2009b. A review of vertebral and fin-ray counts in the genus *Alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae) with a description of six new species. *Zoosystematica Rossica*, 18 (1): 126-73.

Esmaeili, H., Coad, B., Gholamifard, A., Nazari, N. and Teimory, A., 2010. Annotated checklist of the freshwater fishes of Iran. *Zoosystematica Rossica*, 19 (2): 361-86.

Esmaeili, H.R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Abbasi, K., 2018. Checklist of freshwater fishes of Iran *FishTaxa*, 3(3): 1-95.

Freyhof, J., Esmaeili, H.R., Sayyadzadeh, G. and Geiger, M., 2014. Review of the crested loaches of the genus *Paracobitis* from Iran and Iraq with the description of four new species (Teleostei: Nemacheilidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 25(1):11-38.

Hall, T., 1999. BioEdit software, version 5.0. 9. North Carolina State University, Raleigh, NC.

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, E., Taylor, E., Burridge, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P. and Zhang, J., 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS One*, 3(6): e2490. DOI: 10.1371/journal.pone.0002490

Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S. and Esmaeili, H., 2015a. Fishes of the Dasht-e Kavir basin of Iran: an updated checklist. *International Journal of Aquatic Biology*, 3 (4): 263-73.

Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S., Esmaeili, H.R., Coad, B.W., Bogutskaya, N., 2015b. A molecular approach to the genus *Alburnoides* using COI sequences data set and the description of a new species, *A. damghani*, from the Damghan River system (the Dasht-e Kavir Basin, Iran) (Actinopterygii, Cyprinidae). *ZooKeys*, 579: 157–181. DOI: 10.3897/zookeys.579.7665.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]
Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. and Economidis, P.S., 1991. Morphological variability among seven populations of brown trout, *Salmo trutta* L., in Greece. *Journal of fish Biology*, 38(6): 807-17. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1991.tb03620.x

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 299-306. DOI: 10.1093/bib/bbn017

Levin, B. A., Simonov, E., Matveyev, M. P., Artaev, O. N., Mustafayev, N. J., Pashkov, A. N. and Roubenyan, H. R., 2016. DNA barcoding of the fishes of the genus *Alburnoides* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Caucasus. Mitochondrial DNA Part A, 1-7. DOI: 10.1080/24701394.2016.1238900

Mayr, E., 1963. Animal species and evolution. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press.

Mousavi-Sabet, H., Anvari Far, H. and Azizi, F., 2015a. *Alburnoides tabarestanensis*, a new species of riffle minnow from the southern Caspian Sea basin in Iran (Actinopterygii: Cyprinidae). *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 21(3): 144-157.

Mousavi-Sabet, H., Vatandoust, S. and Doadrio, I., 2015b. Review of the genus *Alburnoides* Jeitteles, 1861 (Actinopterygii, Cyprinidae) from Iran with description of three new species from the Caspian Sea and Kavir basins. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 13 (4): 293-331.

Nylander, J., 2015. MrModeltest v2. 3 software. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Sweden.

Rambaut, A., 2015. FigTree version 1.4. 0. Available at http://tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree.

Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P., Ayres, L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, A. and Huelsenbeck, P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology, 61(3): 539-42.

Seifali, M., Arshad, A., Moghaddam, F., Esmaeili, H., Kiabi, B., Daud, S. and Aliabadian, M., 2012. Mitochondrial Genetic Differentiation of spirlin (Actinopterigii: cyprinidae) in the south Caspian Sea basin of Iran. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 8: 219-227. DOI: 10.4137/EBO.S9207

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033

Swain, P. and Foote, J., 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 43 (1): 113-28.

Turan, C., 2006. The use of otolith shape and chemistry to determine stock structure of Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Steindachner). *Journal of*

www.SID.ir

Archive of SID

Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 360 (1462): 1847-57. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716

Ward, D., Zemlak, S., Innes, H., Last, R. and Hebert, D., 2005. DNA barcoding *Fish Biology*, 69:165-80. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2006.01266.x

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]

Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119160]

Downloaded from isfj.ir at 9:49 +0430 on Sunday August 18th 2019

Phylogeny of the members of the genus *Alburnoides* in Iran using COI gene

Eagderi S.[1*]; Jouladeh-Roudbar A.[1]; Imani Harsini J.[2]; Rostami M.[2]

[*]soheil.eagderi@ut.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2-Department of Natural Resources Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Up to now, twelve species of the genus *Alburnoides* belonged to Cyprinidae have been described from Iranian inland water solely based on the morphological characteristics. The described key characters for these species have no efficiency for their discrimination, and cannot help their precise diagnosis. Therefore, this study was conducted to study the phylogenetic relationship and verification of these species based on COI gene. For this purpose, 70 specimens of *Alburnoides* species were collected from 20 sampling sites in six Iranian inland water basins. To determination of inter- and intra-species genetic differences, the DNA of sampled specimens were extracted based on Phenol-chloroform method, their COI gene were amplified using thermal cycler and were sequenced after purifications. Based on the results, the members of the Iranian species of the genus *Alburnoides* were divided into seven linages. Maximum and minimum intra-species genetic distances based on K2P criterion were found between the populations of *A. samiii*, and *A. coadi*, *A. holciki*, *A. parhami* and *A. nicolausi*, respectively. Furthermore, maximum and minimum inter-species genetic distances based on K2P criterion were calculated between *A. qanati* and *A. holciki* (7.56), and *A. parhami* and *A. holciki* (0.33). Based on the results of this study using COI gene, the validity of *A. parhami*, *A. coadi* and *A. nicolausi* were not confirmed and it is suggested to be synonym of *A. holciki*, *A. namaki* and *A. idignensis*, respectively.

Keywords: Spirlin, Morphological variation, Genetic variation, Taxonomy, Iran

[*]Corresponding author

www.SID.ir