

## بررسی رابطه فیلوژنی جنس *Cobitis* (Linnaeus, 1758) در حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از صفات استخوانی

جلیلی، پ.\*<sup>۱</sup>، ایگدری س.<sup>۱</sup>، پورباقر، ه.<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

\*Email: pariya.jalili@yahoo.com

اعضای جنس سگ‌ماهیان جویباری خردار *Cobitis* از لحاظ سیتماتیکی به خوبی شناخته نشده‌اند. از این‌رو این تحقیق با هدف مطالعه رابطه فیلوژنی دو گونه سگ‌ماهی جویباری خردار حوضه دریای خزر شامل *C. faridpaki* و *C. keyvani* و دو جمعیت نامشخص این جنس شامل جمعیت‌های رودخانه دوق در شرقی‌ترین بخش و رودخانه گیسوم در غرب این حوضه به عنوان درون‌گروه و گونه *Oxyneomacheilus bergianus* به‌عنوان برون‌گروه با استفاده از روش کلادستیک براساس صفات استخوان‌شناسی به اجرا درآمد. براساس نتایج تمام آرایه‌های مورد مطالعه جنس *Cobitis* یک گروه تکتبار (با پشتیبانی ۰.۱۰۰٪) را تشکیل دادند. نتایج همچنین نشان داد که اعضای متعلق به جنس *Cobitis* در حوضه جنوبی دریای خزر به دو زیرکلاد *Cobitis* sp2 (دوق) و کلاد *C. faridaki* (+سیاهرود) + *C. keyvani* (+بابلرود) + *Cobitis* sp1 (گیسوم) تقسیم می‌شوند. همچنین نتایج تمایز دو گونه *C. faridpaki* و *C. keyvani* در حوضه جنوبی دریای خزر را براساس صفات استخوان‌شناسی را تایید نمود.

کلمات کلیدی: فیلوژنی، *Cobitis*، لوچ‌ماهیان، استخوان‌شناسی، حوضه دریای خزر.

### مقدمه:

اعضای جنس سگ‌ماهیان جویباری خردار *Cobitis* از لحاظ سیتماتیکی به خوبی شناخته نشده‌اند (Bohlen and Rab, 2001). این گروه از ماهیان در اورآسیا، شمال آفریقا و جنوب آسیا یافت می‌شوند (Eschmeyer and Fong, 2011). این جنس دارای چهار گونه معتبر در ایران شامل *Cobitis linea* (Heckel, 1849) از حوضه رودخانه کر، *C. faridpaki* و *C. keyvani* از حوضه جنوبی دریای خزر و *C. avicennae* از حوضه تیگریس می‌باشد. دو گونه *C. faridpaki* و *C. keyvani* در حوضه جنوبی دریای خزر پراکنش دارند (Mousavi-Sabet et al., 2012) و جمعیت‌های متعددی از این جنس در این حوضه یافت می‌شوند که به دلیل تفاوت‌های ریخت ظاهری امکان تعلق آنها به یکی از این دو گونه توصیف شده در این حوضه مشکل می‌باشد.

صفات متعددی نظیر صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، شمارشی، الگوهای رنگی و مولکولی جهت طبقه‌بندی ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، که هر کدام از آنها به‌تنهایی و یا به‌صورت ترکیبی در شناسایی و رده‌بندی ماهیان کارایی بالایی خود را نشان داده‌اند. در این بین، استخوان‌شناسی در مطالعات تاکسونومی و شناخت ارتباط ماهیان اهمیت به‌سزایی دارد. از این‌رو این تحقیق با هدف مطالعه رابطه تبارزایی دو گونه سگ‌ماهی جویباری خردار حوضه دریای خزر شامل *C. faridpaki* و *C. keyvani* و دو جمعیت نامشخص جنس *Cobitis* شامل جمعیت‌های رودخانه دوق در شرقی‌ترین بخش و رودخانه گیسوم در غرب این حوضه با استفاده از روش کلادستیک بر اساس صفات استخوان‌شناسی به اجرا درآمد. نتایج این تحقیق می‌تواند به

روشن شدن وضعیت آرایه شناختی دو جمعیت نامشخص و رابطه فیلوژنی اعضای این جنس در حوضه جنوبی دریای خزر کمک نماید.

#### مواد و روش‌ها:

برای این تحقیق نمونه اعضای جنس *Cobitis* شامل گونه *Cobitis keyvani* از رودخانه بابلرود و جمعیت *Cobitis sp1* از رودخانه گیسوم، گونه *Cobitis faridpaki* از رودخانه سیاهرود و جمعیت *Cobitis sp2* از رودخانه دوق کلاله (به تعداد ده قطعه از هر آرایه) به‌عنوان درون گروه و گونه سگ‌ماهی جویباری سفیدرود *Oxynoemacheilus bergianus* به‌عنوان برون گروه از رودخانه سفیدرود به تعداد پنج قطعه توسط دستگاه الکتروشوکر صید شدند. به منظور مطالعه استخوان‌شناسی، نمونه‌ها بر اساس روش اصلاح شده *Taylor and Van Dyke* (۱۹۸۵) رنگ‌آمیزی و شفاف‌سازی شدند. ساختار اسکلتی نمونه‌ها در زیر یک دستگاه استریومیکروسکوپ *Leica (MS5)* جدا شده و مورد بررسی قرار گرفتند. این ساختارها توسط یک اسکنر *Epson v600* مجهز به حمام گلیسرین اسکن شده و سپس ترسیم و نامگذاری آنها توسط نرم‌افزار *CorelDraw X6* صورت پذیرفت. نام‌گذاری ساختارهای استخوانی براساس *Rojo* (۱۹۹۱) و جلیلی (۲۰۱۴، ۲۰۱۵) انجام شد. فرضیه روابط فیلوژنی براساس روش کلادیستیک انجام شد. با بررسی و مقایسه نمونه‌ها، ویژگی‌های ریختی موثر که بین آرایه‌های مورد بررسی متفاوت بودند، انتخاب و به‌صورت وضعیت صفات توصیف شدند. قطبیت صفات براساس روش *Watrous and Wheeler (1981)* تعیین شد. یازده حالت صفت در آنالیز فیلوژنی برای بررسی مدل تکاملی نمونه‌ها استفاده و داده‌های نامشخص ماتریکس داده‌ها با علامت سوال (?) مشخص شدند. به منظور درک تاثیر صفات نامشخص، آنالیز پارسیمونی به‌صورت مجزا با استفاده و بدون این داده‌ها انجام شد. آنالیز فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار *PAUP4* (۱۶) نسخه ویندوز براساس معیار پیشینه پارسیمونی (*Maximum parsimony criterion*) انجام شد. داده‌های ماتریکس با استفاده از الگوریتم جستجوی *heuristic* با انتخاب تعداد ۱۰۰ تکرار (*Tree-bisection-and-reconnection (number of replications)*) و حذف صفات بی‌معنی اجرا شد. توزیع حالات صفات با استفاده از الگوریتم *ACCTRAN (accelerated transformation)* مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز *bootsrap* با ۱۰۰ تکرار با استفاده از الگوریتم جستجوی *heuristic* انجام شد.

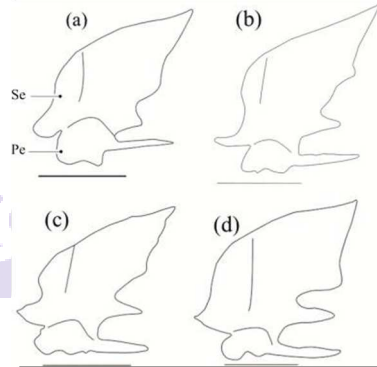
#### نتایج و بحث:

##### حالات صفات:

صفت ۱: تعداد مهره‌های ستون مهره، کمتر از ۴۰ (۰)، ۴۱ (۱)، ۴۲ (۲) مهره می‌باشد. در آرایه‌های *Cobitis*، *C. keyvani*، *Cobitis sp2* رودخانه دوق و *Cobitis sp2* رودخانه گیسوم، ۴۲ مهره وجود دارد. اما در نمونه *C. faridpaki* سیاهرود تعداد مهره‌ها ۴۱ می‌باشد. برون گروه انتخاب شده دارای تعداد ۳۵-۳۶ مهره است.

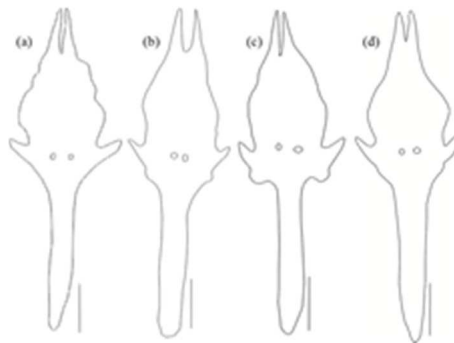
صفت ۲: زایده قدامی-شکمی اتموئید فوقانی-اتمئید پهن و نوک تیز (۰) باریک و نوک تیز (۱)، گرد (۲) می‌باشد. در نمای جانبی، استخوان اتموئید فوقانی-اتمئید دارای یک برآمدگی قدامی شکمی بوده که در گونه *C. faridpki* سیاهرود و *Cobitis sp2* رودخانه دوق و *O. bergianus* نوک تیز است. در حالی که در گونه *C. keyvani* متعلق به بابلرود این برآمدگی گرد و متمایل به پایین و در جمعیت *Cobitis sp1* متعلق به گیسوم باریک و نوک تیز می‌باشد.

صفت ۳: در بخش میانی استخوان *parasphenoid* دو زائده گرد، وجود ندارد (۰)، وجود دارد (۱). در بین گونه‌های مورد مطالعه *C. faridpaki* رودخانه سیاهرود و *C. keyvani* بابلرود دارای دو زائده در بخش میانی این استخوان می‌باشند. این زوائد در گونه *C. faridpaki* به خوبی توسعه یافته است. در برون گروه و سایر آرایه‌های مورد مطالعه این زوائد وجود ندارد.



شکل ۱: نمای جانبی استخوان اتموئید فوقانی-اتمئوئید: (a) *C. keyvani* (بابلرود)، (b) *Cobitis sp1* (گیسوم)، (c) *Cobitis sp2* (دوق) و (d) *C. faridpaki* (سیاهرود). *Se: supraethmoid-ethmoid*; *Pe: prevomer*. (اندازه مقیاس ۱ میلی‌متر).

صفت ۴: اتصال بین استخوان‌های *orbitosphenoid* و *pterosphenoid* وجود دارد (۰)، وجود ندارد (۱). بر اساس مطالعات Prokofiev (2010) در جمعه بسیاری از سگ‌ماهیان جویباری خانواده *Nemacheilidae* دو استخوان *orbitosphenoid* و *pterosphenoid* متصل می‌باشند. این اتصال در برون گروه مشاهده شد. در همه آرایه‌های مورد مطالعه جنس *Cobitis* مورد مطالعه استخوان *orbitosphenoid* کاهش یافته و اتصال بین *orbitosphenoid* و *pterosphenoid* وجود نداشت.



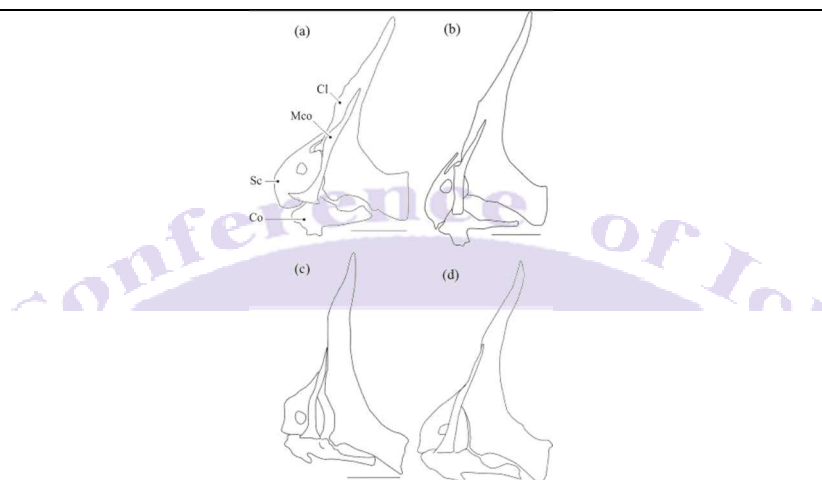
شکل ۲: نمای شکمی استخوان *parasphenoid* (a) *Cobitis sp2* (دوق)، (b) *C. faridpaki* (سیاهرود)، (c) *C. keyvani* (بابلرود) و (d) *Cobitis sp1* (گیسوم) (نوار مقیاس برابر ۱ میلی‌متر است).

صفت ۵: اتصال بین بخش شکمی استخوان ترقوه میانی (*mesocoracoid*) و کتف (*scapula*) وجود دارد (۰)، وجود ندارد (۱). به جز جمعیت گونه *Cobitis sp2* رودخانه دوق و گونه *O. bergianus* در سایر آرایه‌های مورد مطالعه اتصال بین بخش شکمی استخوان ترقوه میانی (*mesocoracoid*) و کتف (*scapula*) وجود نداشت.

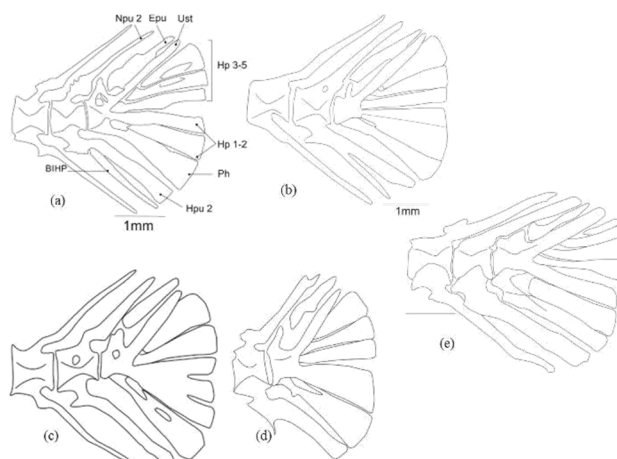
صفت ۶: اتصال بین استخوان ترقوه میانی و کتف، وجود دارد (۰)، وجود ندارد (۱).

صفت ۷: در باله دمی استخوان‌های هیپورال (*Hypurals*)، جدا می‌باشند (۰)، به یکدیگر متصل می‌باشند (۱). در مورد صفت‌های شش و هفت، در آرایه‌های درون گروه مورد مطالعه جنس *Cobitis* حالت یک مشاهده شد و حالت اجدادی تنها در برون گروه مشاهده شد.

صفت ۸: تعداد هیپورال‌ها، ۶ قطعه می‌باشد (۰)، ۵ قطعه می‌باشد (۱). در برون گروه تعداد هیپورال‌ها ۶ قطعه بوده در حالی که در سایر آرایه‌های درون گروه مورد مطالعه ۵ عدد می‌باشد.



شکل ۳: نمای جانبی کمر بند سینه‌ای: (a) *Cobitis sp2* (دوق)، (b) *C. faridpaki* (سیاهرود)، (c) *C. keyvani* (بابلرود) و (d) *Cobitis sp1* (گیسوم). *Cl*: cleithrum; *Co*: coracoid; *Mco*: mesocoracoid; *Sc*: scapula. (نوار مقیاس ۱ میلی‌متر می‌باشد).



شکل ۴: نمای جانبی باله دم، (a) *Cobitis sp2* (دوق)، (b) *C. faridpaki* (سیاهرود)، (c) *C. keyvani* (بابلرود)، (d) *Cobitis sp1* (گیسوم) و (e) *Oxymeomacheilus bergianus*. *Epu*: epural; *p*: hypurals; *Ph*: parhypurale; *Pls*: pleurostale. (اندازه مقیاس ۱ میلی‌متر می‌باشد).

- صفت ۹: استخوان *inter hemal spine bone* وجود ندارد (۰)، وجود دارد (۱). در جمعیت‌های گونه *C. faridpaki* و *Cobitis sp2* این استخوان بین هیپورال‌های یک و دو قرار دارد. در سایر آرایه‌های مورد مطالعه این استخوان وجود ندارد.
- صفت ۱۰: زائده قدامی جانبی استخوان شکمی، شامل یک زائده بالا رونده و یک زائده پایین رونده (۰) یک زائده قدامی-جانبی دراز (۱) می‌باشد.
- صفت ۱۱: استخوان پیش اتموئید *II*، استوانه‌ای شکل بوده و فاقد منفذ می‌باشد (۰)، این استخوان دوشاخه بوده و در بخش خلفی دارای منفذ می‌باشد (۱).
- صفت ۱۲: منوبریوم (*manubrium*)، وجود دارد (۰)، وجود ندارد (۱).

صفت ۱۳: کپسول کیسه‌شنا، از اتصال سه مهره دوم، سوم و چهارم تشکیل می‌شود (۰)، این کپسول از اتصال چهار مهره اول تشکیل می‌شود (۱). در صفت‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ حالت اجدادی تنها در برون‌گروه مشاهده می‌شود و در سایر آرایه‌های مورد مطالعه حالت یک وجود دارد.

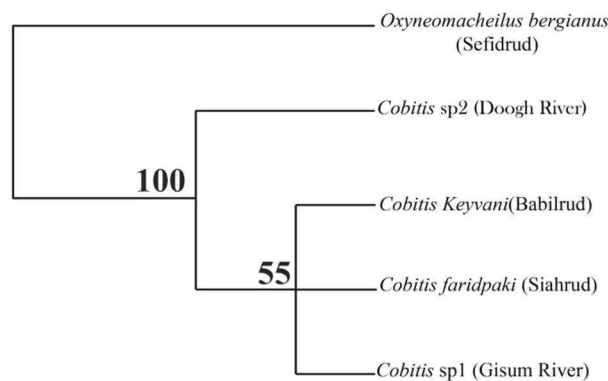
جدول ۱: ماتریکس داده‌ها برای ۵ آرایه مورد مطالعه شامل ۴ درون‌گروه و ۱ برون‌گروه (=۰ حالت *plesimorphic*، ۱ و ۲ = حالت مشتق شده)

صفات	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
<i>O. bergianus</i> (رودخانه سفیدرود)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
<i>Cobitis sp2</i> (رودخانه دوق)	۲	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
<i>C. keyvani</i> (بابلرود)	۲	۲	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۲	۱	۱	۱
<i>C. faridpaki</i> (سیاهرود)	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۱	۱	۱
<i>Cobitis sp1</i> (گیسوم)	۲	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱

### آنالیز فیلوژنی:

ماتریکس داده‌ها برای ۴ درون‌گروه و ۱ برون‌گروه در جدول ۱ آورده شده است. آنالیز پارسیمونی براساس ماتریکس داده‌ها یک درخت پارسیمونی (*most-parsimony tree*) با یک طول درخت ۱۶، شاخص ثبات  $(CI = 0.937)$  و شاخص بقاء  $(RI = 0.666)$  بود.

درخت پارسیمونی براساس مقادیر به دست آمده از ۱۰۰ تکرار در زیرآورده شده است. نتایج نشان داد که تمام اعضاء متعلق به جنس *Cobitis* یک گروه هم‌تبار (با پشتیبانی ۱۰۰٪) را تشکیل می‌دهند که در آن جمعیت دوق *Cobitis sp2* با سه جمعیت دیگر بر اساس صفت (۵:۱) اتصال بین بخش شکمی استخوان ترقوه میانی (*mesocoracoid*) و کتف (*scapula*)، به عنوان گروه خواهری مشخص شدند. گونه‌های *C. keyvani* بابلرود، *C. faridpaki* سیاهرود و جمعیت *Cobitis sp1* رودخانه گیسوم یک گروه هم‌تبار را تشکیل دادند. از بین صفات مورد بررسی، تعداد ۶ صفت شامل صفات (۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۳) بی‌ارزش بوده و ۷ صفت شامل (۲، ۱، ۳، ۵، ۶، ۹ و ۱۰) به‌عنوان صفات قابل استفاده در تمایز آرایه‌های مورد بررسی مشخص شدند.



شکل ۵: کلاوگرام جمعیت‌های جنس *Cobitis* در حوضه جنوبی دریای خزر.

براساس نتایج درخت شجره‌شناسی براساس صفات استخوان‌شناسی، اعتبار گونه‌های *C. faridpaki* و *C. keyvani* مورد تایید قرار نگرفت و از این رو توصیه می‌شود تا زمان بررسی آرایه‌شناسی جمعیت‌های جنس *Cobitis* براساس صفات مولکولی، تمامی جمعیت‌های این جنس در حوضه جنوبی دریای خزر *C. faridpaki* در نظر گرفته شود. همچنین می‌توان بیان داشت که جمعیت رودخانه گیسوم *C. faridpaki* و جمعیت رودخانه دوق *Cobitis cf. faridpaki* می‌توانند در نظر گرفته شود.

## منابع:

- 1- Bohlen J., Ráb P. (2001). Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for conservation. *Journal of Fish Biology*, 59: 75-89.
- 2- Eschmeyer W.N., Fong J.D. (2011). Pisces. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.). *Animal biodiversity: An outline of higher level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa*, 3148: 26-38.
- 3- Jalili, P., Eagderi, S. and Mousavi-Sabet, H., 2014 Description of skeletal structure and cranial myology of keyvani spined loach (*Cobitis keyvani*, Mousavi-Sabet et al., 2012). *International Journal of Aquatic Biology* 2 (6):337-345.
- 4- Jalili, P., Eagderi, S., Mousavi-Sabet and H., Mafakheri, P. 2015. Descriptive osteology of faridpaki spined loach, *Cobitis faridpaki* (Mousavi-Sabet et al., 2007) (Cypriniformes: Cobitidae) from the southern Caspian Sea basin. *Journal of Marine Biology*. 6 (24): 37- 49. In Persian.
- 5- Mousavi-Sabet H., V. Yerli S.V, Vatandoust s., Özeren S. C., Moradkhani Z. (2012). *Cobitis keyvani* sp. nova—a New Species of Spined-loach from South of the Caspian Sea Basin (Teleostei: Cobitidae). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12: 7-13.
- 6- Mousavi Sabet, H., Vasil'eva, E.D. Vatandoust, S., Vasil'ev V. P. 2011. *Cobitis faridpaki* sp. nova—a New Spined Loach Species (Cobitidae) from the Southern Caspian Sea Basin (Iran). *Journal of Ichthyology*, 51 (10): 925-931.
- 7- Mousavi-Sabet H., Kamali A., Soltani M., Bani A., Esmaili H. R., Khoshbavar Rostami H., Vatandoust S., Moradkhani Z. 2012. Reproductive biology of *Cobitis keyvani* (Cobitidae) from the Talar River in the southern Caspian Sea basin. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(2): 383-393.
- 8- Rojo, A.L. 1991. *Dictionary of Evolutionary Fish Osteology*, CRC Press.
- 9- Taylor, W.R. and Van Dyke, G.C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9: 107-119.