

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

سهیل ایگدری<sup>\*</sup>، آرش جولاوه رودبار<sup>۱</sup>، جلیل ایمانی هرسینی<sup>۲</sup>، محسن رستمی<sup>۲</sup>

\*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 پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶

### چکیده

تاکنون ۱۲ گونه از کپورماهیان جنس *Alburnoides* در ایران بر اساس صفات ریخت‌شناسی توصیف شده 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 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 فل-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. nicolausi* و *A. parhami* و *A. holciki* و *A. coadi* و *A. qanati* و *A. holciki* بود. همچنین بیشترین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌ای به میزان ۷/۵۶ بین دو گونه *A. holciki* و *A. parhami* بود. با توجه به نتایج، به دلیل تمايز اندک ژنتیکی بر اساس ژن COI، اعتبار گونه‌های *A. holciki* و *A. nicolausi* و *A. coadi* و *A. parhami* تائید نگردید و پیشنهاد می‌گردد که بترتیب متراffد گونه‌های *A. idignensis* و *namaki* در نظر گرفته شوند.

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

\*نویسنده مسئول

**مقدمه**

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 روبار 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 *Alburnoides* ریزماهواره ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (*echiwaldii*) را در رودخانه‌های گرگان‌رود و چالوس مورد بررسی قرار دادند. همچنین جولاده روبار و ایگری (۱۳۹۵) روابط تبارشناسی جمعیت‌های مختلف گونه *A. namaki* را با استفاده از زن COI مورد بررسی قرار دادند. تنها مطالعه جامع انجام شده در مورد آرایه‌شناسی ماهیان جنس *Alburnoides* در ایران براساس زن 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 توصیف شده جنس *Alburnoides* در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی زن COI به اجرا درآمد.

**مواد و روش‌ها****نمونه‌برداری**

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

**استخراج DNA**

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

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-Saberi et al., 2015a, b) این گونه‌ها شامل *A. tabarestanensis*, *A. samiii*, *A. eichwaldii* و *A. holciki* از حوضه آبریز دریای خزر، *A. petrubanarescui* از حوضه آبریز هریرود، *A. coadi* از حوضه آبریز نمک، *A. namaki* از حوضه آبریز ارومیه، *A. damghani* از حوضه آبریز دشت کویر، *A. idignensis* و *A. nicolausi* 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

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	<i>A. holciki</i>	هربرود	Har۱-۲	۶۱°۰۵'	۳۵°۵۷'	
۲	<i>A. parhami</i>	کاسپین	Bab۱-۳	۵۷°۲۶'	۳۷°۲۹'	
۳	<i>A. tabarestanensis</i>	کاسپین	Taj۱-۶	۵۳°۱۹'	۳۶°۱۱'	
۴	<i>A. tabarestanensis</i>	کاسپین	Sia۱-۳	۵۲°۵۳'	۳۶°۲۹'	
۵	<i>A. samii</i>	کاسپین	Sef۱-۳	۴۹°۳۰'	۳۶°۵۳'	
۶	<i>A. eichwaldii</i>	کاسپین	Qsu۱-۲	۴۸°۰۱'	۳۸°۳۰'	
۷	<i>A. eichwaldii</i>	کاسپین	Bal۱-۲	۴۸°۲۰'	۳۸°۱۹'	
۸	<i>A. eichwaldii</i>	کاسپین	Ars۱-۷	۴۵°۳۵'	۳۸°۵۷'	
۹	<i>A. damghani</i>	کویر	Che۱-۳	۵۴°۰۴'	۳۶°۱۶'	
۱۰	<i>A. coadi</i>	کویر	Nam۱-۵	۵۲°۳۹'	۳۵°۴۲'	
۱۱	<i>A. namaki</i>	نمک	Qar۱-۶	۵۰°۰۲'	۴۴°۵۳'	
۱۲	<i>A. namaki</i>	نمک	Abk۱-۲	۴۹°۵۷'	۴۴°۴۴'	
۱۳	<i>A. idignensis</i>	تیگریس	Ara-۱	۴۷°۵۵'	۴۴°۲۴'	
۱۴	<i>A. idignensis</i>	تیگریس	Bid۱-۴	۴۷°۴۵'	۴۶°۲۴'	
۱۵	<i>A. idignensis</i>	تیگریس	Deh۱-۳	۴۷°۸۹'	۴۴°۴۲'	
۱۶	<i>A. idignensis</i>	تیگریس	Bis۱-۲	۴۷°۲۶'	۴۴°۲۳'	
۱۷	<i>A. idignensis</i>	تیگریس	Gam۱-۲	۴۶°۳۹'	۴۴°۲۳'	
۱۸	<i>A. nicolausi</i>	تیگریس	Nor۱-۳	۴۷°۵۸'	۴۴°۰۳'	
۱۹	<i>A. holciki</i>	کر	Kor۱-۴	۵۴°۴۱'	۴۰°۰۲'	
۲۰	<i>A. parhami</i>	کر	Pul۱-۳	۵۲°۵۴'	۲۹°۵۲'	

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  $\mu\text{m}$ )، ۵ میکرولیتر DNA کل و ۱۸ میکرو لیتر  $\text{H}_2\text{O}$  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

در این روش قطعات باله سینه‌ای سمت راست در بافر استاندارد STE به همراه پروتئیناز K به مدت ۲۴ 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 اسپکتروفوتومتری 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 ۵'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' و FishR1-(5'-TAGACTTCTGGGTGCCAAAGAATCA-3')

(COI) برای ۷۰ نمونه متعلق به ۱۰ گونه اسمی از جنس *Alburnoides* (به جز گونه *A. petrubanarescui*) به طول ۶۲۰ جفت باز به دست 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 استرب 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 استرب بالا قابل تأیید بودند. گونه‌های ایرانی جنس *Alburnoides* نیز به ۸ شاخه تقسیم شدن: شاخه اول L-I شامل گونه‌های *A. coadi* و *A. namaki* L-II شامل *A. coadi* و شاخه دوم L-III شامل *damghani* L-IV شامل *tabarestanensis* A. *idignensis* samiii A. *eichwaldii* *nicolausi* L-VI شامل شاخه ششم *A. qanati* A. *parhami* L-VII شامل *A. holciki* A. *parhami* و *A. holciki* 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 *A. coadi* کمترین میزان آن در بین نمونه‌های گونه‌های *A. nicolausi* و *A. parhami* *A. holciki* گردید. کم بودن فاصله ژنتیکی (K2P) درون گونه‌ای 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 بین گونه‌ای نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۷/۵۶ بین دو گونه *A. holciki* و *A. qanati* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۳۳ بین دو گونه *A. parhami* و *A. holciki* بدست آمد (جدول ۳).

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

### توالی‌یابی

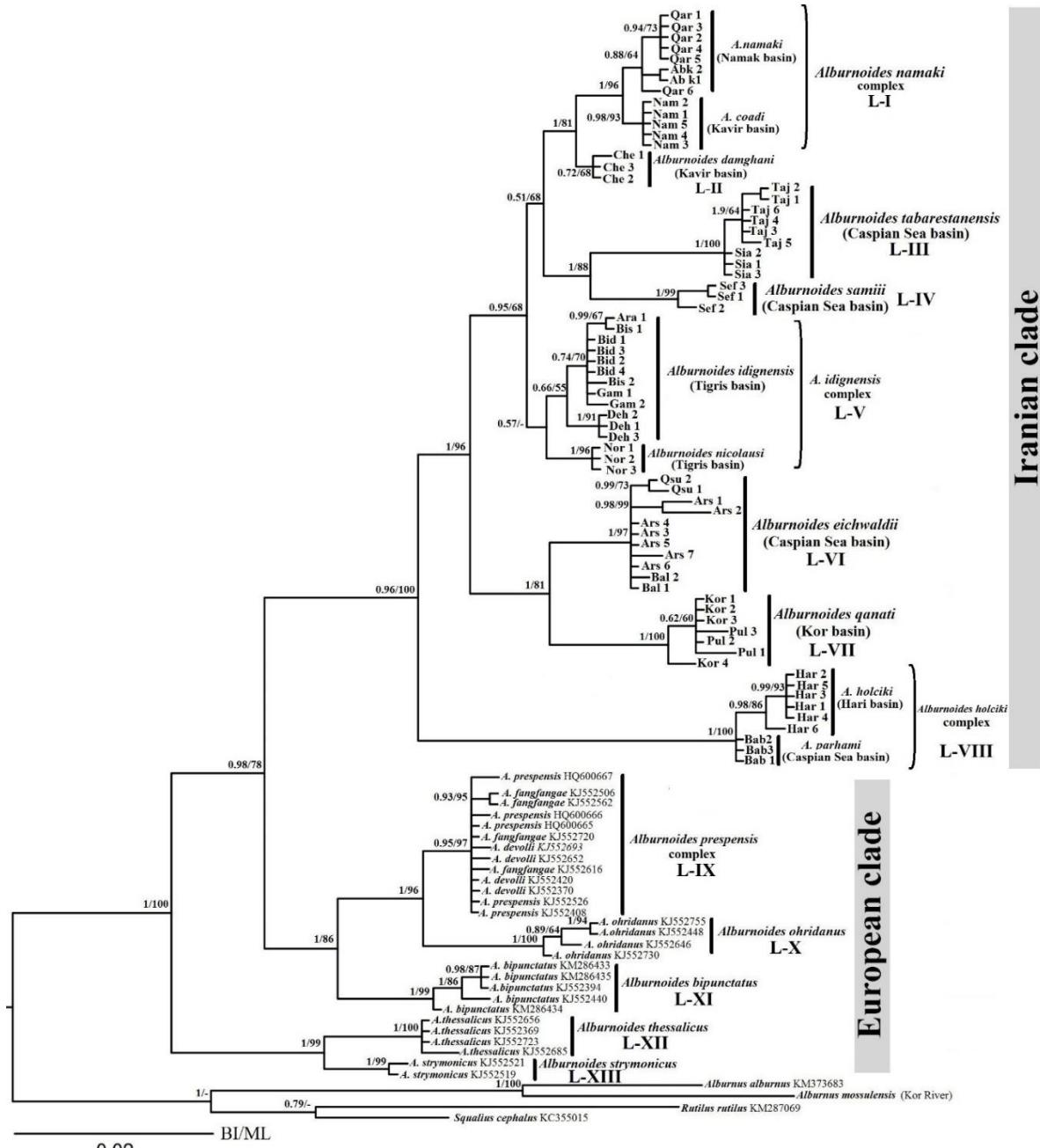
به منظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Korea) خالص شد و در نهایت جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعات تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای یونیورسال FishR1 و FishF1 (Ward et al., 2005) شدند.

### آنالیز داده‌ها

توالی‌ها با استفاده از نرمافزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدن (Hall, 1999). عملیات انطباق توالی‌های ژن با استفاده از نرم افزار ClustalX (1.83) انجام شد. بهمنظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی شجره‌شناسی، توالی‌های به دست 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 MrBayes Bayesian inference از نرمافزار Ronquist et al., (2012) و برای v3.1.2 و تکرار ۱/۵ میلیون نسل (RaxML V 7.2.5) و برای Maximum likelihood از نرمافزار Stamatakis, (2014) استفاده شد (Kumar و نرمافزار MEGA6 استفاده شد (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



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 BI 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.

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 (KM)	تیپ
۱	<i>A. coadi</i>	۰/۰۰	نمرود:۵	۰/۱۰	
۲	<i>A. eichwaldii</i>	۰/۳۳	آرس:۷	*	
۳	<i>A. idignensis</i>	۰/۱۹	قزوین:۲	۱۰/۸	
۴	<i>A. qanati</i>	۰/۴۳	بالخلوچای:۲	۰/۵	بید سرخ:۴
۵	<i>A. namaki</i>	۰/۲۰	آران:۱	۴۲/۲	بیستون:۲
۶	<i>A. tabarestanensis</i>	۰/۱۸	گاماسب:۲	۲/۱	
۷	<i>A. holciki</i>	۰/۰۰	۳:۵	۹/۱	
۸	<i>A. samiti</i>	۰/۵۶	پلوار:۳	۲۰/۲	
۹	<i>A. parhami</i>	۰/۰۰	کر:۴	۱۲/۱	
۱۰	<i>A. Nicolausi</i>	۰/۰۰	آب کمر:۲	۹۵/۳	
			قره چای:۶	۹۳/۳	
			تجن:۶	۰/۱	
			سیاهروド:۳	۳۳/۶	
			هریرود	۱/۰	
			سفیدرود	۵/۱	
			بابا امان	۰/۵	
			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 زن COI

Table 2: Interspecies mean genetic distance K2P (%) of the studied species based on COI gene sequence.

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

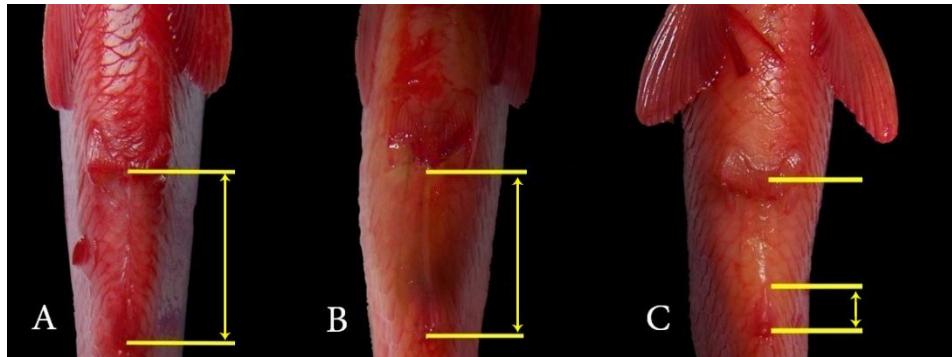
نژدیکترین گونه از جنس *Alburnoides* بترتیب در حدود ۳/۱۶ و ۲/۷۳ درصد تمایز دارند که این فاصله برای Jouladeh- (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015b) یک گونه قابل قبول می‌باشد (A. ژن COI). اما ژن *COI* گونه *A. holciki* با گونه *parhami* تمایز اندک و فاصله‌ای در حدود ۰/۳۳ درصد دارد. علاوه، با توجه به نتایج چندشکلی نوکلئوتیدی‌های تشخیصی ژن *COI* تنها یک نوکلئونید 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 نوکلئونید *A. holciki* نمی‌تواند دلیل کافی برای تمایز این گونه از *A. parhami* باشد. علاوه بر تفاوت اندک در ژن *COI*، ویژگی‌های ریختی تشخیصی ارائه شده برای گونه *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 (جولاوه‌رودبار 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 خطاهای استفاده می‌گردد. از اینرو، با توجه به نتایج، تفاوت‌های ریختی مشاهده شده بین دو گونه *A. parhami* و *holciki* 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).

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

## بحث

توالی ژن *COI* میتوکندریالی 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 نژدیک 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 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 روduxانه سفیدرود، *A. tabarestanensis* از روduxانه تجن و *A. parhami* رودخانه بابا امان (هر سه گونه از حوضه آبریز دریای خزر) را با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی 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 خوش‌مجزا قرار گرفته‌اند و با اعداد Bootstrap بالا تأیید می‌گردد. علاوه بر این، گونه‌های *A. samiii* و *A. tabarestanensis* با



شکل ۲: نمای کیل شکمی، A: کیل شکمی پوشیده از فلس، B: کیل شکمی فاقد فلس، 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.

تبديل شدن به گونه‌های جدید را دارند. بر اساس نتایج، جمعیت ناهمبوم *A. coadi* 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) به فشارهای محیطی بسیار سریع تر 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 فوتوتیپ‌های 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 (1963) معتقد است که در اکثر گونه‌های جانوری نسبت‌ها بویژه نسبت‌های مربوط به طول نسبی ضمائم مانند نسبت تن

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 *A. coadi* (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015a) که از رودخانه نمرود در حوضه آبریز دشت کویر توصیف شده است (Mousavi-Sabet *et al.*, 2015a, b). در اساس نتایج حاصله از چندشکلی توالی نوکلئونیدهای تشخیصی تنها در یک نوکلئونید C←A با اختلاف دارد و در درخت تبارشناصی نیز نمونه‌های *A. namaki* و *A. coadi* در دو خوشه نزدیک بهم قرار گفته‌اند. 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

### 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 به عنوان 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. *A. coadi* همچنین براساس نتایج، اعتبار سه گونه *A. nicolausi* و *A. parhami* از لحاظ مولکولی تأیید *A. coadi* و بر همین اساس پیشنهاد گردید گونه *A. parhami* مترادف *A. namaki* گونه *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، DOI: ۱۴۶-۱۵۹ (۲۸): ۱۰.22092/ISFJ.2019.118388
- جولاوه 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 آذربایجان، ۵(۲): ۱۷-۱.
- جولاوه 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.

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 C ↔ T 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. جولاوه 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 با فاصله 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 حداقل 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.

- 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.
- 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): ۱۵۸-۱۶۵ DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117958.۱۵۵
- حقیقی، ا.. ستاری، م.. سالار درافشان، س. و کیوانی، ی.. ۱۳۹۳. ساختار ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides echivaldii*) کرگان‌رود و چالوس. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۱۹(۱): ۱-۱۴.
- نیک‌مهر، ن.. ایگری، س. و پورباقر، م.. ۱۳۹۷. بررسی جایگاه آرایه شناسی گاماهی ایرانی *Ponticola iranicus* (Teleost, Gobiidae) براساس زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز COI نشریه شیلات، ۷۱(۲): ۱۱۲-۱۱۷.
- هاشم‌زاده، ا.. عبدالی، ا.. پوراحمد، ر.. پوریا، م. و گلزاریان پور، ک.. ۱۳۹۳. تهیه بارکد ژنتیکی ماهیان جنس *Capoeta* در سر شاخه‌های کارون و دجله. نشریه شیلات، ۹(۲): ۱۷۱-۱۷۸.
- 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.

- 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*

*Fish Biology*, 69:165-80. DOI:  
10.1111/j.1095-8649.2006.01266.x

**Ward, D., Zemlak, S., Innes, H., Last, R.  
and Hebert, D., 2005.** DNA barcoding

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

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

Eagderi S.<sup>1\*</sup>; Jouladeh-Roudbar A.<sup>1</sup>; Imani Harsini J.<sup>2</sup>; Rostami M.<sup>2</sup>

\*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. samii*, 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