

## بررسی آرایه‌شناسی جنس *Paraschistura* (در جنوب ایران) با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی (COI)

- **منا مقدم\*:** گروه محیط زیست دریایی، دانشکده محیط زیست، کرج، ایران
- **محمد رضا رحمانی:** گروه محیط زیست دریایی، دانشکده محیط زیست، کرج، ایران
- **سهیل ایگدری:** گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **سمیرا کیانی هرچگانی:** گروه محیط زیست دریایی، دانشکده محیط زیست، کرج، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

### چکیده

بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف ماهیان از اساسی‌ترین شاخص‌های لازم برای حفظ و بازسازی ذخایر آن‌ها است. این مطالعه بر آن است تا با استفاده از روش‌های مولکولی با استفاده از توالی‌های به دست آمده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI به بررسی آرایه‌شناسی سگ‌ماهی جویباری جنس *Paraschistura* در جنوب ایران بپردازد. به این منظور نمونه بالغ از هر گونه که شامل ۷ عدد گونه *P. bamporensis*، سه عدد گونه *P. sargadensis*، چهار عدد گونه *P. hormozensis*، و پنج عدد گونه *Paraschistura sp.*، از حوضه‌های جنوبی ایران جمع‌آوری گردید، DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت ژنومی و پرایمر FCOI20' استخراج گردید و طی فرآیند PCR تکثیر و پس از الکتروفورز توالی‌یابی انجام گرفت. جهت بررسی روابط فیلوژنی توالی‌های ژن COI از نرم‌افزار MEGA6 استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که نمونه‌های جنس *Paraschistura* در چهار کلاد قرار گرفته‌اند. نمونه‌های *P. bamporensis* از حوضه‌های مختلف با فاصله تکاملی (۰/۰۰۵-۰/۱۲۸) به همراه *P. sargadensis* و *Paraschistura sp.* از حوضه سرباز در یک کلاد قرار گرفته‌اند. نمونه‌های *P. hormozensis* با دارا بودن فاصله تکاملی (۰/۰۴۲)، در کلاد مجزایی قرار دارند. به همین ترتیب *P. abdolii*، *P. naumani* و *P. delvarii* با دارا بودن فواصل تکاملی (۰/۰۳۰-۰/۱۸۵) و نمونه *Paraschistura sp.* با فاصله تکاملی (۰/۰۲۰-۰/۰۴۲) در کلادهای مجزایی قرار گرفته‌اند. با توجه به فاصله حوضه‌ها از هم و بررسی خصوصیات مورفولوژی، نتایج مولکولی با نتایج مورفولوژیکی موجود مطابقت داشت. تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی در این مطالعه نشان می‌دهد ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورفولوژیک به همراه شناسایی مولکولی برای تایید تشخیص گونه‌ها ضروری می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** فیلوژنی، *Paraschistura*، آرایه‌شناسی، ساختار ژنتیکی، سگ‌ماهی



## مقدمه

جویباری که از منطقه‌میان‌ی حوضه رودخانه تیگریس با گونه‌های نرمال جمع‌آوری شده بودند، الگوی رنگ‌آمیزی روشن‌تر از گونه‌های موجود را نشان می‌داد که تاکنون با هیچ نامی توصیف نشده بود (Vatandoust و Eagderi, ۲۰۱۵). هم‌چنین Eagderi و Mousavi (۲۰۱۵) گونه جدید از جنس *Paraschistura* (*Paraschistura delvarii spec*) را معرفی کردند، گونه *P. delvarii spec* در حوضه پرسیس-رودخانه مند توصیف شده است که به واسطه الگوی رنگ‌آمیزی، بدن باریک و کشیده و خط جانبی کامل از سایر گونه‌های *Paraschistura* متمایز می‌شود. در مطالعات اخیر Freyhof و همکاران (۲۰۱۵) پنج گونه جدید از این جنس را معرفی کردند، شامل: *P. naumani*, *P. aredvii*, *P. susiani*, *P. abdollii* و *P. cristata*، ولی با این وجود هنوز هم وضعیت بسیاری از جمعیت‌های این جنس در ایران نامشخص می‌باشد. با توجه به مشکلات فوق و هم‌چنین با توجه به این‌که تا کنون مطالعه‌ای جامع در زمینه تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنی بین گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق صورت نگرفته است، بررسی جایگاه سیستماتیک این گونه‌ها به‌عنوان هدف اصلی این پژوهش در نظر گرفته شد. در سال‌های اخیر از روش‌های مختلفی برای شناسایی گونه‌ها استفاده شده است. اساس کار روش بارکدگذاری DNA (DNA barcoding) مبتنی بر تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه و مقایسه آن با سایر جمعیت‌ها و گونه‌ها است. این روش به‌عنوان یک روش استاندارد برای شناسایی مورد تأیید زیست‌شناسان قرار گرفته است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۱). این روش نه تنها روش نسبتاً سریع، بلکه دارای دقت بالایی نیز می‌باشد (Webb و همکاران، ۲۰۰۳). در این مطالعه از توالی‌های زیر واحد ۱ ژن COI (Cytochrome c oxidase) برای بارکدگذاری DNA جهت تعیین وضعیت آرایه‌شناسی سگ‌ماهیان جویباری جنس *Paraschistura* در جنوب ایران استفاده شده است.

## مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی وضعیت آرایه‌شناسی سگ‌ماهیان جویباری *Paraschistura* در جنوب ایران، ۱۹ قطعه شامل ۷ قطعه گونه *P. bampurensis* از حوضه‌های جازموریان و مکران، ۴ قطعه گونه *P. hormuzensis* از حوضه هرمز، ۳ قطعه گونه *P. sargadensis* از حوضه مشکید و ۵ قطعه گونه *Paraschistura sp.* از حوضه‌های مکران توسط الکتروفیشر و تور ساچوک و با طی مسافت ۱۰۰ متری از طول رودخانه‌های مذکور جمع‌آوری شد (Hansen و همکاران، ۲۰۰۱). ایستگاه‌های مورد بررسی به همراه موقعیت جغرافیایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

بررسی ماهیان در بوم‌سازگان آبی به دلایل متعدد از جمله بررسی تکاملی، بوم‌شناسی، رفتارشناسی، مدیریت منابع آبی و بهره‌برداری ذخایر و پرورش ماهی حائز اهمیت است. به عبارت دیگر دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان و تمایز جمعیت‌های متفاوت و آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی یکی از مولفه‌های بسیار مهم و اساسی در موفقیت و دستیابی به مدیریت پایدار زیست‌شناختی و ژنتیکی، به‌عنوان پیش‌نیازی برای حفظ جمعیت‌ها و سازگاری آن‌ها در شرایط محیطی در حال تغییر قلمداد می‌گردد (Diz و Presa, ۲۰۰۹). سگ‌ماهیان جویباری در ایران دو خانواده Nemachilidea و Cobitidea را شامل می‌شوند. *Paraschistura* یکی از شش جنس خانواده Nemachilidea است که در ایران یافت می‌شود (Prokofive, ۲۰۰۹). این جنس با ۱۳ گونه به تازگی توصیف شده و همه گونه‌های آن مورد بررسی قرار نگرفته اند (Coad, ۲۰۱۴). از این رو، داده‌های اندکی در خصوص جنس *Paraschistura* در ایران در دسترس می‌باشد و هنوز هم نسخه جامع طبقه‌بندی از آن در دسترس نیست. گونه‌های موجود در این جنس کوچک و در آب‌های داخلی ترکمنستان، شرق ایران تا بالای رودخانه ایندوس در افغانستان و پاکستان گسترش یافته‌اند. این جنس به طور خاص توسط لکه‌های سیاه و تیره یا نوارهایی که همیشه روی شعاع‌های باله پشتی قدامی وجود دارد، تشخیص داده می‌شود. البته لکه‌های تیره و نوارهای روی شعاع‌های باله پشتی قدامی در ایران در جنس *Metaschistura* نیز قابل مشاهده است که می‌توان این جنس را توسط تاج ساقه دمی که به خوبی توسعه یافته است از جنس *Paraschistura* تفکیک نمود (Kottelat, ۲۰۱۲). جایگاه تاکسونومی و حتی اسامی علمی این ماهیان همواره در طول ۱۰۰ سال از زمانی که Regan (۱۹۱۱) برای اولین بار آن‌ها را طبقه‌بندی نموده، دستخوش تغییرات چشمگیری شده است. وجود جثه کوچک خانواده، شباهت بالای صفات مریستیک این گونه‌ها با هم و هم‌چنین وجود تفاوت در الگوهای رنگ‌آمیزی درون گونه‌ای در این ماهیان از جمله مشکلاتی است که همواره شناسایی، طبقه‌بندی و بررسی روابط تبارشناسی آن‌ها را با مشکل همراه ساخته است. از این رو کم‌تر مورد استقبال محققین و ماهی‌شناسان جهت مطالعه و بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای، Berg (۱۹۴۹-۱۹۴۸) گونه *P. turcomenicus* از ترکمنستان را به‌عنوان مترادف *P. sargadensis* نامگذاری کرد، اما Banarescu و Nalbant (۱۹۶۶) آن را به‌عنوان یک زیرگونه معتبر توصیف کردند و *P. baluchiorum* از پاکستان به‌عنوان مترادف گونه *P. bampurensis* توصیف شد (Nalbant و Bianco, ۱۹۹۸). هم‌چنین گونه‌های جدیدی از این جنس به تازگی ثبت گردیده است. گونه *P. ilamensis* در مقایسه با سایر سگ‌ماهیان



جدول ۱: ایستگاه‌های نمونه‌برداری سگ‌ماهیان جویباری *Paraschistura* در جنوب ایران

نام گونه	مختصات جغرافیایی	تعداد	ایستگاه	حوضه
<i>Paraschistura bampurensis</i>	۶۱°۲۱'۱۷"E	۲	بمیور	جازموریان
<i>Paraschistura sargadensis</i>	۶۱°۵۴'۵۳/۱"E	۳	مشکید	مشکید
<i>Paraschistura bampurensis</i>	۶۱°۱۵'۳۵/۱"E	۲	سرباز	مکران
<i>Paraschistura bampurensis</i>	۶۰°۴۳'۲/۲"E	۳	قناتر سرزه	جازموریان
<i>Paraschistura hormozensis</i>	۵۷°۱۵'۱۷"E	۲	رودان	هرمز
<i>Paraschistura sp.</i>	۶۱°۱۴'۳۷"E	۲	سرباز	مکران
<i>Paraschistura hormozensis</i>	۵۷°۱۵'۱۷"E	۲	رودان	هرمز
<i>Paraschistura sp.</i>	۵۷°۵۲'۴۳"E	۳	جگین	مکران

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده در PCR

FCOI20	۵'-AACCTCTGTCTTCGGGGCTA-3'
RCOI20	۵'-AGTGGTTATGYGGCTGGCTT-3'

به منظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی شجره‌شناسی، هاپلو تایپ‌های به دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن (NCBI) با سایر توالی‌های موجود برای گونه‌های جنس *Paraschistura* مقایسه شدند (جدول ۳). پس از انطباق و یکپارچه کردن توالی‌ها، یک قطعه به طول ۶۴۰ جفت باز انتخاب شد، که در بین ماهیان مورد مطالعه و توالی‌های موجود در بانک ژن مشترک بود. جهت ریشه دار نمودن کلادوگرام‌ها از گونه *Oxyneomacheilus persa* به عنوان برون گروه استفاده شد. برای این که شاخص کمی برای مقایسه مقدار تمایز در بین گونه‌ها در دسترس باشد از فاصله ژنتیکی K2P (Kimura, ۱۹۸۰) محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷). به منظور ترسیم درخت شجره‌شناسی از روش‌های Maximum Parsimony, Maximum Likelihood و Neighbour-Joining استفاده شد. جهت آزمون شجره‌شناسی از روش آماری بوت‌استرپینگ (Bootstrapping): روش آماری برای تعیین میزان دقت آنالیزهای حاصل از داده‌ها) با ۱۰۰۰ جایگشت استفاده شد. در دارنگاره ترسیم شده شاخه‌های دارای مقدار بوسترپ کوچک‌تر از ۵۰ حذف شدند.

نمونه‌ها بلافاصله پس از صید در الکل ۹۶ درصد تثبیت و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت استخراج DNA قطعه‌ای از قاعده باله پشتی جدا و مطابق دستورالعمل کیت استخراج DNA عمل گشت. هر واکنش PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۳ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۱ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار از هر پرایمر (جدول ۲)، ۱ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار (dNTP)، ۱ میکرولیتر آنزیم بیوتگ DNA پلیمرز (ΔUμ<sub>1-1</sub>) و ۷ میکرولیتر DNA بود. شرایط دمایی واکنش زنجیره پلیمرز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه)، ۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه) و در نهایت یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در نتیجه واکنش PCR، یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۶۶۰ جفت باز تکثیر شد که توالی کامل ژن COI را در برداشت. کیفیت DNA موجود در نمونه‌های استخراج شده ابتدا به واسطه الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شده و مقدار DNA با استفاده از دستگاه طیف سنج بیوفتومتر (Biophotometer) (Eppendorf) در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و در نهایت مقادیر تقریبی DNA برای بیش تر نمونه‌ها به ۷۰ تا ۸۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تبدیل شد. عملیات تعیین توالی انتهای ۵' ژن COI با استفاده از دستگاه ABI-3130x1 انجام شد. جهت انجام عملیات توالی‌یابی از آغاز گر پیش‌رو FCOI20 استفاده شد.

جدول ۳: اسامی گونه‌ها و شماره ثبت آن‌ها در بانک ژنی که در آنالیز مولکولی این تحقیق استفاده شده است

شماره دستیابی	گونه	ردیف	شماره دستیابی	گونه	ردیف
KM603235.1	<i>P. delvarii</i>	۸	KM603296.1	<i>P. hormozensis</i>	۱
KM603307.1	<i>P. abdolii</i>	۹	KM603202.1	<i>P. hormozensis</i>	۲
KM603304.1	<i>P. abdolii</i>	۱۰	KM603309.1	<i>P. naumanni</i>	۳
KM603314.1	<i>P. abdolii</i>	۱۱	KM603311.1	<i>P. naumanni</i>	۴
KP050538.1	<i>Oxyneomacheilus persa</i>	۱۲	KM603297.1	<i>P. naumanni</i>	۵
KP050533.1	<i>Oxyneomacheilus persa</i>	۱۳	KM603278.1	<i>P. delvarii</i>	۶
			KM603254.1	<i>P. delvarii</i>	۷



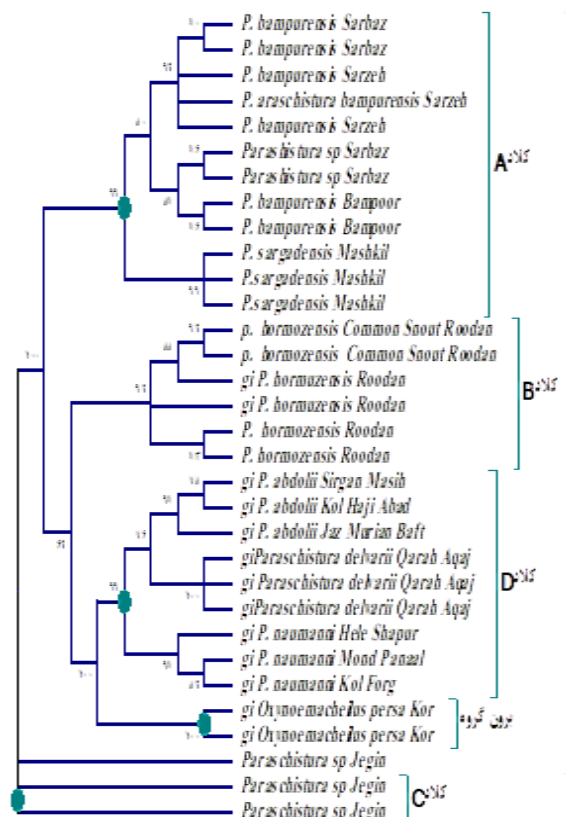
## نتایج

پس از هم‌تراز کردن توالی‌های نوکلئوتیدی ژن COI میزان جابجایی توالی‌های بین آرایه‌های مختلف نمونه‌های جنس *Paraschistura* جنوب ایران مطابق جدول ۴ استخراج گردید. درخت تبارشناسی حاصل از مقایسه توالی‌های ماهی جنس *Paraschistura* مورد مطالعه

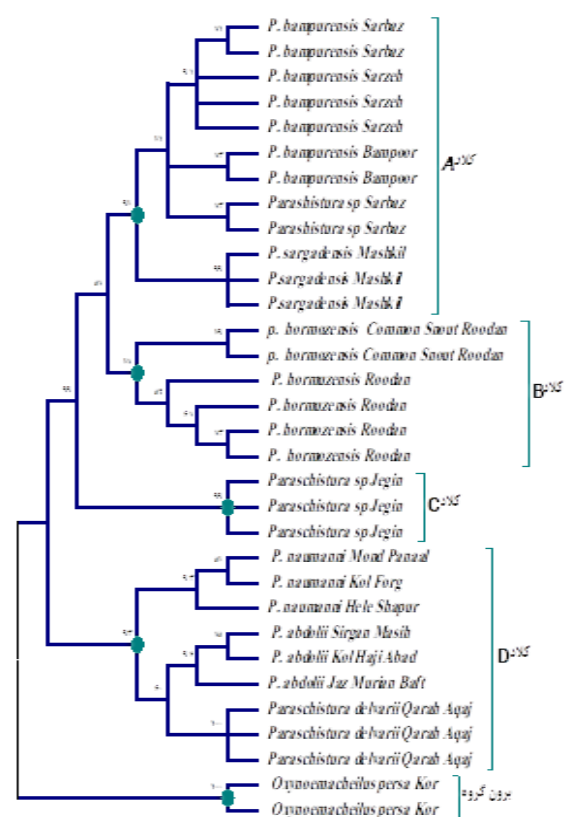
براساس مدل K2P با روش‌های Maximum Likelihood و Neighbour-joining و به‌همراه درخت تبارشناسی به‌دست آمده از Maximum Parsimony (هر کدام با ۱۰۰۰ جایگشت) در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج مربوط به محاسبات فاصله ژنتیکی براساس مدل K2P بین جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۴: جابجایی‌های توالی نوکلئوتیدی تشخیص داده شده در ناحیه بارکدینگ ژن mtDNA COI گونه‌های جنس *Paraschistura* در جنوب ایران

جابگاه نوکلئوتیدها در توالی ژن COI براساس گونه‌های جنس <i>Paraschistura</i>															گونه
۵۵۶۰	۵۵۶۱	۵۵۶۲	۵۵۶۳	۵۵۶۴	۵۵۶۵	۵۵۶۶	۵۵۶۷	۵۵۶۸	۵۵۶۹	۵۵۷۰	۵۵۷۱	۵۵۷۲	۵۵۷۳	۵۵۷۴	گونه
C	G	A	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	<i>P. abdolii</i>
C	G	A	A	.	.	C	G	.	.	.	.	.	A	A	<i>P. naumanni</i>
G	T	.	.	.	.	C	G	T	.	C	T	.	C	T	<i>P. bampurensis sarzeh</i>
G	T	.	.	.	.	C	G	T	.	C	T	.	C	T	<i>P. sargadensis Mashkil</i>
G	T	.	.	.	.	C	G	T	.	C	T	.	C	T	<i>P. bampurensis bampor</i>
G	T	.	.	.	.	C	G	T	.	C	T	.	C	T	<i>P. bampurensis sarbaz</i>
G	T	.	A	.	.	C	.	T	G	C	T	.	C	T	<i>P. hormozensis</i>
G	T	.	.	.	.	C	G	T	.	C	T	.	C	T	<i>Paraschistura sp. Sarbaz</i>
G	T	.	A	.	.	C	.	T	G	C	T	.	C	T	<i>p. hormozensis common snout</i>
G	A	.	.	.	C	C	G	T	G	.	C	C	C	T	<i>Paraschistura sp. Jegin</i>
C	G	A	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	A	T	<i>P. delvarii</i>

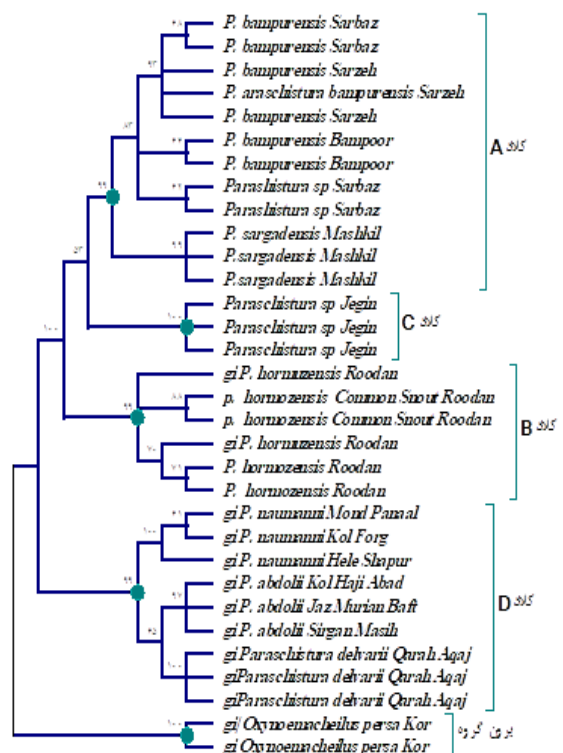


شکل ۲: درخت تبارشناسی جنس *Paraschistura* با استفاده از مدل K2P و روش Maximum parsimony با ۱۰۰۰ جایگشت



شکل ۱: درخت تبارشناسی جنس *Paraschistura* با استفاده از مدل K2P و روش Maximum Likelihood با ۱۰۰۰ جایگشت

استنباط می‌شود که توپولوژی هر سه درخت رسم شده بیش‌تر به یک توپولوژی جغرافیایی نزدیک‌تر باشد تا یک توپولوژی ژنتیکی. بر این اساس جنس مورد مطالعه در چهار کلاد متفاوت قرار گرفته است. گونه‌های *P. bampurensis*, *P. sargadensis* و *Paraschistura* sp مربوط به حوضه‌های سرباز، سرزه، بمپور و مشکید در یک کلاد مشترک (کلاد A) قرار گرفته‌اند و با بوت‌استرپ بیش از ۹۰ درصد تایید شدند، که حوضه جنوب‌شرقی ایران را شامل می‌شوند و بایکدیگر رابطه منوفیلیتیک داشته و هم‌تبار هستند. گونه‌های *P. hormozensis* رودخانه رودان-هرمز مربوط به منطقه جنوبی در یک کلاد مجزا (کلاد B) نزدیک به کلاد (A) قرار گرفته است و با بوت‌استرپ بیش از ۸۰ درصد تایید شدند. گونه *Paraschistura* sp مربوط به حوضه جگین واقع در مکران بدون قرار گرفتن در کلاد مشخصی بعد از دو کلاد حوضه جنوب‌شرقی و جنوبی قرار می‌گیرد (کلاد C). گروه دیگر مربوط به گونه‌های، *P. abdolii* از حوضه سیرجان، جازموریان و کول حاجی آباد، *P. naumanni* از رودخانه مند پانال، کول و هله شاپور و گونه *P. delvarii* از حوضه آبریز قره‌آقاج می‌باشد که در یک کلاد (کلاد D) قرار می‌گیرند و با هم رابطه منوفیلیتیک دارند، که گونه‌های جنوبی ایران را شامل می‌شوند و با بوت‌استرپ بیش از ۸۰ درصد تایید شدند. گونه‌های شناسایی شده در قسمت جنوب‌شرقی مربوط به کلاد (A,B,C) به صورت مشترک در یک کلاستر مشترک قرار گرفته‌اند و با بوت‌استرپ ۹۹ درصد تایید شدند و نسبت به هم رابطه پلی‌فیلیتیک دارند، که موید ارتباط نزدیک و رابطه خویشاوندی این گونه‌ها نسبت به یکدیگر است (شکل ۱).



شکل ۳: درخت تبارشناسی جنس *Paraschistura* با استفاده از مدل K2P و روش Neighbour-joining با ۱۰۰۰ جایگشت

تفسیر براساس درخت تبارشناسی با روش Maximum Likelihood در شکل ۱ و با توجه به دو درخت تبارشناسی دیگر انجام شده است.

جدول ۵: تخمین تمایز تکاملی ژنتیکی بین گونه‌های جنس *Paraschistura* در جنوب ایران، بیان براساس تعداد جایگزینی بازها در هر سایت

گونه	<i>P. abdolii</i>	<i>P. naumanni</i> K	<i>P. bampurensis</i> B	<i>P. sargadensis</i> M	<i>P. bampurensis</i> Sa	<i>P. bampurensis</i> Sar	<i>P. hormozensis</i> c	<i>Paraschistura</i> sp Sar	<i>P. hormozensis</i>	<i>Paraschistura</i> sp J	<i>P. delvarii</i> Q
<i>P. abdolii</i>	۰/۱۸۵										
<i>P. naumanni</i> K	۰/۱۸۵	۰/۳۲									
<i>P. bampurensis</i> B	۰/۱۹۸	۰/۱۲۶	۰/۱۲۶								
<i>P. sargadensis</i> M	۰/۱۹۵	۰/۱۳۶	۰/۱۳۶	۰/۱۰							
<i>P. bampurensis</i> Sa	۰/۲۰۸	۰/۱۳۰	۰/۱۳۰	۰/۰۶	۰/۱۳						
<i>P. bampurensis</i> Sar	۰/۲۰۶	۰/۱۲۸	۰/۱۲۸	۰/۰۵	۰/۱۱	۰/۰۲					
<i>P. hormozensis</i> c	۰/۱۹۵	۰/۱۲۲	۰/۱۲۲	۰/۴۰	۰/۴۸	۰/۴۴	۰/۴۲				
<i>Paraschistura</i> sp Sar	۰/۲۰۳	۰/۱۲۲	۰/۱۲۲	۰/۰۳	۰/۱۰	۰/۰۶	۰/۴۰	۰/۴۰			
<i>p. hormozensis</i>	۰/۱۹۵	۰/۱۲۲	۰/۱۲۲	۰/۴۰	۰/۴۸	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۰	۰/۴۰		
<i>Paraschistura</i> sp J	۰/۲۰۶	۰/۱۱۴	۰/۱۱۹	۰/۴۲	۰/۴۶	۰/۴۴	۰/۵۴	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۵۴	
<i>P. delvarii</i> Q	۰/۱۸۲	۰/۳۰	۰/۴۶	۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۲۳	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۱	۰/۲۳

\* حوضه گونه‌ها در جدول به اختصار آورده شده است. C= Common snout, Q= QarahAqaj, J= Jegin, Sar= sarzeh, Sa= sarbaz, M= Mashkid, B= Bampor, K= Kol



## بحث

با توجه به اندازه کوچک و شباهت ریختی بالای گونه‌های جنس *Paraschistura* و مشکلات شناسایی آرایه‌های این جنس با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، روش بارکد گذاری DNA می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای بررسی تنوع و تفکیک گونه‌ها مورد استفاده قرار بگیرد چرا که شناسایی سنتی (بر اساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی و شمارشی) و تشخیص اعضاء این جنس بدون اطلاع از محل صید آن‌ها به‌علت هم‌پوشانی بالای ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بسیار مشکل است. البته فراتر از شناسایی گونه‌ها بارکدگذاری DNA می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای حل مشکلات آرایه‌شناسی مورد استفاده قرار بگیرد (Hebert, 2003). نتایج این بررسی تمایز گونه‌های این جنس را نشان می‌دهد. فون گونه‌های حوضه‌های آبریز جنوب‌شرقی مربوط به کلاد A تا حد زیادی شبیه به هم است گونه‌های این کلاد نمونه‌های حوضه جنوب‌شرقی ایران را شامل می‌شوند به‌صورت مشترک در یک کلاد جای گرفته‌اند ولی در شاخه‌های مجزای قرار دارند، در گذشته حوضه‌های جازموریان مکران و مشکید که محل شناسایی نمونه‌های مورد مطالعه هستند دارای سرمنشاء مشترکی بوده‌اند، مجاورت حوضه‌های آبریز می‌تواند دلیلی بر نزدیکی گونه‌های کلاد A باشد، گونه *P. sargadensis* در جنوب ایران در حوضه‌های هرمز، هامون-جازموریان، هامون-مشکید و مکران شامل: تنگ سره، بلوچستان و قنات شاه عباس در عباس آباد گزارش شده‌اند (Coad, 2014). در مطالعه‌ای (Abdoli, 2000) و Berg (1949) گونه *P. bampurensis* را از حوضه دشت لوت بدون جایگاه خاص، از میانه و پایین دست رودخانه‌های بمپور و حلیل رود واقع در حوضه هامون جازموریان و رودخانه‌های نیک‌شهر و سرباز واقع در شرق مکران ثبت کردند و در منطقه گسترده‌ای از ناحیه جنوب تا جنوب شرقی، حضور دارند. جمعیت‌های گونه *P. bampurensis* مربوط به حوضه سرباز و سرزه نسبت به جمعیت‌های رودخانه بمپور و نمونه *Paraschistura sp* حوضه آبریز نمونه‌های *P. bampurensis* از رودخانه بمپور و *Paraschistura sp* از حوضه سرباز جمعیت‌های مجزای را تشکیل می‌دهند و در یک خوشه قرار گرفته‌اند. با وجود مبهم بودن هویت نمونه *Paraschistura sp* با جمعیت‌های گونه *P. bampurensis* در یک کلاد مشترک قرار گرفته و کم‌ترین فاصله ژنتیکی (0/003) را با گونه مذکور دارد هم‌چنین با توجه به شباهت جابجایی‌های توالی نوکلئوتیدی تشخیص داده شده در ناحیه بارکدینگ ژن COI در جدول 4 می‌توان نتیجه گرفت که این نمونه متعلق به گونه *P. bampurensis* باشد که به‌دلیل موانع جغرافیایی و رانش ژنتیکی بین این دو جمعیت این دو از هم جدا شده‌اند، با توجه به این موضوع که جمعیت رودخانه بمپور و نمونه *Paraschistura sp* رودخانه سرباز در شاخه‌های جدا از

هم‌قرار گرفته‌اند، تنوع ژنتیکی بالایی در درون جمعیت‌های مورد بررسی و تنوع پایینی در بین جمعیت‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. در بین سه جمعیت گونه *P. bampurensis* جمعیت‌های گونه *P. bampurensis* از حوضه بمپور بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (0/128/130) را با سایر جمعیت‌های این گونه دارد، فاصله ژنتیکی بین جمعیت حوضه بمپور و جمعیت حوضه سرباز 0/130 و بین حوضه بمپور و سرزه 0/128 می‌باشد، موانع جغرافیایی و رانش ژنتیکی می‌توانند دلیل ایجاد این فاصله ژنتیکی باشد. با توسعه شهرنشینی و نواحی صنعتی، بعضی از زیستگاه‌های تخم‌ریزی، مکان‌های نوزادگاهی و تغذیه‌ای لاروها از بین رفته‌اند که بنابراین ممکن است جمعیت‌های متفاوتی را در بعضی از زیستگاه‌های جدا شده درون یک ناحیه با فاصله جغرافیایی کوتاه را به وجود آورد (Qian و همکاران، 2011). گونه‌های کلاد *P. hormozensis* B کم‌ترین فاصله ژنتیکی (0/04-0/044) را با جمعیت‌های *P. bampurensis* دارد و نسبت به کلاد A با توجه به طول شاخه جمعیت‌های قدیمی‌تری هستند و احتمال مشتق شدن *P. bampurensis* از این گونه وجود دارد. *P. hormuzensis* احتمالاً بومی حوضه میناب است، جمعیت‌های *P. hormuzensis* پوزه معمولی و پوزه باریک در یک کلاد قرار گرفته‌اند ولی در شاخه‌های مجزا هستند و جمعیت‌های مجزای را تشکیل می‌دهند، این جدای جمعیت درون گونه‌ای به‌دلیل تفاوت در فرم ظاهری پوزه است. این اختلاف ژنتیکی در کنار اختلاف ریخت‌شناسی می‌تواند به فرایند تکاملی در زیستگاه‌ها نسبت داده شود، نوع عادات غذای متفاوت و یا قرار گرفتن در دو نیچ متفاوت می‌تواند موجبات جدایی دو جمعیت را فراهم نماید، برای مثال حضور دیسک دهانی در ماهی کور غار گونه‌های که دارای دیسک دهانی هستند به زندگی در محیط‌های آبی که دارای جریان سریع آب و تغذیه از دیاتومه‌ها، جلبک‌های رشته‌ای و ذرات آلی هستند، نسبت داده می‌شود (Zhang و Hewitt, 2003).

فاصله ژنتیکی در گونه *Paraschistura sp* از حوضه آبریز جگین (کلاد C) با توجه به جدول 5، نسبت به جمعیت‌های *P. bampurensis* از حوضه سرباز-مکران نزدیک به 0/064 و فاصله ژنتیکی این جمعیت نسبت به گونه‌های کلادهای B و D بین 0/055-0/042 و 0/206-0/114 است، با توجه به قرار نگرفتن در کلاد مشترک با گونه‌های مذکور و تفاوت بالا در ناحیه بارکدینگ ژن COI (جدول 4) احتمالاً یک پدیده گونه‌زایی در این حوضه انجام شده یا در حال انجام است. با توجه به هم‌جواری بودن جغرافیایی، گونه *Paraschistura sp* از حوضه جگین مکران کم‌ترین فاصله ژنتیکی و هم‌چنین بیش‌ترین شباهت را با گونه‌های *P. bampurensis* سرباز-مکران و *P. sargadensis* حوضه مشکید نشان می‌دهد. به‌نظر می‌رسد که این نمونه نزدیک به گونه *P. bampurensis* از حوضه سرباز-مکران باشد که نیاز به بازبینی تاکسونومی

دارد. در مطالعه‌های Mousavi-Sabet و همکاران (۲۰۱۵) توانستند گونه‌ای جدید با تفاوت زیادی از لحاظ ساختاری و تکاملی با گونه‌های قبلی با نام شاه کولی امیرکبیر (*Alburnus amirkabiri*) را در منطقه قره‌چای معرفی کنند.

در کلاد D هم‌جواری جغرافیایی دلیل موجهی برای قرار گرفتن این سه گونه در کنار یکدیگر است، جمعیت‌های گونه *P. abdolii* متعلق با جمعیت‌های گونه *P. delvarii* از حوضه آبریز قره‌آعاج در یک خوشه قرار گرفته‌اند. یکی از نمونه‌های گونه *P. abdolii* از حوضه آبریز کول با جمعیت گونه *P. naumanni* از حوضه آبریز کول متعلق به یک خوشه بوده‌اند، رودخانه قره‌آعاج یکی از دو شاخه مهم رودخانه مند و شاخه سرچشمه اصلی آن است که دارای حوضه وسیعی می‌باشد و در نهایت با نام رودخانه مند وارد خلیج فارس می‌شود، گونه *P. delvarii* از بالا دست شاخه‌های فرعی رودخانه قره‌آعاج ثبت شده است (Eagderi و Vatandoust، ۲۰۱۵). گونه *P. abdolii* از سه حوضه آبریز شامل، رودخانه کول که کوه‌های شمالی استان هرمزگان سرچشمه می‌گیرد و وارد خلیج فارس می‌شود، رودخانه سیرجان که از سرشاخه‌های حوضه آبریز بافت است و در شاخه‌های فرعی حوضه آبریز هامون از سرشاخه‌های رودخانه جازموریان سرچشمه می‌گیرد ثبت شده است (Freyhof و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین Freyhof و همکاران (۲۰۱۵) گونه *P. naumanni* را از حوضه آبریز کول، رودخانه مند و رودخانه حله شاپور معرفی کردند. وجود سر شاخه‌های مشترک در بین حوضه‌های مذکور، هم‌جواری جغرافیایی، نبود موانع جغرافیایی و هم‌چنین شرایط مشابه زیستگاهی دلیلی بر وجود مهاجرت، تبادل ژن بین گونه‌های کلاد D و رابطه خویشاوندی نزدیک‌تر نسبت به اعضای سایر کلادها می‌باشد. نمونه‌های گونه *P. abdolii* با سه ایستگاه متفاوت جمعیت مجزایی را تشکیل نداده‌اند و به‌صورت یک جمعیت واحد در این خوشه قرار گرفته‌اند، هم‌چنین جمعیت‌های گونه *P. delvarii* نیز به‌همین صورت در یک خوشه قرار گرفته‌اند، کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های متمایز، نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌های موجود است (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷)، بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به تنوع بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz و Presa، ۲۰۰۹). جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی مابین مناطق باشد. در بررسی حاضر حداکثر مقدار ماتریکس فاصله ژنتیکی براساس ضریب Nei (Nei، ۱۹۷۲)، بین جمعیت‌های *P. abdolii* با جمعیت‌های گونه *P. bampurensis* از حوضه مکران و هم‌چنین *Paraschistura sp* از رودخانه جگین-حوضه مکران می‌باشد که برابر با ۰/۲۰۸ است، با توجه به فاصله جغرافیایی نسبتاً زیاد گونه *P. abdolii* با دو گونه *P. bampurensis*

دارد. در مطالعه‌های Mousavi-Sabet و همکاران (۲۰۱۵) توانستند گونه‌ای جدید با تفاوت زیادی از لحاظ ساختاری و تکاملی با گونه‌های قبلی با نام شاه کولی امیرکبیر (*Alburnus amirkabiri*) را در منطقه قره‌چای معرفی کنند.

در کلاد D هم‌جواری جغرافیایی دلیل موجهی برای قرار گرفتن این سه گونه در کنار یکدیگر است، جمعیت‌های گونه *P. abdolii* متعلق با جمعیت‌های گونه *P. delvarii* از حوضه آبریز قره‌آعاج در یک خوشه قرار گرفته‌اند. یکی از نمونه‌های گونه *P. abdolii* از حوضه آبریز کول با جمعیت گونه *P. naumanni* از حوضه آبریز کول متعلق به یک خوشه بوده‌اند، رودخانه قره‌آعاج یکی از دو شاخه مهم رودخانه مند و شاخه سرچشمه اصلی آن است که دارای حوضه وسیعی می‌باشد و در نهایت با نام رودخانه مند وارد خلیج فارس می‌شود، گونه *P. delvarii* از بالا دست شاخه‌های فرعی رودخانه قره‌آعاج ثبت شده است (Eagderi و Vatandoust، ۲۰۱۵). گونه *P. abdolii* از سه حوضه آبریز شامل، رودخانه کول که کوه‌های شمالی استان هرمزگان سرچشمه می‌گیرد و وارد خلیج فارس می‌شود، رودخانه سیرجان که از سرشاخه‌های حوضه آبریز بافت است و در شاخه‌های فرعی حوضه آبریز هامون از سرشاخه‌های رودخانه جازموریان سرچشمه می‌گیرد ثبت شده است (Freyhof و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین Freyhof و همکاران (۲۰۱۵) گونه *P. naumanni* را از حوضه آبریز کول، رودخانه مند و رودخانه حله شاپور معرفی کردند. وجود سر شاخه‌های مشترک در بین حوضه‌های مذکور، هم‌جواری جغرافیایی، نبود موانع جغرافیایی و هم‌چنین شرایط مشابه زیستگاهی دلیلی بر وجود مهاجرت، تبادل ژن بین گونه‌های کلاد D و رابطه خویشاوندی نزدیک‌تر نسبت به اعضای سایر کلادها می‌باشد. نمونه‌های گونه *P. abdolii* با سه ایستگاه متفاوت جمعیت مجزایی را تشکیل نداده‌اند و به‌صورت یک جمعیت واحد در این خوشه قرار گرفته‌اند، هم‌چنین جمعیت‌های گونه *P. delvarii* نیز به‌همین صورت در یک خوشه قرار گرفته‌اند، کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های متمایز، نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌های موجود است (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷)، بالاتر بودن تنوع درون جمعیتی نسبت به تنوع بین جمعیتی نشان می‌دهد که در بین جمعیت‌های مختلف ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد (Diz و Presa، ۲۰۰۹). جریان ژنی بالا می‌تواند ناشی از مهاجرت طبیعی مابین مناطق باشد. در بررسی حاضر حداکثر مقدار ماتریکس فاصله ژنتیکی براساس ضریب Nei (Nei، ۱۹۷۲)، بین جمعیت‌های *P. abdolii* با جمعیت‌های گونه *P. bampurensis* از حوضه مکران و هم‌چنین *Paraschistura sp* از رودخانه جگین-حوضه مکران می‌باشد که برابر با ۰/۲۰۸ است، با توجه به فاصله جغرافیایی نسبتاً زیاد گونه *P. abdolii* با دو گونه *P. bampurensis*

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، پراکنش گونه‌های جنس *Paraschistura* در جنوب ایران بیش‌تر شبیه به یک توپولوژی جغرافیایی است گونه‌های *P. bampurensis*، *P. sargadensis* و *P. abdolii* *Paraschistura sp* به‌علت هم‌جواری جغرافیایی و شرایط زیستگاهی مشابه، تشابه ژنتیکی بالا و کم‌ترین فاصله ژنتیکی را نسبت به هم نشان دادند. گونه‌های *P. hormuzensis* پوزه باریک و پوزه معمولی دو جمعیت مجزا را نشان داده‌اند، که بیانگر تنوع درون گونه‌ای بالا به دلیل تفاوت در فرم ظاهری پوزه می‌باشد. گونه‌های *P. abdolii*، *P. delvarii* و *P. naumanni* از حوضه‌های آبخیز با سرشاخه‌های مشترک، تشابه ژنتیکی بالایی را نسبت به هم نشان داده‌اند، نبود موانع جغرافیایی و مهاجرت باعث بروز جریان ژنی بالا در درون جمعیت‌های موجود در این سه گونه می‌باشد. گونه *Paraschistura sp* از حوضه آبریز جگین دارای ژنوتیپی متمایز از سایر گونه‌های این جنس بوده، احتمالاً یک پدیده گونه‌زایی رخ داده است که نیاز به بازبینی تاکسونومی دارد. نتایج این مطالعه تا حد زیادی موید یافته‌های مورفولوژیک پیشین است. در مجموع نتایج حاصل از این بررسی کارایی بالای ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز COI را در مطالعات مربوط به آرایه شناسی گونه‌های جنس *Paraschistura* تأیید نمود. هم‌چنین نتایج آرایه‌شناختی بررسی مولکولی اعضای جنس *Paraschistura* بر نتایج آرایه‌شناختی با استفاده از صفات ریختی سنتی منطبق است. با این حال پیشنهاد می‌شود به‌منظور انجام بررسی‌های دقیق‌تر در ارتباط با سگ ماهیان جویباری در ایران از تعداد گونه‌های بیش‌تری استفاده شده و منشأ تکاملی این گونه‌ها در سطح وسیع‌تر انجام شود.

## تشکر و قدردانی

از اساتید بزرگوار و دوستانی که در تدوین این مقاله یاری نموده‌اند،



New Species of Shemaya from the Namak Lake Basin, Iran. Journal of Ichthyology. Vol. 55, No. 1, pp: 40-52.

کمال تشکر و قدردانی را دارد.

## منابع

۱۷. **Nalbant, T.T. and Bianco, P.G., 1998.** The loaches of Iran and adjacent regions with description of six new species (Cobitoidea). Italian Journal of Zoology. Vol. 65, pp: 109-123.
۱۸. **Nei, M., 1972.** Genetic distance between populations. ASN. Vol. 106, No. 949, pp: 283-292.
۱۹. **Pinera, J.A.; Blanco, G.; Vázquez, E. and Sánchez, J.A., 2007.** Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: a preliminary study. Marin Biology. Vol. 151, pp: 2153-2158.
۲۰. **Prokofiev, A.M., 2009.** Problems of the classification and phylogeny of Nemacheilin loaches of the group lacking the preethmoid I (Cypriniformes: Balitoridae: Nemacheilinae). Journal of Ichthyology. Vol. 49, pp: 874-898.
۲۱. **Qian, X.; Fei, C.; Shin, P.K.S.; Cheung, S.G.; Yan, C. and Caihuan, K., 2011.** AFLP analysis of genetic variation among three natural population of horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* along Chinese coast. Chinese journal of Oceanology and limnology. Vol. 29, pp: 284-289.
۲۲. **Regan, C.T., 1911.** A synopsis of the marsipobranchs of the order Hyperoartii. Ann. Mag. Nat. Hist. Vol. 7, No. 8, pp: 193-204.
۲۳. **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Evolution. Vol. 24, pp: 1596-1599.
۲۴. **Vatandoust, S. and Eagderi, S., 2015.** *Paraschistura ilamensis*, a new species of loach from the Tigris River drainage (Teleostei: Nemacheilidae). International Journal of Aquatic Biology. Vol. 3, No. 3, pp: 177-182.
۲۵. **Webb, K.E.; Barnes, D.K.A.; Clark, M.S. and Bowden, D.A., 2006.** DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. Deep-Sea Research. Vol. 53, pp: 1053-1060.
۲۶. **Zhang, D.X. and Hewitt, G.M., 2003.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology. Vol. 12, pp: 563-584.
۲۷. **Zhao, Y.; Li, Q.; Kong, L.; Bao, Z. and Wang, R., 2007.** Genetic diversity and divergence among clam *Cyclina sinensis* populations assessed using amplified fragment length polymorphism. Fisheries Science. Vol. 73, pp: 1338-1343.
۱. **Abdoli, A., 2000.** The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wild life. Tehran.
۲. **Berg, L.S., 1949.** Freshwater fishes of Iran and adjacent countries. Trady Zoologii Icheskogd Institute Academic. Nauk U.S.S.R.; (in Russia). Vol. 8, pp: 783-858.
۳. **Berg, L.S., 1948-1949.** Freshwater fishes of the U.S.S.R. and adjacent countries. Part. 2. Fourth edition. Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moskva and Leningrad. pp: 470-925.
۴. **Bănărescu, P. and Nalbant, T.T., 1966.** The 3rd Danish Expedition to Central Asia. Zoological results 34. Cobitidae (Pisces) from Afghanistan and Iran. Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kobenhavn. Vol. 129, pp: 149-186.
۵. **Bănărescu, P.M. and Nalbant, T.T., 1998.** *Cobitis elongata* Heckel and Kner, 1858 (Pisces: Ostariophysi: Cobitidae): distribution, relationships, geographical variation and protection status. Revue.
۶. **Coad, B.W., 2014.** Freshwater Fishes of Iran. Available from: www.briancoad.com. Retrieved 9/10/2014.
۷. **Diz, P.A. and Presa, P., 2009.** The genetic diversity pattern of *Mytilus alloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. Vol. 287, pp: 278-285.
۸. **Freyhof, J.; Sayyadzadeh, G.; Esmaili, H.R. and Geiger, M., 2015.** Review of the genus *Paraschistura* from Iran with description of six new species (Teleostei: Nemacheilidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters. Vol. 26, No. 1, pp: 1-48.
۹. **Hashemzadeh Segherloo, L.; Bernatchez, L.; Golzarianpour, K.; Abdoli, A.; Primmer, C.R. and Bakhtiary, M., 2012.** Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. J of Fish Biology. Vol. 81, No. 5, pp: 1747-1753.
۱۰. **Hansen, M.M.; Nielsoen, E.E.; Bekkevold, D. and Mensberg, K.L.D., 2001.** Admixture analysis and stocking impact assessment in Brown trout (*Salmo trutta*) estimated with incomplete baseline data. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences. Vol. 58, No. 18, pp: 18-27.
۱۱. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2002.** Biological identifications through DNA barcodes. The Royal Society.
۱۲. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society. Vol. 270, pp: 313-322.
۱۳. **Kimura, M., 1980.** A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular Evolution. Vol. 16, pp: 111-120.
۱۴. **Kottelat, M., 2012.** Conspectus Cobitidum\*: An Inventory of the Loaches of the World (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei). The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement. Vol. 26, pp: 1-199.
۱۵. **Mousavi-Sabet, H. and Eagderi, S., 2015.** *Paraschistura delvarii* spec. nov. a new species of stone loach from the Persian Gulf basin, southern Iran (Teleostei: Nemacheilidae). Published online at www.senckenberg.de /vertebrate zoology on 13.xi.2015. Vol. 65, No. 3, pp: 297-303.
۱۶. **Mousavi-Sabet, H.; Vatandoust, S.; Khataminejad, S.; Eagderi, S.; Abbasi, K.; Nasri, M.; Jouladeh, A. and Vasil'eva, E.D., 2015.** *Alburnus amirkabiri* (Teleostei), a

