

**تبارشناسی مولکولی اعضای جنس *Capoeta* Valenciennes, 1842
(Teleostei, Cyprinidae) در ایران با استفاده از ژن سیتوکروم *Cytb***

**Molecular phylogeny of *Capoeta* Valenciennes, 1842
(Teleostei, Cyprinidae) species in Iran, using the
cytochrome *b* gene**

آرش جولاده رودبار^{۱*}

۱- دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Jouladeh-Roudbar A^{*1}

1- PhD, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of
Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jouladehroudbar@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

جنس سیاه ماهی *Capoeta* با دارا بودن حداقل ۳۶ گونه معتبر یکی از مهم ترین جنس های خانواده کپورماهیان Cyprinidae، از لحاظ تنوع و دامنه پراکنش در خاورمیانه است. اغلب گونه های این جنس از لحاظ ریختی به یکدیگر مشابه بوده و جمعیت های دورگه و یا حد واسط از آن ها در بسیاری از نقاط مشاهده می شود. این امر سبب شده شناسایی آن ها توسط محققان همواره با مشکل مواجه باشد. اگرچه مطالعات نسبتاً گسترده ای روی اعضای این جنس صورت گرفته اما هدف غالب این مطالعات بررسی یک کمپلکس و یا توصیف فردی اعضای این جنس بوده است، لذا به منظور بررسی جامع وضعیت آرایه شناسی اعضای این جنس مطالعه ای با استفاده از تحلیل ژن سیتوکروم *Cytb* انجام شد. در همین راستا توالی های جنس *Capoeta* با توجه به مطالعات پیشین از پایگاه NCBI استخراج شد، پس از اصلاح و هم ردیفی توالی ها، بهترین مدل تکاملی جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار ModelFinder انتخاب و درخت تبارشناسی با استفاده از نرم افزار IQTREE ترسیم شد. با توجه به نتایج حضور ۱۹ گونه مستقل و معتبر از این جنس که مشتمل بر سه شاخه اصلی ایران-آنانولی، آرال-کاسپین و بین النهرین تأیید شد. همچنین حضور گونه *C. razii* در حوضه تیگریس (حوالی شهر اسدآباد، همدان) تأیید و شواهدی برای مترادف نمودن *C. coadi* با *birunii* ارائه شد. علاوه بر این با توجه به نتایج اعتبار گونه *C. sevangi* و حضور آن در ایران مورد تأیید قرار گرفت.

واژه های کلیدی

ایران
تبارشناسی
سیاه ماهی
کمپلکس ریختی

مقدمه

جنس سیاه ماهی *Capoeta Valenciennes*, 1842 متعلق به خانواده کپورماهیان بوده تاکنون بیش از ۳۰ گونه اسمی از این جنس در آب‌های داخلی ایران گزارش شده است (Berg 1949; Coad and krupp 1994; Özuluğ and Freyhof 2008; Coad 2010; Levin et al. 2012; Alwan et al. 2016; Ghanavi et al. 2016; Zareian et al. 2016; Jouladeh-Roudbar et al. 2016, 2017a, 2017b; Zareian et al. 2017a, 2017b; Levin et al. 2019; Jouladeh-Roudbar et al. 2020). پراکنش اعضای این جنس از تمامی حوضه‌های آبریز ایران به غیر از حوضه‌های ماسکید و سیستان گزارش شده است (Jouladeh-Roudbar et al. 2015, 2020). برخی از گونه‌های این جنس از لحاظ ظاهری بسیار به یکدیگر شبیه هستند به نحوی که تفکیک آن‌ها از یکدیگر نیاز به تجربه و بررسی‌های دقیق ریخت‌شناختی و بعضاً مولکولی دارد (Coad and krupp 1994; Özuluğ and Freyhof 2008; Coad 2010; Levin et al. 2012; Ghanavi et al. 2016). بر اساس همین شباهت‌ها در ویژگی‌های ریختی گونه‌های این جنس در ایران در سه کمپلکس ریختی شامل *C. damascina*, *C. capoeta* و *C. trutta* دسته‌بندی می‌شوند (Levin et al. 2012; Ghanavi et al. 2016). گونه‌های کمپلکس *C. damascina* به واسطه فلس‌های ریز شناسایی می‌شوند و شامل گونه‌های *C. buhsei* (مکان مرجع^۱: احتمالاً رودخانه کرج)، *C. coadi* (رودخانه بشار، حوضه تیگریس)، *C. ferdowsii* (رودخانه تنگ شیو، تیگریس)، *C. pyragyi* (رودخانه تیره، تیگریس)، *C. saadii* (رودخانه پلوار، حوضه کر)، *C. shajariani* (رودخانه گاماسیاب، تیگریس) و *C. umbla* (رود تیگره، تیگریس) است. دسته دوم شامل گروه گونه‌های *C. capoeta* هستند، اعضای این گروه به واسطه فلس‌هایی با اندازه متوسط تا درشت شناسایی می‌شوند. گونه‌های *C. aculeata* (احتمالاً رودخانه کر، حوضه کر)، *C. alborzensis* (رودخانه نم‌رود، حوضه کویر)، *C. fusca* (احتمالاً قناتی در روستای میاندهی، حوضه کویر)، *C. gracilis* (احتمالاً زاینده رود، حوضه اصفهان)، *C. heratensis* (هریرود، حوضه تجن)، *C. kaput* (ارس، حوضه کاسپین)، *C. razii* (رودخانه خیرود، حوضه کاسپین) در این دسته جای می‌گیرند. آخرین گروه

گونه نیز شامل گونه‌های کمپلکس *C. trutta* هستند. اعضای این گروه به واسطه شعاع سخت خار مانند روی باله پشتی و لکه‌های پراکنده سیاه روی نیمه بالایی بدن شناسایی می‌شوند. گونه‌های *C. anamisensis* و *C. mandica* نیز در این گروه قرار می‌گیرند (Levin et al. 2012; Ghanavi et al. 2016).

برای مدت طولانی، برخی از اعضای این جنس در ایران ناشناخته بوده و در بین محققان بر سر شناسایی و گونه‌های معتبر آن اختلاف نظر وجود داشته است (Berg 1949; Coad and krupp 1994; Özuluğ and Freyhof 2008; Coad 2010; Ghanavi et al. 2016). اولین مطالعه جامع و با استفاده از داده‌های مولکولی را در ایران که سه کمپلکس گونه‌ای این جنس را بررسی می‌نمود (Ghanavi et al. 2016) انجام دادند. بر اساس مطالعه آن‌ها در آب‌های داخلی ایران ۱۶ گونه از این جنس وجود داشت که شش گونه از این تعداد تا آن زمان توصیف نشده بودند. در ادامه با مطالعات (Jouladeh-Roudbar et al. 2016, 2017a, 2017b) و (Zareian et al. 2016, 2017a, 2017b) گونه‌های جدیدی از این جنس توصیف شد و جمعیت‌های جدیدی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. اما با مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعات ذکر شده اختلاف نظر به وضوح مشاهده می‌شود به عنوان مثال (2017) Zareian et al. معتقدند گونه *C. sevangi* در ایران وجود دارد در حالی که دیگر مطالعات این گونه را معتبر نمی‌دانند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر (Zareian et al. 2017a) گونه *C. birunii* را از حوضه اصفهان توصیف نمودند در حالی که (Jouladeh-Roudbar et al. 2020) این گونه را معتبر ندانست.

با توجه به مطالب عنوان شده به نظر می‌رسد تاکنون مطالعه‌های صورت گرفته روی سیاه ماهیان ایران به صورت موردی بوده است، بنابراین اکنون با توجه به افزایش داده‌های مولکولی از این جنس می‌توان با تجزیه و تحلیل داده‌های مبتنی بر ژن *Cytb* می‌توان در مورد اعضای این جنس تصمیم‌گیری دقیق‌تری نمود، پیش از این نیز در مطالعات مختلفی برای بررسی وضعیت آرایه‌شناسی این جنس از ژن *Cytb* استفاده شده بود (Levin et al. 2012; Ghanavi et al. 2016; Bektas et al. 2017). لذا این مطالعه با هدف بررسی آرایه‌شناسی اعضای این جنس در

¹ مکانی که توصیف گونه برای اولین بار از آن صورت گرفته است. Type locality

شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. قطعه‌های تکثیر شده با استفاده از آغازگر رفت *GluFish F* توالی‌یابی شدند. توالی‌های جنس *Capoeta* با توجه به مطالعات پیشین از پایگاه NCBI جمع‌آوری شد. توالی‌های فوق و توالی‌ها حاصل از نمونه‌های نهر بوجین با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2020 ویرایش شدند. عملیات یکپارچگی توالی‌های ژن *Cytb* با استفاده از CLUSTALW انجام شد (Larkin et al. 2007). برای یافتن بهترین مدل تکاملی جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار ModelFinder استفاده شد (Kalyaanamoorthy et al. 2017). با توجه به خروجی و بر اساس بالاترین میزان BIC (Bayesian information criterion scores) این نرم‌افزار مدل تکاملی TIM2+F+I+G4 را برای تجزیه و تحلیل توالی‌های اشاره شده، پیشنهاد نمود. برای ترسیم درخت تبارشناسی از نرم‌افزار IQTREE و بوت استرپ ۲۰۰۰ استفاده شد. برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی توالی‌های حاصله از روش uncorrelated distance در نرم‌افزار MEGA v. 7.0 استفاده شد (Kumar et al. 2016). همچنین برای ترسیم درخت‌های به‌دست آمده نیز از نرم‌افزار FigTree v. 1.5 استفاده شد (Rambaut, 2009). گونه *Barbus lacerta* (KU167892, AF145935) نیز برای برون انتخاب شد.

نتایج

در مجموع ۴۱۶ توالی به طول حداکثر ۱۱۴۱ جفت‌باز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۷۴۵ جایگاه (در حدود ۶۵/۲۹ درصد) دارای وضعیت ثابت بوده و ۳۹۶ جایگاه دارای چند شکلی بود. بر اساس نتایج حاصل از ModelFinder بهترین مدل تکاملی برای مجموعه داده‌های این پژوهش مدل تکاملی TPM2+F+G4 انتخاب شد. همچنین بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل بازهای آلی تشکیل دهنده ژن *COI* نمونه‌های بررسی شده، میزان باز آدنین (A) ۲۶ درصد، باز تیمین (T) ۳۰ درصد، باز سیتوزین (C) ۲۶ درصد و باز گوانین (G) ۱۸ درصد به‌دست آمد. با توجه به درخت تکاملی به‌دست آمده اعضای مورد بررسی جنس *Capoeta* در سه شاخه اصلی ایران-آناتولی، ارال-کاسپین و بین النهرین قرار گرفتند (شکل ۱). به‌دلیل بزرگ بودن درخت

آب‌های داخلی ایران با استفاده از تجزیه تحلیل داده‌های ژن *Cytb* صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۷ از نهر بوجین، (ریزآبه به رود گاماسیاب، حوضه تیگریس؛ Lat: 34.85728°, Long: 48.03314) با استفاده از دستگاه صید الکتریکی SAMUS 725M نمونه‌برداری صورت گرفت. تعداد هفت نمونه برای شناسایی ریختی در محل صید نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۵ درصد تثبیت شد، علاوه بر آن باله سینه‌ای سمت راست بدن سه نمونه در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و برای انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

قطعه‌ای از باله‌های سینه‌ای نمونه‌ها پس از هموژن نمودن با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج DNA شد (Miller et al. 1988). برای تعیین کمیت و کیفی DNA استخراجی نمونه‌ها از روش‌های طیف سنجی نوری و الکتروفورز افقی ژل ۰/۵ درصد آگارز با ولتاژ ۸۰ ولت در دستگاه BIO-RAD استفاده شد.

جهت تکثیر ژن *Cytb* از آغازگر رفت *GluFish F* (-5' AACCACCGTTGTTATTCAACTACAA-3' و برگشت

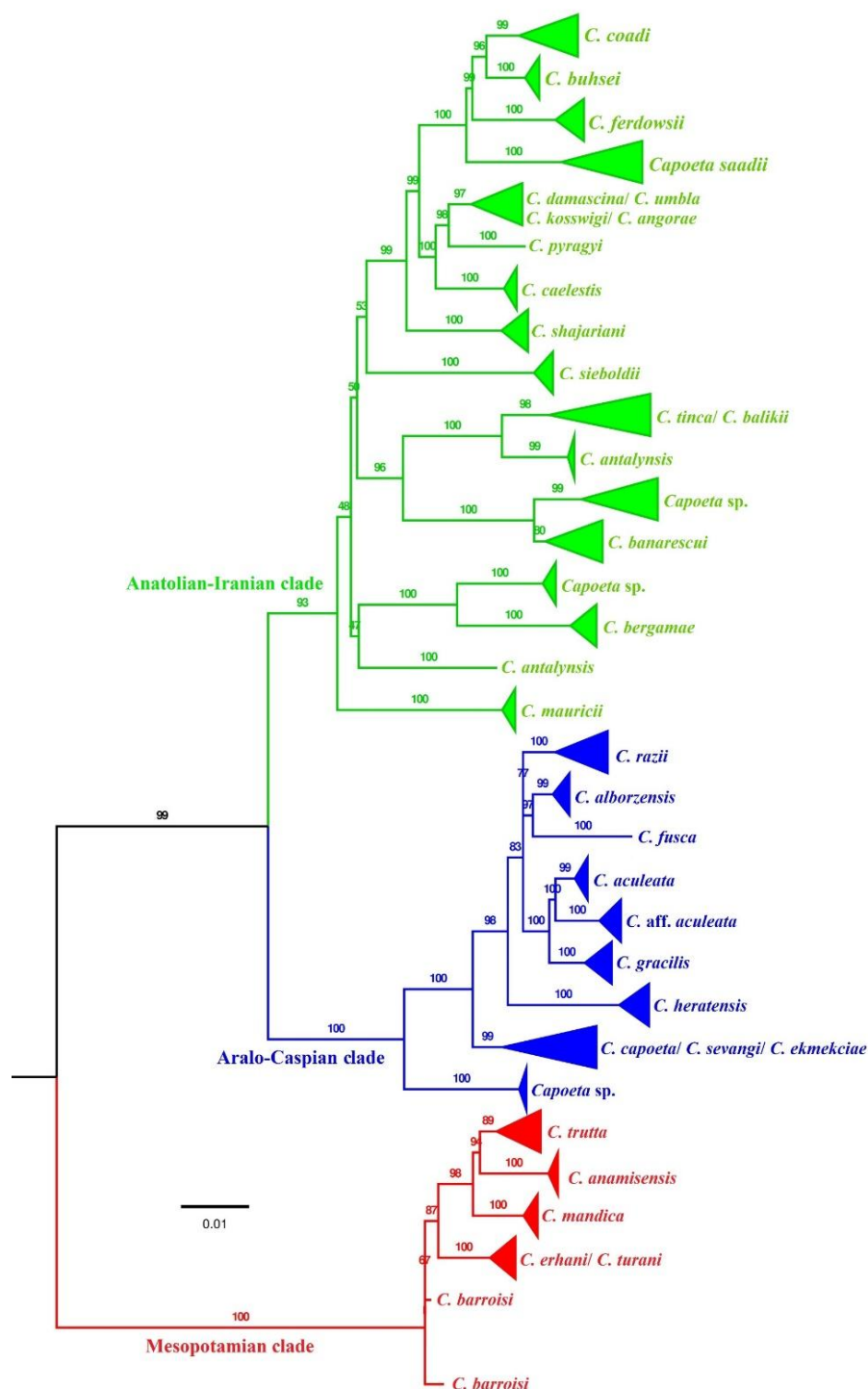
R- Fish2 THR (-5' AACCTCCGACATCCGGCTTACAAGACCG-3' استفاده

شد (Sevilla et al. 2007). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که از مقدار ۳ میکرولیتر بافر 10X، ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلرید (MgCl₂)، یک میکرولیتر پرایمر رفت و یک میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر (10 mM dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۵ u/μl) و یک میکرولیتر DNA الگو و ۱۱/۷ میکرولیتر آب مقطر بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌صورت واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه، به دنبال آن ۳- چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۷/۷ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود (Ghanavi et al. 2016). پس از اطمینان از تکثیر موفق و بدون آلودگی قطعه مورد نظر ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به

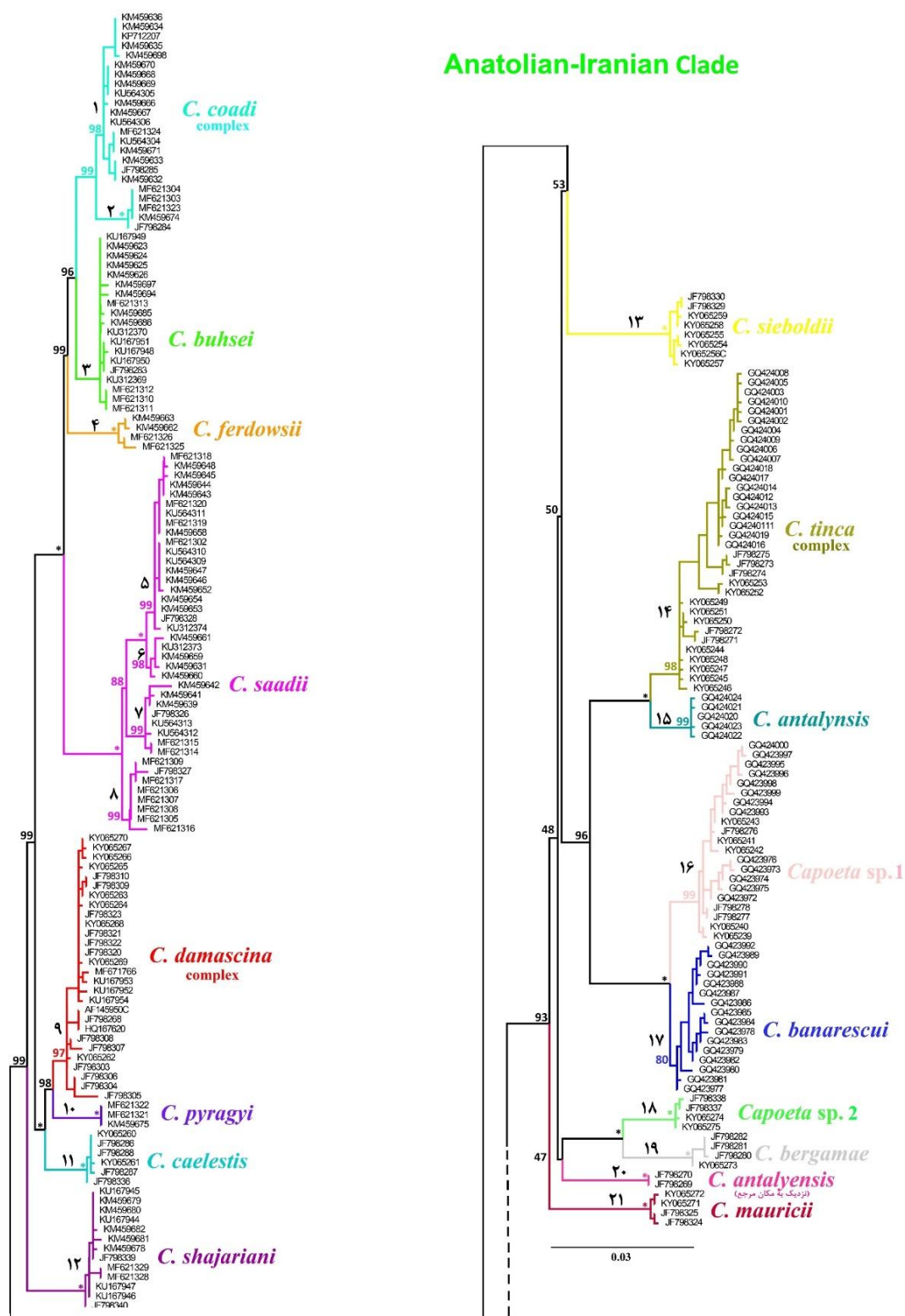
حمایت می‌شدند. میزان فاصله ژنتیکی uncorrelated میان این زیرشاخه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. علاوه بر این میزان اختلاف ژنتیکی درون شاخه‌ای نیز برای هر گونه در جدول ۳ نشان داده شده است.

تکاملی به دست آمده هریک از شاخه‌های اصلی به دست آمده برای درک بهتر در سه قسمت مجزا ارائه شده است (شکل‌های ۲ و ۳).

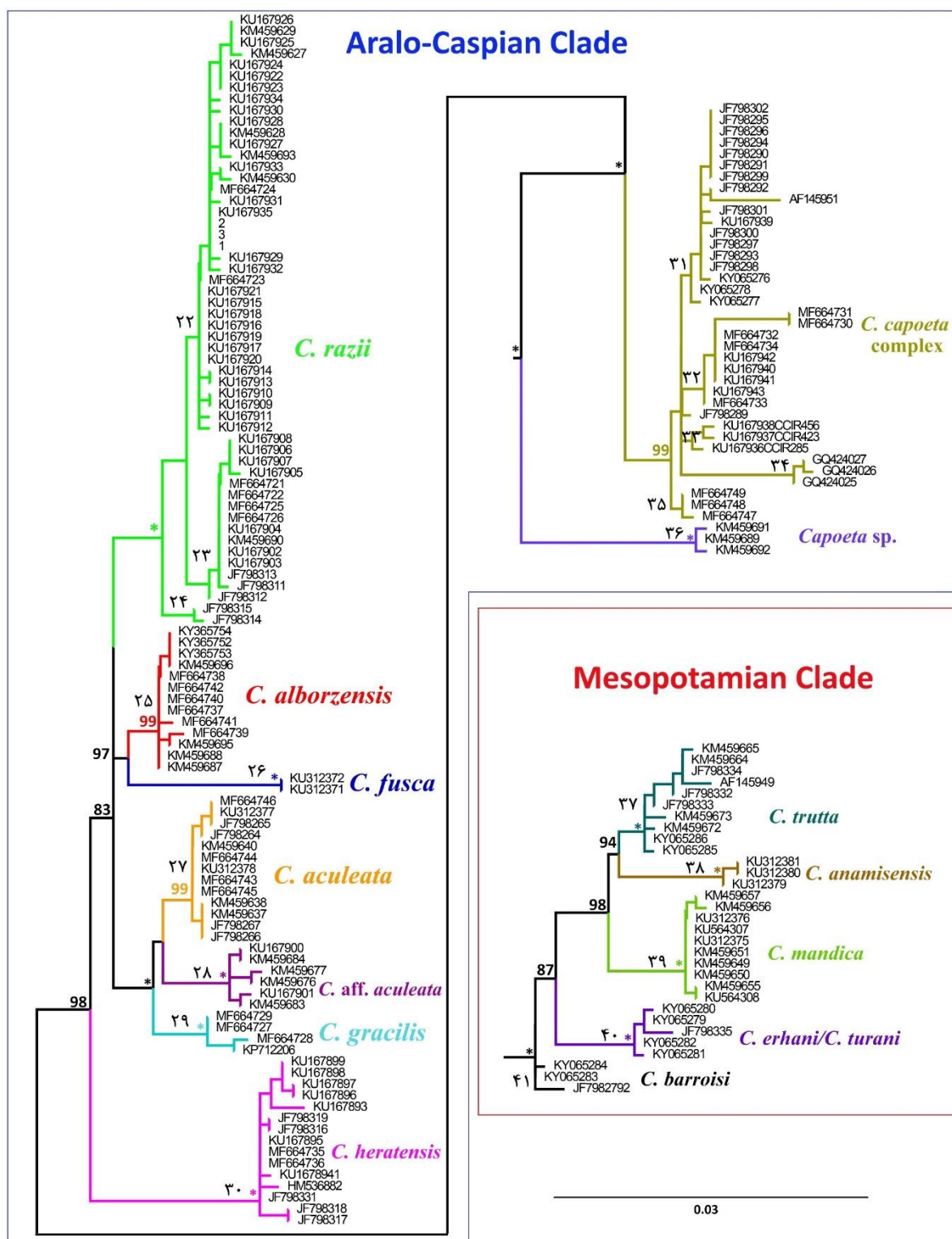
همچنین با توجه به نتایج ترسیم درخت تبارشناسی اعضای جنس *Capoeta* در ۴۱ زیر شاخه قرار گرفتند که با میزان بالای UFB2



شکل ۱- درخت تبارشناسی خلاصه شده اعضای مورد بررسی جنس *Capoeta* با استفاده از نرم‌افزار IQ-TREE (اعداد روی بازوها میزان UFB2 است).



شکل ۲- درخت تبارشناسی شاخه ایران-آناتولی اعضای مورد بررسی جنس *Capoeta* با استفاده از نرم افزار IQ-TREE (اعداد روی بازوها میزان UFBboot2 است، در صورت کامل بودن UFBboot2 در گره از ستاره * استفاده شد).



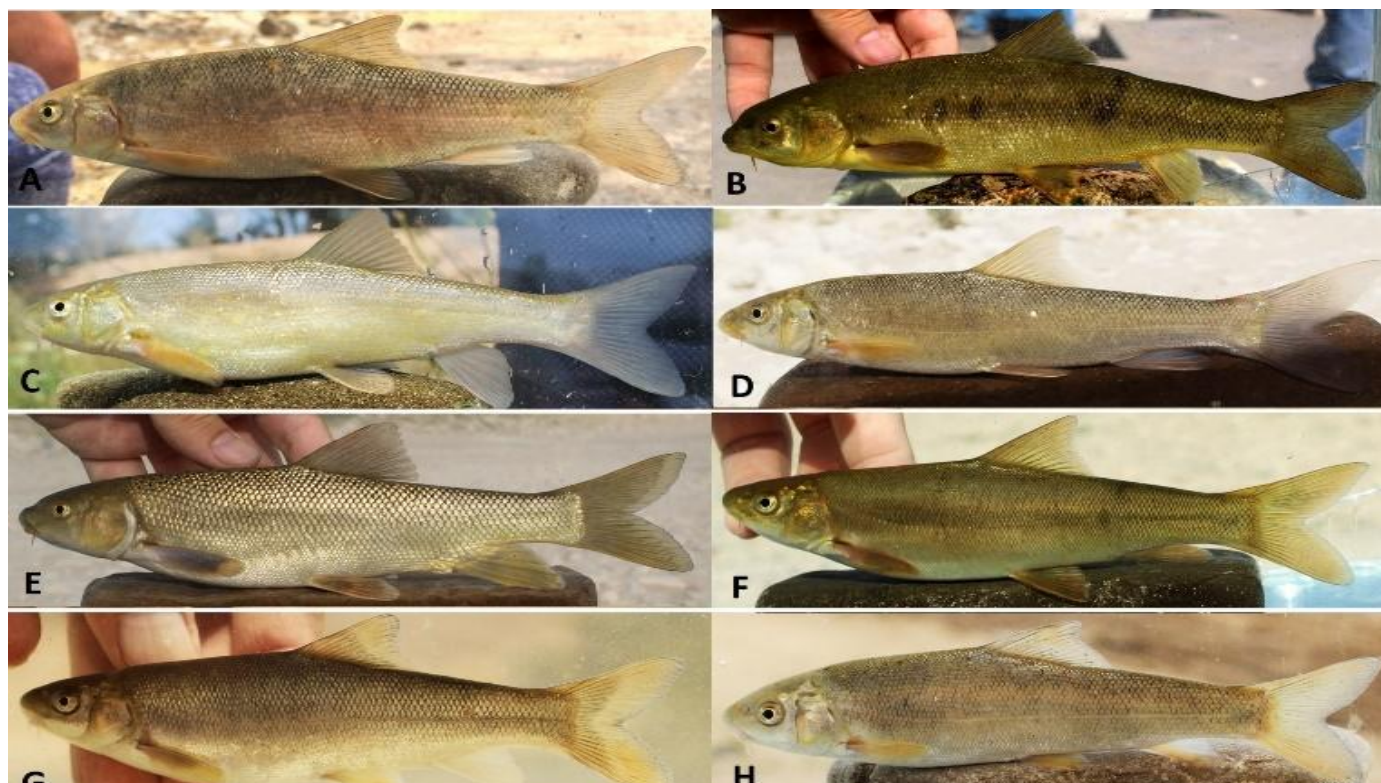
شکل ۳- درخت تبارشناسی شاخه‌های آرال-کاسپین و بین‌النهرین اعضای مورد بررسی جنس *Capoeta* با استفاده از نرم‌افزار IQ-TREE (اعداد روی گره‌ها میزان UFBoot2 است. در صورت کامل بودن UFBoot2 در گره از ستاره * استفاده شد).

[illegible]

جدول ۲- تمایز ژنتیکی درون شاخه‌های درخت تبارشناسی جنس *Capoeta* بر اساس درصد تفاوت در ژن *Cytb*.

۲۱	۲۰	۱۹	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶		۵	۴	۳	۲	۱	
۰/۱۸	۰/۰	۰/۲۸	۰/۰	۰/۶۶	۱/۱۸	۰/۱۱	۰/۸۵	۰/۰	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۰	۰/۲۸	۰/۷۰	۰/۱۹	۰/۱۱		۰/۱۴	۰/۰	۰/۹۰	۰/۱۱	۰/۲۲	درصد تمایز

	۴۱	۴۰	۳۹	۳۸	۳۷	۳۶	۳۵	۳۴	۳۳	۳۲	۳۱	۳۰	۲۹	۲۸	۲۷		۲۶	۲۵	۲۴	۲۳	۲۲	
	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۳۷	۰/۱۸	۰/۶۷	۰/۳۵	۰/۴۱	۰/۱۸	۰/۲۴	۰/۱۱		۰/۰	۰/۰۴	۰/۲۸	۰/۰	۰/۱۵	درصد تمایز



شکل ۴- نمای جانبی گونه‌های بررسی شده جنس *Capoeta* در این مطالعه؛ A: سیاه ماهی کد، *C. coadi*؛ B: سیاه ماهی کد، *C. coadi*؛ رودخانه بشار؛ C: سیاه ماهی ریزپولک، *C. buhsei*؛ رودخانه نمرو؛ D: سیاه ماهی فردوسی، *C. ferdowsii*؛ رودخانه تنگ شیو؛ E: سیاه ماهی سعدی، *C. saadii*؛ رودخانه شاپور؛ F: سیاه ماهی دمشقی، *C. damascina*؛ رودخانه گاو رود؛ G: سیاه ماهی فراغی، *C. pyragyi*؛ رودخانه تیره و H: سیاه ماهی شجریان، *C. shajariani*؛ رودخانه گاماسیاب.

C. heratensis, *C. sevangi*, *C. capoeta*, *C. heratensis*, *C. ekmekciae*، یک گونه توصیف نشده و نمونه‌های تعیین توالی شده از رودخانه جاجرود (شاخه ۲۲) و در نهایت آخرین شاخه که گونه‌های بین‌النهرین را در خود جای داده نیز شامل گونه‌های *C. turani*, *C. erhani*, *C. mandica*, *C. anamisensis*, *C. trutta* و *C. barroisi* است.

با توجه به نتایج شاخه ایران-آناتولی شامل گونه‌های اسمی *C. coadi*, *C. birunii*, *C. buhsei*, *C. ferdowsii*, *C. saadii*, *C. damascina*, *C. angarae*, *C. umbla*, *C. kossigii*, *C. pyragyi*, *C. caelestis*, *C. shajariani*, *C. sieboldii*, *C. tinca*, *C. baliki* و *C. antalyensis*, *C. banarescui*, *C. bergamae*, *C. mauricii* و دو گونه توصیف نشده است. شاخه آرال-کاسپین نیز شامل گونه‌های اسمی *C. fusca*, *C. alborzensis*, *C. razii* و *C. gracilis*, *C. microlepis*, *C. aff. aculeata*, *C. aculeata*.



شکل ۵- نمای جانبی گونه‌های بررسی شده جنس *Capoeta* در این مطالعه؛ I: سیاه ماهی رازی، *C. razii*، رودخانه خیرود؛ J: سیاه ماهی رازی، *C. razii*، رودخانه؛ K: سیاه ماهی البرز، *C. alborzensis*، رودخانه نم‌رود؛ L: سیاه ماهی درشت پولک، *C. cf. aculeata*، رودخانه بهشت آباد؛ M: سیاه ماهی درست پولک بوجین؛ N: سیاه ماهی خالدار، *C. trutta*، رودخانه گاو رود؛ O: سیاه ماهی هراتی، *C. heratensis*، رودخانه کلات و P: سیاه ماهی اصفهان، *C. gracilis*، رودخانه زاینده رود؛ N: سیاه ماهی خالدار، *C. trutta*، رودخانه گاو رود؛ O: سیاه ماهی هراتی، *C. heratensis*، رودخانه کلات و P: سیاه ماهی معمولی، *C. capoeta*، رودخانه قلعه چای.

اسمی، حضور ۱۹ گونه مشتمل بر سه کمپلکس ریختی *C. damascina*، *C. capoeta* و *C. trutta* و سه شاخه اصلی ایران-آناتولی، آرال-کاسپین و بین‌النهرین در آب‌های داخلی ایران تایید می‌شود.

شاخه ایران-آناتولی

با توجه به نتایج ترسیم درخت تبارشناسی (شکل ۲) حضور گونه‌های *C. coadi*، *C. buhsei*، *C. ferdowsii*، *C. saadii*، *C. C.* در آب‌های داخلی ایران تایید می‌شود. (Zareian and Esmaili 2017a) گونه *C. birunii* را از حوضه زاینده رود توصیف نمودند. بر اساس مطالعه آن‌ها این گونه با *C. coadi* در ژن *COI* در حدود ۲/۹ درصد و در ژن *Cytb* حدود ۱/۳ درصد تمایز ژنتیکی دارد (جدول ۶ و ۸ در مقاله توصیف این گونه).

همچنین بیشترین تمایز درون شاخه‌ای در زیرشاخه شماره ۱۶ مشاهده شد همچنین در زیرشاخه‌های ۴، ۱۰، ۱۳، ۱۸، ۲۳ و ۲۶ تمایزی مشاهده نشد.

بحث

از اولین مطالعات صورت گرفته روی ماهیان آب‌های داخلی ایران و توصیف‌های صورت گرفته توسط Heckle (1843) تا زمان نگارش این پژوهش از جنس *Capoeta* در ایران بیش از ۵۰ گونه اسمی در دنیا توصیف شده است که به ۳۰ مورد از مهم‌ترین آن‌ها در جدول ۳ اشاره شده است. با بررسی نتایج درخت‌های ترسیم شده به وسیله ژن *Cytb* در این مطالعه و مقایسه نتایج محققان دیگر (مولکولی و ریختی‌شناختی) از این تعداد گونه

جدول ۳- گونه‌های اسمی توصیف شده از آب‌های داخلی ایران به همراه وضعیت فعلی و حوضه پراکنش در ایران

ردیف	نام توصیف شده	وضعیت فعلی گونه	پراکنش
۱	<i>Chondrostoma aculeatum</i> Valenciennes 1844	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta aculeata</i>	کر
۲	<i>Capoeta alborzensis</i> Jouladeh-Roudbar, Eagderi, Ghanavi & Doadrio 2016	معتبر؛ بدون تغییر	نمک و کویر
۳	<i>Scaphiodon amir</i> Heckel 1847	مترادف <i>Capoeta saadii</i>	-
۴	<i>Capoeta anamisensis</i> Zareian, Esmaeili & Freyhof 2016	معتبر؛ بدون تغییر	مکران
۵	<i>Capoeta barroisi</i> Lortet 1894	معتبر؛ بدون تغییر	عاصی
۶	<i>Varicorhinus bergi</i> , Derjavin 1929	مترادف*	-
۷	<i>Capoeta birunii</i> Zareian & Esmaeili 2017	مترادف <i>Capoeta coadi</i>	-
۸	<i>Capoeta buhsei</i> Kessler 1877	معتبر؛ بدون تغییر	نمک و کویر
۹	<i>Cyprinus capoeta</i> , Gldenstdt 1773	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta capoeta</i>	غرب کاسپین
۱۰	<i>Capoeta coadi</i> Alwan, Zareian & Esmaeili 2016	معتبر؛ بدون تغییر	حوضه رودخانه بشار؛ تیگریس
۱۱	<i>Gobio damascinus</i> Valenciennes 1842	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta damascina</i>	حوضه سیروان و گاورد؛ تیگریس
۱۲	<i>Capoeta ferdowsii</i> Jouladeh-Roudbar, Eagderi, Murillo-Ramos, Ghanavi & Doadrio 2017	معتبر؛ بدون تغییر	حوضه رودخانه زهره؛ تیگریس
۱۳	<i>Capoeta fusca</i> Nikolskii 1897	معتبر؛ بدون تغییر	هریرود، بجنستان، کویر و شرق کاسپین
۱۴	<i>Scaphiodon gracilis</i> Keyserling 1861	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta gracilis</i>	حوضه زاینده رود، اصفهان
۱۵	<i>Scaphiodon heratensis</i> Keyserling 1861	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta heratensis</i>	هریرود
۱۶	<i>Capoeta capoeta intermedia</i> Bianco & Bnrescu 1982	مترادف <i>Capoeta saadii</i>	-
۱۷	<i>Capoeta kaput</i> Levin, Prokofiev & Roubenyan 2019	معتبر؛ بدون تغییر**	حوضه رود ارس؛ غرب کاسپین
۱۸	<i>Scaphiodon macrolepis</i> Heckel 1847	مترادف <i>Capoeta saadii</i>	-
۱۹	<i>Capoeta barroisi mandica</i> Bianco & Bnrescu 1982	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta mandica</i>	حوضه رودخانه مند، پرسین
۲۰	<i>Scaphiodon niger</i> Heckel 1847	مترادف <i>Capoeta saadii</i>	-
۲۱	<i>Varicorhinus nikolskii</i> , Derjavin 1929	مترادف <i>Capoeta buhsei</i>	-
۲۲	<i>Capoeta nudiventris</i> Nikolskii 1897	مترادف <i>Capoeta fusca</i>	-
۲۳	<i>Capoeta barroisi persica</i> 1969	مترادف <i>Capoeta trutta</i>	-
۲۴	<i>Capoeta pyragyi</i> Jouladeh-Roudbar, Eagderi, Murillo-Ramos, Ghanavi & Doadrio 2017	معتبر؛ بدون تغییر	حوضه رود سزار؛ تیگریس
۲۵	<i>Capoeta razii</i> Jouladeh-Roudbar, Eagderi, Ghanavi & Doadrio 2017	معتبر؛ بدون تغییر	رودهای جنوب دریای کاسپین
۲۶	<i>Scaphiodon saadii</i> Heckel 1847	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta saadi</i>	کر، مکران، مهارلو، پرسین، هرمز، کرمان، سیرجان، لوت، جازموریان
۲۷	<i>Capoeta sevangi</i> De Filippi 1865	مترادف <i>Capoeta capoeta</i>	-
۲۸	<i>Capoeta shajariani</i> Jouladeh-Roudbar, Eagderi, Murillo-Ramos, Ghanavi & Doadrio 2017	معتبر؛ بدون تغییر	حوضه رودخانه گاماسیاب و سیمره، تیگریس
۲۹	<i>Scaphiodon trutta</i> Heckel 1843	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta trutta</i>	تیگریس
۳۰	<i>Scaphiodon umbla</i> Heckel 1843	معتبر؛ تغییر به <i>Capoeta umbla</i>	حوضه رودخانه سیروان و زاب، تیگریس

*: توضیحات تکمیلی در قسمت بحث؛ **: با توجه به نتایج Levin et al. (2019) این گونه مستقل و معتبر در نظر گرفته شده است.

ژنتیکی برای گونه فوق خطایی صورت گرفته باشد زیرا فاصله ژنتیکی محاسبه شده در این مطالعه نیز این میزان اختلاف را با *C. coadi* تأیید نمی‌نماید (جدول ۱؛ ۱؛ *C. coadi*؛ ۲؛ *C. birunii*). با توجه به نتایج این مطالعه جمعیت ساکن مکان مرجع *C. birunii* (شاخه ۲، شکل ۲) با جمعیت مکان مرجع گونه *C. coadi* (شاخه

با توجه به مطالعه گسترده صورت گرفته روی اعضای جنس *Capoeta* تاکنون هیچگاه فاصله ژنتیکی ژن *COI* در هیچ یک از گونه‌های این جنس بیشتر از *Cytb* نبوده است (Levin et al. 2012; Ghanavi et al. 2016; Zareian et al. 2016; Jouladeh-Roudbar et al. 2016, 2017a, 2017b; Zareian et al. 2017b; Levin et al. 2019) بنابراین به نظر می‌رسد در محاسبه فاصله

همانند گذشته حوضه کر و *C. alborzensis* گونه‌ای معتبر در نظر گرفته شود.

De Filippi (1865) گونه *C. sevangi* را از دریاچه سوانگ واقع در کشور ارمنستان توصیف نمود. Berg (1949) این گونه را مترادف *C. capoeta* در نظر گرفت. (Ghanavi et al. 2016) و همکاران نیز بدون اشاره مستقیم و با استفاده از شواهد مولکولی (ژن *Cytb*) این گونه را مترادف *C. capoeta* در نظر گرفت. در ادامه (Zareian et al. 2017b) این گونه به‌عنوان گونه‌ای معتبر در نظر گرفت. با توجه به مقایسه نتایج اشاره شده می‌توان مشاهده کرد فاصله ژنتیکی بین گونه *C. capoeta* و *C. sevangi* در هر دو مطالعه در حدود ۰/۴ درصد برآورد شده است (به‌عنوان مثال بین هاپلوتایپ به شماره دسترسی JF798292 از دریاچه سوانگ و هاپلوتایپ شماره دسترسی JF798289 از رودخانه آگستو، حوضه رودخانه کورا). این در حالی است که به‌نظر می‌رسد اختلاف ژنتیکی قابل قبول در بین گونه‌های معتبر این گونه‌های این جنس بیش از ۱/۵ درصد است (Ghanavi et al. 2016) یا اگر اختلاف ژنتیکی کمتر از این میزان است، اختلاف ریختی معنی‌داری در بین دو گونه معتبر وجود داشته باشد. به‌عنوان مثال شرقی‌ترین جمعیت گونه *C. razii* با غربی‌ترین جمعیت آن در جنوب دریای خزر بیش از یک درصد اختلاف ژنتیکی در ژن سیتوکروم بی دارد. علاوه بر این نمونه‌های دریاچه سوانگ (مکان مرجع گونه *C. sevangi*) در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با توالی‌های ژن سیتوکروم بی به‌صورت پارافلیتیک با نمونه‌های گونه‌ی *C. capoeta* در یک شاخه (clade) قرار می‌گیرد (Ghanavi et al. 2016). علاوه بر موارد ذکر شده Levin et al. (2019) علی‌رغم بررسی سیاه ماهیان حوضه رودخانه ارس، شواهدی از حضور گونه *C. sevangi* در این حوضه ارائه نکردند. علاوه بر موارد ذکر شده در بررسی‌های به‌عمل آمده اختلاف ریختی معنی‌دار و متمایز کننده‌ای در بین نمونه‌های نمونه‌های *C. capoeta* و *C. sevangi* مشاهده نشده است (Jouladeh-Roudbar et al. 2020). لذا با توجه موارد ذکر شده به‌نظر می‌رسد *C. sevangi* باید به‌عنوان مترادف *C. capoeta* در نظر گرفته شود.

شاخه بین‌النهرین

۱، شکل ۲) در حدود ۱/۲ درصد در ژن *Cytb* اختلاف دارد. لذا به‌نظر می‌رسد اختلاف ژنتیکی مورد نظر بین این دو گونه (نمونه صید شده از مکان مرجع *C. coadi*: شکل ۴a؛ *C. birunii*: شکل ۴b) دارای حد قابل قبول برای جدایی دو گونه مجزا و معتبر نمی‌باشد. بنابراین با توجه به اختلاف ژنتیکی اندک و ریخت غیرقابل تفکیک دو گونه از یکدیگر پیشنهاد می‌شود *C. birunii* مترادف *C. coadi* در نظر گرفته شود.

شاخه آرال-کاسپین

از این شاخه نیز حضور گونه‌های *C. alborzensis*، *C. razii*، *C. gracilis*، *C. aff. aculeata*، *C. aculeata fusca*، *C. heratensis* و *C. capoeta* در ایران قابل تأیید است. Valenciennes (1843) گونه *C. aculeata* را از ایران توصیف نمود اما به مکان مرجع این گونه اشاره ننمود. (Coad and Krupp 1991) برای این گونه Lectotype در نظر گرفتند اما آن‌ها محل تپیی را برای این گونه مشخص ننمودند، اما معتقد بودند جمعیت‌های سیاه ماهی درشت فلس در حوضه‌های نمک، کویر، تیگریس، کویر و اصفهان منتسب به این گونه است ولی مطالعات بعدی نشان داد جمعیت‌های ساکن حوضه‌های یاد شده صرفاً متعلق به گونه *C. aculeata* نبوده و جمعیت‌های حوضه اصفهان، کویر و نمک به گونه‌های متفاوتی مربوط است (Ghanavi et al. 2016; Zareian et al. 2016; Jouladeh-Roudbar et al. 2016, 2017b; Zareian et al. 2017a, 2017b). در مطالعات صورت گرفته روی *C. aculeata* جمعیت حوضه کر به‌عنوان جمعیت معتبر و اصلی این گونه در نظر گرفته شده است (Ghanavi et al. 2016; Zareian et al. 2016; Jouladeh-Roudbar et al. 2016, 2017b; Zareian et al. 2017b) اما (Zareian et al. 2017a, 2017b) بدون ارائه سند، حوضه نمک را مکان مرجع *C. aculeata* در نظر می‌گیرد که ناقض نتایج مطالعات پیشین است. همچنین آن‌ها جمعیت حوضه آبریز کر را منتسب به گونه *C. macrolepis* و *C. alborzensis* مترادف *C. aculeata* در نظر گرفتند. با توجه به نتایج این مطالعه جمعیت‌های سیاه ماهی درشت پولک حوضه کر منتسب به *C. aculeata* حوضه کویر و نمک به *C. alborzensis*، حوضه اصفهان به *C. gracilis*، و حوضه تیگریس به *C. aff. aculeata* می‌شود (شکل ۳). بنابراین ضمن رد نتایج مطالعه (Zareian et al. 2017b) پیشنهاد می‌شود مکان مرجع گونه *C. aculeata*

دسترس نیست (Eschmeyer et al. 2020). در ادامه (Coad 1991) این گونه را مترادف *C. aculeata* در نظر گرفت. در تماس تلفنی برقرار شده به تاریخ (دسامبر ۲۰۱۷) با بخش جانور شناسی موزه باکو (محل احتمالی نگهداری هولوتایپ) مسئول مربوطه بخش اذعان داشت نمونه‌ای از این گونه در بخش فوق وجود ندارد. همچنین در مقاله توصیف این گونه (منتشر شده در Bulletin of the Ichthyological Laboratory of Baku) نیز اطلاعات موجود برای شناسایی این گونه کافی نیست. در بررسی‌های میدانی از رودخانه کرج نیز در طی سال‌های گذشته هیچگاه نمونه‌ای سیاه‌ماهان درشت پولک یافت نشده است لذا بر اساس قوانین ICZN (کمسیون بین المللی نام‌گذاری جانوران، International Commission on Zoological Nomenclature) این گونه به‌عنوان *Nomen dubium* (گونه‌ای که غیر ممکن است محل و یا تعلق آن را به گونه‌ای شناخته شده مشخص کنیم) در نظر گرفته شد.

در مجموع با توجه نتایج حاصله از این مطالعه حضور ۱۹ گونه از جنس *Capoeta* در ایران قابل تأیید است. لازم به ذکر است نتیجه‌گیری فوق صرفاً بر اساس تجزیه و تحلیل ژن *Cytb* صورت گرفته است، لذا پیشنهاد می‌شود جهت افزایش دقت و اخذ تصمیمات دقیق‌تر در رابطه با رده‌بندی اعضای این جنس علاوه بر مارکرهای مبتنی بر ژنوم میتوکندریایی (*COI*, *Cytb*) از ژن‌های هسته‌ای نظیر *RAG I* نیز به‌صورت توأمان استفاده شود.

در نهایت شاخه بین‌النهرین نیز شامل گونه‌های *C. trutta*, *C. barroisi* و *C. mandica anamisensis* است. علی‌رغم گزارش‌های پیشین از حضور گونه *C. barroisi* در آب‌های داخلی ایران (Coad 1991; Jouladeh-Roudbar et al. 2015) حضور این گونه در آب‌های داخلی ایران تایید نشد به‌نظر می‌رسد گزارش این گونه در ایران بر اساس شباهت ویژگی‌های ریختی این گونه که نظیر گونه‌های *C. trutta* و *C. mandica* است صورت گرفته باشد. احتمالاً جمعیت *C. barroisi* محدود به حوضه رودخانه عاصی باشد و جمعیت (-های) آن در حوضه بین‌النهرین (تیگریس و فرات) یافت نشود (Bayçelebi 2020). با توجه به نتایج این مطالعه حضور جمعیت *C. razii* در حوضه آبریز تیگریس (نهر بوجین، ریزآبه به گاماسیاب) برای اولین بار با استفاده از داده‌های مولکولی تایید می‌شود، گواه این امر قرار گرفتن نمونه‌های تعیین توالی شده این گونه در خوشه گونه *C. razii* است (شکل ۳، خوشه ۲۲ نمونه‌های ۱ الی ۳). با توجه به اینکه نمونه‌های فوق در کنار هاپلوتایپ‌های تعیین توالی شده از سیستم رودخانه‌ای سفید رود-قزل اوزن قرار می‌گیرند به‌نظر می‌رسد که حضور جمعیت *C. razii* در نهر بوجین ناشی از انتقال ناخواسته آن همراه با کپورماهیان پرورشی باشد اما پیشنهاد می‌گردد برای اثبات این یافته مطالعات بیشتری صورت گیرد. (Derjavin 1929) گونه *Varicorhinus (=Capoeta) bergi* را از رودخانه کرج توصیف نمود اما هولوتایپ این گونه مفقود شده و یا حداقل به‌نظر می‌رسد تاکنون از محل نگهداری آن اطلاعی در

منابع

- Alwan NH, Zareian H, Esmaeili HR (2016) *Capoeta coadi*, a new species of cyprinid fish from the Karun River drainage, Iran based on morphological and molecular evidences (Teleostei, Cyprinidae). *ZooKeys* (572) 155-180.
- Bayçelebi E (2020) Distribution and diversity of fish from Seyhan, Ceyhan and Orontes River systems. *Zoosystematics and Evolution* 96: 747-767.
- Bektas Y, Turan D, Aksu I, Ciftci Y, Eroglu O, Kalayci G, Belduz AO (2017). Molecular phylogeny of the genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia, Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 70: 80-94.

- Berg LS (1949) Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, 4th edition. Part 1. Akademia Nauk USSR, Moscow & Leningrad. 466 p.
- Coad BW (1991) Fishes of the Tigris-Euphrates Basin: a critical checklist. *Syllogeus* 68: 1-49.
- Coad BW (2010) Freshwater fishes of Iraq. Sofia and Moscow (Pensoft): 1-275.
- Coad BW, Krupp F (1994) *Capoeta aculeata* (Valenciennes in Cuv. & Val., 1844), a valid species of cyprinid fish from Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Zoology in the Middle East* 10: 63-72.
- Eschmeyer WN, Fricke R, van der Laan R, (2020) Catalog of Fishes: Genera, Species, References.

- <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Catalog of Fishes electronic version. doi:10.11646/zootaxa.3882.1.1
- Ghanavi HR, Gonzalez EG, Doadrio I (2016) Phylogenetic relationships of freshwater fishes of the genus *Capoeta* (Actinopterygii, Cyprinidae) in Iran. *Ecology and Evolution* 6: 8205-8222.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S, Ghanavi HR, Doadrio I (2016) Taxonomic review of the genus *Capoeta* Valenciennes, 1842 (Actinopterygii, Cyprinidae) from central Iran with the description of a new species. *FishTaxa* 1: 166-175.
- Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S, Ghanavi HR, Doadrio I (2017) A new species of the genus *Capoeta* Valenciennes, 1842 from the Caspian Sea basin in Iran (Teleostei, Cyprinidae). *ZooKeys* 682: 137-155.
- Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S, Murillo-Ramos L, Ghanavi HR, Doadrio I (2017b) Three new species of algae-scraping cyprinid from Tigris River drainage in Iran (Teleostei: Cyprinidae). *FishTaxa* 2: 134-155.
- Jouladeh-Roudbar A, Ghanavi HR, Doadrio I (2020). Ichthyofauna from Iranian freshwater: annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment, *Zoological Studies* 59: 0d
- Jouladeh-Roudbar A, Vatandoust S, Eagderi S, Jafari-Kenari S, Mousavi-Sabet H (2015) Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. *AACL Bioflux* (8)855-909.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, Von Haeseler A, Jermini LS (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14: 587-589.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33: 1870-1874.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Levin B, Freyhof J, Lajbner Z, Perea S, Abdoli A, Gaffaroglu M, Özüluğ M, Haikaz R, Rubenyan HR, Salnikov VB, Doadrio I (2012) Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 62: 542-549.
- Levin, B A, Prokofiev AM, Roubenyan HR (2019). A new species of algae eaters *Capoeta kaput* sp. nov. (Teleostei, Cyprinidae) from Transcaucasia. *Inland Water Biology* 12: 32-41.
- Miller SA, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215-1215.
- Özüluğ M, Freyhof J (2008) *Capoeta turani*, a new species of barbel from River Seyhan, Turkey (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 19: 289-296.
- Rambaut A (2009) FigTree v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Sevilla RG, Diez A, Noren M, Mouchel O, Jerome M, Verrez-Bagnis V, Van Pelt H, Favre-Krey L, Krey G, Bautista JM (2007) Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Resources* 7: 730-734.
- Silvestro D, Michalak I (2012) RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335-337.
- Ward RD, Zemiak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B* 360:1847-1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716.
- Zareian H, Esmaeili HR (2017a) Mitochondrial phylogeny and taxonomic status of the *Capoeta damascina* species group (Actinopterygii: Cyprinidae) in Iran with description of a new species. *Iranian Journal of Ichthyology* 4: 231-269.
- Zareian H, Esmaeili HR, Freyhof J (2016) *Capoeta anamisensis*, a new species from the Minab and Hasan Langhi River drainages in Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa* (4083): 126-142.
- Zareian H, Esmaeili HR, Gholamhosseini A, Japoshvili B, Özüluğ M, Mayden RL (2017b) Diversity, mitochondrial phylogeny, and ichthyogeography of the *Capoeta capoeta* complex (Teleostei: Cyprinidae). *Hydrobiologia* 806: 363-409.