ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٥
صفحه ٥٣٨ - ٥٣١

بررسی روابط تبارشناسی گونه *Alburnoides namaki* Bogutskaya and Coad, 2009 با استفاده از ژن *COI*

Study on phylogenetic of *Alburnoides namaki* Bogutskaya and Coad, 2009 using *COI* gene

آرش جولاده رودبار*[1]، سهیل ایگدری[1]

١-به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Jouladeh Roudbar A[1*], Eagderi S[1]

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arash.aarshaan@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ٩٣/٦/١٥ - تاریخ پذیرش: ٩٥/١٠/٢٦)

چکیده

خیاطه ماهیان (*Alburnoides*) یکی از جنس‌های خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشند که از لحاظ ریخت ظاهری بسیار شبیه به یکدیگر بوده و همین امر باعث دشواری شناسایی گونه-های این جنس شده‌است. امروزه استفاده از روش‌های نوین از جمله نشانگرهای ژنتیکی می‌تواند به شناخت بهتر وضعیت آرایه شناختی آن‌ها کمک نماید. در پژوهش حاضر به‌منظور شناخت وضعیت آرایه‌شناختی گونه خیاطه نمکی *Alburnoides namaki*، از روش شناسه گذاری (بارکدینگ) DNA استفاده شد. نمونه‌های این گونه از رودخانه‌های قره‌چای و آبکمر (حوضه آبریز نمک) با استفاده از دستگاه الکتروشوکر صید شدند. سپس بارکد DNA برای ناحیه COI این گونه گزارش و هم چنین روابط تبارشناسی این اعضای این جنس در ایران بررسی شد. بر اساس این شناسه مولکولی، اعتبار و شناسایی این گونه، توصیف شده براساس ویژگی‌های ریختی، تایید شد. براساس نتایج بیش‌ترین میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده برای گونه *A. namaki* به میزان ٦/٦٧ درصد با گونه *A. holciki* و کم‌ترین مقدار آن با گونه *A. coadi* به میزان ٠/٥٣ درصد محاسبه شد که می‌تواند بیانگر ترادف *A. coadi* با *A. namaki* باشد. نتایج این پژوهش موید این مطلب است که توالی COI می‌تواند در مطالعه تعیین هویت و بررسی روابط تبارشناسی گونه های *Alburnoides* به کار رود.

واژه‌های کلیدی

حوضه دریاچه نمک
شناسه گذاری DNA
ماهی‌خیاطه
COI

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

مقدمه

جنس خیاطه ماهیان *Alburnoides* متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) با ۲۹ گونه در آب‌های شیرین اروپا، قفقاز و آسیای صغیر، آسیای مرکزی و ایران پراکنش دارند (Seifali et al. 2012). اعضای این جنس دارای اندازه کوچک بوده و در رودخانه‌ها و دریاچه‌های با بستر سنگی زیست می‌نمایند (Mousavi-Sabet et al. 2015; Jouladeh-Roudbbar et al. 2015; Jouladeh-Roudbbar et al. 2016; Turan et al. 2016). در سالیان اخیر گونه‌های جنس خیاطه از لحاظ ریختی مورد مطالعه قرار گرفته و چندین گونه جدید از ایران و کشورهای همجوار با استفاده از این ویژگی‌های ریخت‌شناختی توصیف شده است (Jouladeh-Roudbbar et al. 2015).

ماهیان این جنس از لحاظ ریخت ظاهری بسیار به یکدیگر شبیه هستند، به نحوی که در نگاه اول تشخیص آن‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد، به‌علاوه بر اساس مطالعات جولاده رودبار و همکاران (۱۳۹٤) کلید شناسایی ارائه شده برای گونه‌های این جنس قادر به شناسایی و تفکیک آن‌ها از یکدیگر نمی‌باشد و این امر باعث شده تا وضعیت آرایه‌شناختی اعضای این جنس تا حدودی دارای ابهام و بر سر جایگاه آن در بین ماهی‌شناسان اختلاف نظر وجود داشته باشد و از برخی گونه‌های این جنس به‌عنوان یک مجموعه یاد می‌شود. در حال حاضر یازده گونه از این جنس در حوضه های مختلف آبریز کشور از جمله خزر، هریرود، کر، نمک، دجله، ارومیه گزارش شده است و احتمالاً در آینده نیز گونه‌های جدیدتری نیز معرفی خواهند شد (Coad and Bogutskaya, 2012; Jouladeh-Roudbbar et al. 2016).

مطالعات مولکولی مختلفی برروی گونه‌های اروپایی ماهیان جنس *Alburnoides* انجام شده است که اساس این مطالعات نشانگرهای آلوزایم، 16s rDNA، Cytchrome *b* و ناحیه کنترل میتوکندری بوده است (Seifali et al. 2012). اما تا به حال مطالعات معدودی روی گونه‌های ایرانی *Alburnoides* صورت گرفته است (Seifali et al. 2012; Jouladeh-Roudbbar et al. 2016). نشانگرهای ریخت‌شناختی و ژنتیکی، اطلاعات متفاوت اما مکمل یکدیگر را در مورد ساختار و تمایزجمعیت‌های مختلف جانداران ارائه می‌نمایند. DNA بارکدینگ به عنوان نشانگر ژنتیکی، سیستمی نوین برای شناسایی و تمایز گونه‌ها با استفاده از DNA به عنوان بخش استاندارد ژنوم می‌باشد. گزارشات نشان داده که در شناسایی پرندگان، پروانه‌ها، ماهیان، حشرات و انگل‌ها بسیار موثر بوده است (Hebert et al. 2008). مزیت عمده استفاده از ژن *COI* علی‌رغم کوتاهی این بخش از ژن میتوکندریایی، تعیین توالی سریع و ارزان آن است که اطلاعات کافی را برای شناسایی و جدایی گونه‌های نزدیک فراهم می‌آورد (Hebert et al. 2008). گونه خیاطه نمکی *A. namaki* تنها نماینده جنس *Alburnoide* در حوضه آبریز دریاچه نمک است که با توجه به کلیدهای ریخت-شناختی موجود مورد شناسایی قرار نمی‌گیرد، بنابراین این تحقیق به‌منظور بررسی روابط تبارشناسی و اعتبارسنجی این گونه با استفاده از نشانگر مولکولی ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد یک (*COI*) به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

شش نمونه ماهی خیاطه نمکی *A. namaki* با استفاده از دستگاه الکتروشوکر از رودخانه‌های قره‌چای و آب‌کمر (دوآب) در استان مرکزی صید (شکل ۱) و در الکل ۹٦ درصد تثبیت و به آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شد.

جدول ۱- مشخصات ایستگاه‌های نمونه برداری

ردیف	رودخانه	ایستگاه	تعداد	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	قره چای	جلایر	۲	"٤٩ ٢٠ ٤٦°	"٢٠ ٠٤' ٣٤°
۲	آبکمر	دوآب	٤	"٣٦ ٠٢ ٥٠°	"١٢ ٣٤' ٥٣°

شکل ۱- نمای جانبی ماهی خیاطه نمکی *Alburnoides namaki* صید شده از رودخانه قره‌چای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

استخراج DNA با استفاده از روش فنل کلروفروم از باله و عضله ماهی صورت گرفت. دراین روش بافت‌ها در بافر استاندارد STE به همراه پروتئیناز K به مدت ٢٤ ساعت هضم و سپس با استفاده از فنل و کلروفرم خالص‌سازی انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، در آب مقطر حل شد. تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز انجام شد.

آغازگرهایی که برای تکثیر بخشی از ناحیه *COI* استفاده شد، شامل آغازگرهای رفت و برگشت به شرح زیر بودند (Ward et al. 2005).

(FISH1F:5′TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3′) آغازگر رفت

(FISH1R:5′TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3′) آغازگر برگشت

واکنش PCR در حجم ٢٥ میکرولیتر انجام شد و مواد استفاده شده در این واکنش شامل سه میکرولیتر بافر 10X، ١/٥ میکرولیتر کلرید منیزیم (20 mM)، یک میکرولیتر آغازگر رفت و یک میکرولیتر آغازگر برگشت (10 pmol)، ٠/٥ میکرولیتر (10 mM) dNTPs، ٠/٣ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (٣ u/µl) و یک میکرولیتر DNA الگو (١٠٠نانوگرم) بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت اولیه در ٩٤ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، به دنبال آن سی چرخه (واسرشت‌سازی در ٩٤ درجه سلسیوس برای ٣٠ ثانیه، اتصال در ٥٤ درجه سلسیوس برای ٩٠ ثانیه، گسترش در ٧٢ درجه سلسیوس برای نود ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ٧٢ درجه سلسیوس به مدت ٥ دقیقه بود.

به‌منظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر، ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و در نهایت جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعه تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس به همراه تکرار، توالی یابی شد.

کروماتوگرام توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار Sequencher ver. 4.0 (Gene Codes Corporation, Inc) بررسی و ویرایش شد. ترکیب نوکلئوتیدها برای جایگاه‌های متغیر و آزمون مربع کای (χ^2) برای تمامی جایگاه‌ها با استفاده از نرم‌افزار PAUP*V.4 مورد بررسی قرار گرفت (Swofford 2012). برای محاسبه میزان تمایز نوکلئوتیدی از نرم‌افزار MEGA 6 و مدل K2P استفاده شد (Kumar et al. 2008). جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی دارنگاره‌ها با استفاده از روش‌های Bayesian inference (BI) توسط نرم‌افزار MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al. 2012) و آزمون Maximum likelihood (ML) توسط RAxML-HPC و raxmlGUI 1.3 ایجاد شد (Stamatakis 2014)، برای انتخاب بهترین و مناسب‌ترین مدل تکامل مولکولی برای مجموعه داده‌ها از معیار آکائیک (Akaike Criterion =AIC) در نرم‌افزار jModeltest V.2.1.4 استفاده شد (Posada 2008). در نرم‌افزار MrBayes برای مدل جایگزینی نوکلئوتیدها و نرخ تغییرات از توزیع گاما (G) و مدل GTR + G + I انتخاب شد، برای آزمون BI، زنجیر مارکوف مونت کارلو (MCMC) برای ٤ میلیون نسل، فرکانس نمونه هر ١٠٠٠ نسل، درجه حرارت زنجیره‌ای ٠/٢. در نظر گرفته شد، ثبات Maximum likelihood پس ١٠،٠٠٠ نسل به دست آمد و ١٠٠٠ دارنگاره اولیه حذف شد. از دارنگاره‌های باقی مانده برای ایجاد دارنگاره consensus با اعتبار بیش از ٥٠ درصد در نرم‌افزار PAUP* استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل ML از جستجوی اکتشافی (heuristic) نیز از١٠٠٠ تکرار تحت مدل GTR + G + I استفاده شد. ترسیم و ویرایش دارنگاره‌ها از نرم‌افزار FigTree V1.4.1 استفاده شد (Rambaut 2015). در محاسبات انجام شده گونه *Rutilus rutilus* به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی شش نمونه ماهی خیاطه نمکی *A. namaki* به طول ٦٠٥ جفت‌باز به دست آمد. فرکانس نوکلئوتیدهای به‌دست آمده با گونه‌های موجود در بانک جهانی NCBI تفاوت معنی‌داری نداشت (χ^2: ١٠/٨٠٦، p: ١/٠، df: ١٨٣)، از مجموع بازهای مورد ارزیابی قرار گرفته، ٢٦/٢٨ درصد A، ٢٨/٩١ درصد T، ٢٦/١١ درصد C و ١٨/٦٧ را G تشکیل می‌داد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

جدول ۲- گونه‌های مورد استفاده در آنالیز ژن *COI* به همراه شماره دسترسی

نام علمی	شماره دسترسی	نام علمی	شماره دسترسی
A. namaki	KU705251	*A. coadi*	KU705258
A. nicolausi	KU705261	*A. coadi*	KU705257
A. nicolausi	KU705260	*A. coadi*	KU705256
A. nicolausi	KU705259	*A. damghani*	KU705239
A. ohridanus	KJ552755	*A. damghani*	KU705238
A. ohridanus	KJ552730	*A. damghani*	KU705237
A. prespensis	HQ600667	*A. devolli*	KJ552721
A. prespensis	HQ600666	*A. devolli*	KJ552693
A. prespensis	HQ600665	*A. eichwaldii*	KU705243
A. prespensis	KJ552677	*A. eichwaldii*	KU705242
A. qanati	KU705266	*A. eichwaldii*	KU705241
A. qanati	KU705265	*A. eichwaldii*	KU705240
A. qanati	KU705264	*A. fangfangae*	KJ552720
A. qanati	KU705263	*A. fangfangae*	KJ552666
A. qanati	KU705262	*A. holciki*	KU705246
A. samiii	KU705272	*A. holciki*	KU705245
A. samiii	KU705271	*A. holciki*	KU705244
A. strymonicus	KJ552603	*A. idignensis*	KU705250
A. strymonicus	KJ552521	*A. idignensis*	KU705249
A. strymonicus	KJ552519	*A. idignensis*	KU705248
A. tabarestanensis	KU705270	*A. idignensis*	KU705247
A. tabarestanensis	KU705269	*A. namaki*	KU705255
A. tabarestanensis	KU705268	*A. namaki*	KU705254
A. tabarestanensis	KU705267	*A. namaki*	KU705253
Alburnus thessalicus	KJ552748	*A. namaki*	KU705252
Al. thessalicus	KJ552747	*A. namaki* (قره چای)*	KY211666
Al. thessalicus	KJ552739	*A. namaki* (قره چای)*	KY211667
A. bipunctatus	KM286435	*A. namaki* (قره چای)*	KY211668
A. bipunctatus	KM286434	*A. namaki* (قره چای)*	KY211669
A. bipunctatus	KM286433	*A. namaki* (آبکمر)*	KY211670
Rutilus rutilus	KM287069	*A. namaki* (آبکمر)*	KY211671

* نمونه‌های تعیین توالی شده در این پژوهش

از مجموع بازها ٤٤ جایگاه دارای چند شکلی بودند. با توجه به نتایج چندشکلی نوکلئوتیدها (جدول ۵)، گونه خیاطه نمکی *A. namaki* در دو جایگاه پارسیمونی (Parsim-Informative site) با گونه *A. coadi* تفاوت دارد (در جایگاه ۳۷٤: باز C به A و در جایگاه ۵۰۷: باز T به C تغییر یافته است). بیش‌ترین میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده برای گونه *A. namaki* به میزان ٦/٦٧ درصد با گونه *A. holciki* و کم‌ترین مقدار آن با گونه *A. coadi* به میزان ۰/۵۳ درصد محاسبه شد. بیش‌ترین میزان فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای نیز در گونه *A. samiii* به مقدار ۰/۸۹ محاسبه گرید، در گونه‌های *A. coadi*، *A. damghani*، *A. holciki*، *A. nicolasi* و *A. namaki* (قره‌چای) نیز اختلاف درون جمعیتی مشاهده نشد. دارنگاره‌های ترسیم شده با استفاده از روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference دارای شکل مشابهی بودند، به همین دلیل تنها از دارنگاره Bayesian استفاده شد و اعداد بوت استرپ حاصله از هر دو آزمون بر روی گره‌ها درج شدند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

بحث

با توجه به اندازه کوچک و شباهت ریختی بالای گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران و دشواری شناسایی آن‌ها با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بارکد DNA می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای بررسی تنوع و تفکیک گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد چراکه در روش‌های شناسایی سنتی (براساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی و شمارشی)، تشخیص اعضای این جنس بدون اطلاع از محل صید آن‌ها، به‌علت همپوشانی بالای ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بسیار مشکل می‌باشد. البته فراتر از شناسایی گونه‌ها، DNA بارکدینگ می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای حل مشکلات آرایه‌شناختی مورد استفاده قرار بگیرد (Hebert et al. 2008). اگرچه ویژگی‌های ریخت‌شناختی نقش مهمی در توصیف و شناسایی گونه‌های مختلف ماهیان به‌ویژه گونه‌های جنس *Alburnoides* ایفا می‌کنند ولی استفاده صرف از این ویژگی‌ها در پاره‌ای از موارد باعث اشتباه در شناسایی و یا حتی توصیف گونه‌ها می‌شود که برای جلوگیری از این نقیصه می‌توان از روش‌های مولکولی مثل DNA بارکدینگ در کنار روش‌های سنتی ریخت‌شناسی در جهت تائید نتایج ریخت‌شناختی استفاده نمود. تا قبل از سال ۲۰۰۹ گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران با نام *Alburnoides bipunctaus* شناخته می‌شدند. (2009) Bogutskaya and Coad جمعیت جنس *Alburnoides* در حوضه نمک را از گونه *A. bipunctaus* متفاوت دانستند و آن را به‌عنوان گونه‌ای جدید تحت عنوان ماهی خیاطه نمکی *A. namaki* معرفی نمودند.

جدول ۳- میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده (درصد) بین گونه‌ای برای گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران (در محاسبه فوق توالی کامل نوکلئوتید ها مورد استفاده قرار گرفته است)

ردیف	گونه	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰
۱	*A. coadi*										
۲	*A. damghani*	۰/۸۹									
۳	*A. eichwaldii*	۳/۸۳	۳/۲٥								
٤	*A. holciki*	٦/۲۱	٦/۰۱	۷/۱۷							
٥	*A. idigensis*	۱/٦۸	۱/۱۲	۲/۹	٥/۹۱						
٦	*A. namaki* (دوآب)	۰/٥۳	۱/۰۸	٤/۰٥	٦/٦۷	۱/۸۷					
۷	*A. namaki* (قره چای)	۰/٥۳	۱/۰۸	٤/۰٥	٦/٦۷	۱/۸۷	۰/۳٥				
۸	*A. nicolasi*	۱/٦۳	۱/۰۸	۳/۲٥	٦/۲۳	۰/۷٦	۱/۸۲	۱/۸۲			
۹	*A. qanati*	٤/٦	۳/٥۹	۲/۸۷	۷/۳٥	۳/٦٥	٤/۸۳	٤/۸۳	٤		
۱۰	*A. samiii*	۳/۲٥	۲/٦۷	٤/٤۸	٦/۷٥	۲/۷۲	۳/٤٦	۳/٤٦	۲/٦۷	٥/۷٥	
۱۱	*A. tabarestanensis*	۳/۷٤	۳/۱٥	٥/۲٦	۸/۰۳	۳/۲	۳/۹٥	۳/۹٥	۳/۱٥	٦/۰٦	۳/٦۷

جدول ٤- میزان فاصله ژنتیکی محاسبه شده (درصد) درون گونه‌ای برای گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران

گونه	میزان تمایز	گونه	میزان تمایز
A. coadi	۰/۰۰	*A. namaki* (قره چای)	۰/۰۰
A. damghani	۰/۰۰	*A. nicolasi*	۰/۰۰
A. eichwaldii	۰/۱۸	*A. qanati*	۰/۲۸
A. holciki	۰/۰۰	*A. samiii*	۰/۸۹
A. idigensis	۰/۰۹	*A. tabarestanensis*	۰/۷۲
A. namaki (دوآب)	۰/۱۸		

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

جدول ۵- نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتید های تشخیصی (Parsim-Informative site) توالی‌های به‌دست آمده از این پژوهش و بانک ژن (NCBI). شماره جایگاه نوکلئوتیدها بر اساس شماره جایگاه‌های گونه *A. coadi* (KU705258) اختصاص داده شده‌است.

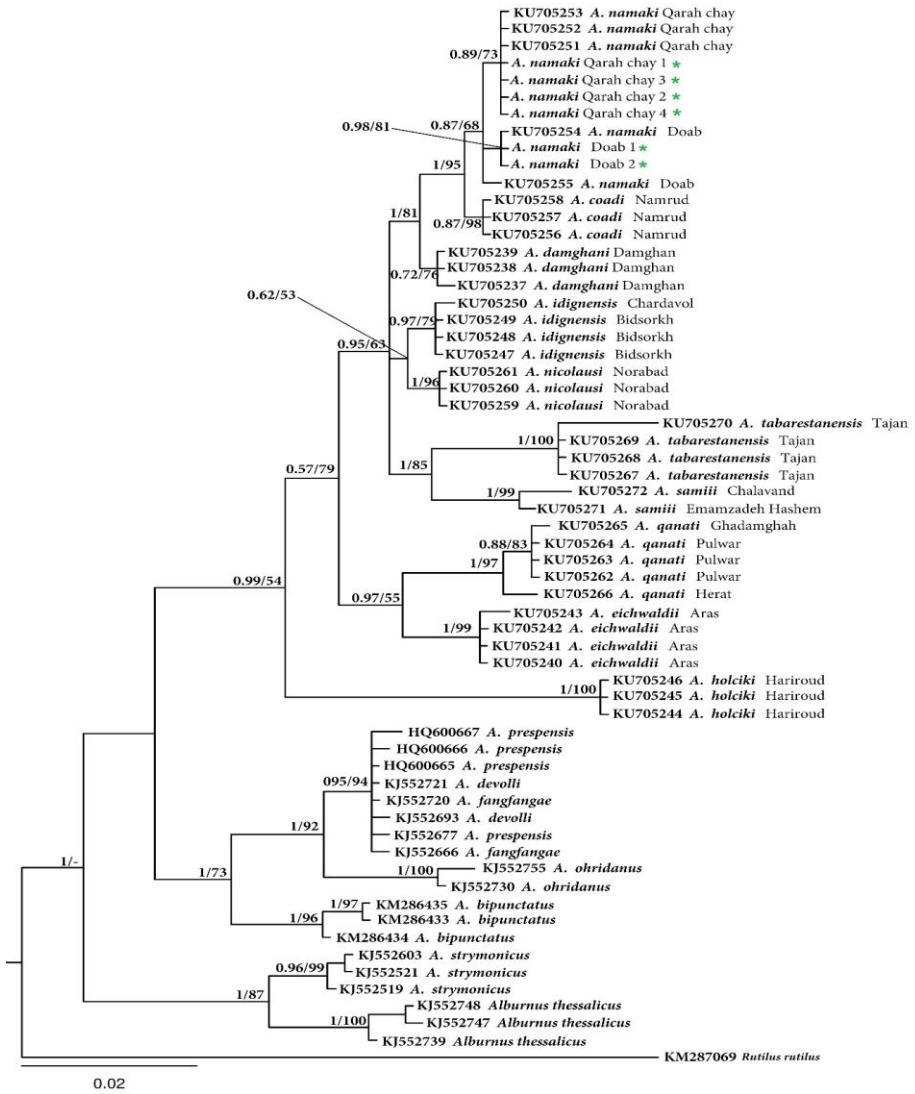
۳٤٤	۳۰۲	۳۰۸	۳۰۵	۲۹۳	۲۸۱	۲۷۸	۲۷۲	۲۵۲	۲٤۹	۲۳۹	۲۳۱	۲۱۸	۲۱۲	۱۷٦	۱۷۳	۱۷۱	۱٤٦	۹۵	٦۵	۳۲	۲	گونه
A	A	G	C	A	A	T	C	C	C	G	T	A	T	G	G	C	A	T	A	A	G	*A. coadi*
A	A	G	C	A	G	T	C	C	C	G	T	A	T	G	G	C	A	T	A	A	A	*A. damghani*
A	A	A	C	A	A	T	T	C	C	G	C	A	C	G	A	C	T	T	C	A	A	*A. eichwaldii*
A	T	G	T	G	C	T	T	T	T	G	T	A	C	G	G	C	A	T	A	G	A	*A. holciki*
A	A	G	C	A	A	T	C	C	C	G	T	A	T	G	G	C	A	T	A	A	A	*A. idigensis*
A	A	G	C	A	A	T	C	C	C	G	T	A	T	G	G	C	A	T	A	A	G	*A. namaki*
A	A	G	C	A	A	T	C	C	C	G	T	A	T	G	G	C	A	T	A	A	A	*A. nicolasi*
A	A	A	T	A	G	T	T	C	C	G	C	A	C	A	G	C	T	C	A	A	A	*A. qanati*
C	A	G	C	G	A	C	C	C	C	G	T	G	T	G	A	T	A	T	A	A	A	*A. samiii*
C	A	G	C	A	A	T	C	C	C	A	T	A	T	G	G	T	G	T	A	A	A	*A. tabarestanensis*

۵۹٦	۵۸٤	۵۸۱	۵٦۹	۵٦٦	۵۵٤	۵۵۱	۵۰۷	۵۰۰	٤۸۲	٤۷۳	٤٦٤	٤٦۱	٤٤۳	٤٤۰	٤۳۱	٤۳۲	۳۹۸	۳۹۳	۳۸٦	۳۷٤	۳٦۸	
A	A	T	C	C	C	A	T	T	G	G	T	A	T	G	G	C	C	T	G	C	T	*A. coadi*
A	A	T	C	C	C	A	T	T	G	G	T	A	T	G	A	T	C	T	G	A	T	*A. damghani*
A	A	C	C	T	C	A	T	G	G	G	C	A	C	A	A	T	C	T	A	A	C	*A. eichwaldii*
A	G	C	T	T	C	A	T	T	A	C	G	G	T	A	G	T	T	T	A	G	T	*A. holciki*
A	A	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	A	T	G	A	T	C	C	A	A	T	*A. idigensis*
A	A	T	C	C	C	A	C	T	G	G	T	A	T	G	G	C	C	T	G	A	T	*A. namaki*
A	A	T	C	T	C	A	T	T	G	G	T	A	T	G	A	T	C	C	A	A	T	*A. nicolasi*
G	A	C	C	T	T	A	T	G	G	G	C	A	C	A	A	T	C	T	A	A	T	*A. qanati*
G	A	T	C	T	C	T	T	T	G	G	T	A	T	G	A	T	T	T	A	A	C	*A. samiii*
A	G	C	C	T	C	T	T	T	G	G	T	G	T	G	A	T	C	T	A	A	T	*A. tabarestanensis*

نتایج این بررسی تمایز *A. namaki* را با گونه *Alburnoides bipunctaus* تایید می‌نماید و گواه این امر قرار نگرفتن *A. namaki* و *A. bipunctaus* در یک شاخه با توجه به دارنگاره ترسیم شده‌است (شکل ۲).

فون ماهیان حوضه آبریز 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 شده‌است (Esmaeili et al. 2010; Jouladeh-Roudbar et al. 2015).اخیراً گونه *Alburnoides coadi* از رودخانه نمرود در حوضه آبریز کویر توصیف شده‌است (Mousavi-Sabet et al. 2015) که براساس نتایج حاصل از چند شکلی توالی نوکلئوتیدهای تشخیصی (Parsim-Informative site) میان دو گونه *A. coadi* از حوضه کویر و *A. namaki* از حوضه دریاچه نمک در دو جایگاه نوکلئوتید اختلاف وجود دارد (A←C در جایگاه ۳۷٤ و C←T در جایگاه ۵۰۷) و در دارنگاره تبارشناسی ترسیم شده نمونه‌های *A. coadi* و *A. namaki* در دو خوشه نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. به‌علاوه میانگین تمایز ژنتیکی K2P برای این دو گونه به مقدار ۰/۵ درصد محاسبه شد که برای تمایز یک جمعیت به‌عنوان گونه‌ی جدید اندک به‌نظر می‌رسد، به‌عنوان مثال تمایز درون جمعیتی گونه *A. samiii* از دیگر گونه‌های جنس *Alburnoides* در حدود ۰/۸۹ و برای گونه *A.tabarestanensis* به میزان ۰/۷۲ درصد به‌دست آمده است. با توجه به‌نتایج، *A. coadi* رودخانه نمرود حوضه دشت کویر جمعیتی از *A. namaki* می‌تواند باشد که به‌علت جدایی جغرافیایی و قرار گرفتن در شرایط متفاوت محیطی دارای تغییرات اندک در ژنوم میتوکندریای خود شده‌است. 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).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]



شکل ۲- دارنگاره روابط فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Alburnoides* اعداد روبه روی گره‌ها مقداراحتمال پسین به‌دست آمده برای آزمون BI (سمت چپ) و ML (سمت راست) است. وجود خط تیره (-) به معنای عدم وجود آن خوشه در آزمون فوق است، گونه *Rutilus rutilus* نیز به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که در این مطالعه تعیین توالی شدند با علامت ستاره (*) مشخص شده‌اند.

بنابراین با توجه به یافته‌های این مطالعه می‌توان بیان داشت که کل کلاد *A. codi* و *A. namaki* به یک آرایه واحد تعلق داشته و برپایه اصل تقدم در نام‌گذاری گونه *A. codi* مترادف *A. namki* باید در نظر گرفته شود.

با توجه به یافته‌های این پژوهش، توالی ژن میتوکندری *COI* قادر بود گونه‌های مختلف جنس *Alburnoides* را از یکدیگر متمایز کند. بنابراین در مواردی که تشخیص سریع ضروری است می‌توان از این شیوه با اطمینان استفاده کرد. اما این ژن به تنهایی نمی‌تواند روابط میان این گونه‌ها را در سطح بالاتر به وضوح مشخص کند. در این موارد افزایش تعداد آرایه‌ها و با استفاده از نشانگرهای دیگر (مانند ژن Cyt *b*) در کنار این ژن می‌تواند موثر واقع شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]

منابع

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

Coad BW, Bogutskaya NG (2009) *Alburnoides qanati*, a new species of cyprinid fish from southern Iran (Actinopterygii, Cyprinidae). ZooKeys 13: 67-77.

Esmaeili HR, Coad BW, Gholamifard A, Nazari N, Teimory A, (2010) Annotated checklist of the freshwater fishes of Iran. Zoosystematica Rossica 19:361-86.

Freyhof J, Esmaeili HR, Sayyadzadeh G, 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 25:11-38.

Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak E, Taylor E, Burridge M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. PLoS one 18:e2490.

Jouladeh Roudbar A, Eagderi S, Esmaeili HR, Coad BW, Bogutskaya N, (2016). 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.

Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S, Esmaeili H, (2015) Fishes of the Dasht-e Kavir basin of Iran: an updated checklist. International Journal of Aquatic Biology 6:263-73.

Jouladeh-Roudbar A, Rahmani H, Vatandoust S, Najafy M, Rahimi G (2015) A review of morphological character in four described species from *Alburnoids*. Journal of Aquatic Ecology 5:1-17. (In Farsi).

Jouladeh-Roudbar A, Vatandoust S, Eagderi S, Jafari-Kenari S, Mousavi-Sabet H, (2015) Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux) 8:855-909.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in bioinformatics 9: 299-306.

Mousavi-Sabet H, Vatandoust S, Doadrio I, (2015) 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: 293-331.

Posada D, (2008) jModeltest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25:1253-1256.

Rambaut A, (2015) FigTree version 1.4. 0. Available at ht tp://tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree; (assessed: July 27, 2015)

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

Seifali M, Arshad A, Moghaddam F Y, Esmaeili HR, Kiabi BH, Daud SK, Aliabadian M, (2012) Mitochondrial Genetic Differentiation of spirlin (Actinopterigii: cyprinidae) in the south caspian sea basin of Iran. Evolutionary bioinformatics online, 8: 219-227

Stamatakis A, (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics btu033.

Swofford DL, (2012) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer.

Turan D, Bektaş Y, Kaya C, Bayçelebi E, (2016) *Alburnoides diclensis* (Actinopterygii: Cyprinidae), a new species of cyprinid fish from the upper Tigris River, Turkey Zootaxa, 4067:79-87.

Ward D, Zemlak S, Innes H, Last R, Hebert D, (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences 360:1847-57.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-06-07]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.6.5]