



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۹۶

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تغییرات بالای مولکولی و ریخت‌شناختی جمعیت‌های شاه‌کولی جنوبی *Alburnus mossulensis* Heckel, 1843 (ماهیان استخوانی عالی: کپورماهیان)

طوبی محمدیان کلات^۱، منصور علی آبادیان^{۲*}، حمیدرضا اسماعیلی^۳

^۱ دانشجوی دکتری زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۹/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۸

چکیده

تغییرات ریخت‌شناختی و ژنتیکی جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*) از چهار زیر حوضه تیگره (دجله)، پرسپس (حوضه خلیج فارس)، هرمز و حوضه رودخانه کر بررسی شد. اندازه‌گیری ۳۹ صفت ریخت‌شناسی در ۱۱۰ نمونه جمع‌آوری شده از ۱۷ رودخانه حوضه‌های جنوبی نشان داد که تمایز معنی‌داری در صفات شمارشی بین برخی جمعیت‌ها مشاهده می‌شود. این نتایج با داده‌های شاخص درون‌زادآوری و فاصله ژنتیکی بدست آمده از ۱۰۲۲ نوکلوتید از ژن سایتوکروم *b* نیز تایید می‌شود. از مجموع ۱۷ جمعیت مطالعه شده، صفات شمارشی و مولکولی تا حدود زیادی جمعیت حوضه رودخانه کر را از جمعیت‌های دو زیرحوضه پرسپس و هرمز متمایز می‌کند. اما این جمعیت با برخی جمعیت‌های زیر حوضه تیگره فاقد جدایی ریختی است. جمعیت زیر حوضه‌های هرمز و پرسپس از هم جدا نمی‌شوند. در آنالیز واریانس مولکولی، علی‌رغم مشاهده میزان جریان ژنتیکی پایین بین جمعیت حوضه کر و اغلب جمعیت‌ها، بین میزان واگرایی ژنتیکی و فاصله جغرافیایی همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. تغییرات مشاهده شده در صفات ریختی و ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه، احتمالاً به علت تاریخچه پیچیده زمین‌شناسی منطقه و جدایی نسبی و یا کامل حوضه‌ها از یکدیگر می‌باشد. براساس داده‌های موجود واگرایی مشاهده شده در حد تغییرات درون‌گونه‌ای ارزیابی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *A. mossulensis*، سیتوکروم *b*، جمعیت، تغییرات درون‌گونه‌ای

* نویسنده مسئول: aliabadi@ferdowsi.um.ac.ir

مقدمه

جمعیت‌های یک گونه، نمایانگر واحدهای زیستی هستند که اگر برای زمان کافی از هم جدا بمانند، ممکن است پویایی متفاوت و مجزایی نشان دهند (Brown and Ehrlich, 1980). جمعیت‌هایی با پویایی متفاوت، واحدهای تکاملی مجزایی هستند، که در برگیرنده گروهی از افراد درون‌زادآور با گنجینه ژنی مشترک می‌باشد که در صورت وجود زمان کافی می‌توانند جمعیت‌های مستقل را در سطح گونه شکل دهند (Luck et al., 2003). بررسی تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی درون‌گونه‌ای، گام مهمی در تعیین حدود گونه‌هاست. درک نامناسب از این تغییرات، می‌تواند با وزن‌دهی نادرست به برخی صفات منجر به ابهام در تعیین حدود گونه‌ها گردد. ماهیان آب شیرین، مثال‌های بسیار مناسبی برای مطالعات موردی در بررسی‌های تغییرات درون و برون جمعیتی، فیلوجغرافی، بوم‌زادی و وقوع هم‌جایی هستند، چرا که ساکن حوضه‌هایی هستند که مرزهای آنها را طبیعت بنا می‌نهد (Coad, 2004).

گونه *Alburnus mossulensis* که با نام‌های شاه‌کولی جنوبی و شاه‌ماهی جنوبی در ایران و سینک، زوری و لصف در عراق خوانده می‌شود، گونه‌ای با پراکنش وسیع در سیستم رودخانه‌ای تیگره-فرات است. محل تیپ این گونه، موصل عراق است (Heckel, 1843). مساله مترادف بودن *Alburnus mossulensis* با گونه *Alburnus sellal* Heckel, 1843 هنوز روشن نشده است. بدن باریکتر، کشیده‌تر، باله‌های پشتی، مخرجی و لگنی قدامی‌تر، ساقه دمی کشیده‌تر و نیز چشم‌های بزرگ‌تر از صفاتی است که طبق نظر هکل، گونه *A. mossulensis* را از *A. sellal* متمایز می‌کند. به هر حال، به علت عدم امکان دسترسی به نمونه‌های تازه از محل تیپ *A. sellal* در زیستگاه‌های آلوده این ماهی در حلب سوریه، داده‌ها برای تصمیم‌گیری در این مورد کافی نبوده و این دو گونه در حال حاضر به‌عنوان گونه‌های معتبر مجزا شناخته می‌شوند (Coad, 2014).

در ایران، این گونه، از زیرحوضه تیگره (رودهای کارون، سیروان، جراحی، زهره و گاماسیاب)، حوضه پرسیس (رودهای مند و حله)، همچنین حوضه‌های دریاچه مهارلو، کر (رودهای کر و پولوار و چند قنات کوچک در این حوضه) و نیز بخش‌های بالایی زیرحوضه هرمز گزارش شده است (Mohammadian-kalat et al., 2014). این گونه، پراکنش وسیعی بویژه در زیرحوضه تیگره دارد. زیرحوضه تیگره-فرات یکی از بزرگ‌ترین زیر حوضه‌های خلیج فارس در خاورمیانه است که از سه جهت غرب، شرق و شمال، به‌ترتیب بین حوضه‌های عمده نیل در آفریقا و سند در جنوب شرق آسیا و خزر-دریای سیاه قرار گرفته است. در بین ۱۹ حوضه آبریز اصلی در ایران (شکل ۱)، پس از حوضه خزر، تیگره بیش‌ترین تنوع ماهیان آب شیرین را در خود جای داده است (Coad, 1996). وسعت بسیار زیاد دامنه پراکنش گونه و نیز جدایی نسبی یا کامل برخی جمعیت‌های این گونه در کل دامنه

پراکنش، به‌ویژه به‌علت تاریخچه زمین‌شناسی منطقه، فرضیه احتمال جدایی ژنتیکی جمعیت‌های این گونه را تقویت می‌کند. ساداتی (Saadati, 1977) با بررسی نمونه‌های شاه‌کولی جنوبی از زیرحوضه تیگره و حوضه دریاچه بختگان (حوضه کر)، تفاوت اندکی در طول آرواره بالا بین جمعیت‌های دو حوضه گزارش کرد. طبق نظر برخی محققین اعضای این گونه در برخی از صفات شمارشی نظیر تعداد شعاع‌های باله مخرجی، فلس‌های خط جانبی و خارهای آبششی، تا حدودی تغییرات کشانه‌ای نشان می‌دهند (Bianco and Banarescu, 1982). در مطالعه یاد شده، نمونه‌های بالادست زیرحوضه تیگره براساس صفات یادشده شباهت بیشتری به نمونه‌های کر نشان داد و تعلق آنها به زیرگونه‌ای مشترک پیشنهاد شد درحالی‌که نمونه‌های رودخانه‌های مند و کُل شباهت بیش‌تری با هم نشان دادند. به‌هرحال محققین یاد شده، زیرگونه‌ای برای نمونه‌های حوضه‌های مند و کل ارائه ندادند، چراکه معتقد بودند فاکتورهای محیطی نظیر دما می‌تواند بر صفات شمارشی تأثیر بگذارد و تعیین حدود زیرگونه‌ها نیازمند مطالعات دقیق‌تری است. به جمعیت‌های مختلف این گونه چندین نام مختلف داده شده است، که بعنوان نام‌های مترادف در نظر گرفته می‌شوند اما احتمال معتبر بودن آنها نیز وجود دارد (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015). نکته‌ای که در تمام مطالعات قبلی روشن است، وجود تغییرات در صفات ریخت‌شناختی گونه شاه‌کولی جنوبی در کل دامنه پراکنش است. دیدگاه‌ها درمورد این تغییرات متفاوت بوده، تفسیرها از احتمال وجود زیرگونه‌های متفاوت تا تغییرات فنوتیپی وابسته به شرایط محیطی، متغیر است (Coad, 2014; Bianco and Banarescu, 1982). براساس برخی منابع *A. mossulensis* خود، احتمالاً هم تافت گونه‌ایست که در حوضه‌های مختلف ایران پراکنش دارد (Coad, 2014).

برای روشن شدن این مساله که آیا تغییرات ریختی گزارش شده، حکایت از وجود گونه‌های نهان دارد و یا صرفاً تغییراتی درون‌گونه‌ای محسوب می‌شود، ریخت‌شناسی به تنهایی کافی نیست. لذا مطالعه حاضر، با این هدف به بررسی ریخت‌شناختی و مولکولی جمعیت‌های این گونه در چهار زیرحوضه تیگره، پرسپس، هرمز و حوضه رودخانه کر پرداخته است. با توجه به ارزش اثبات شده مارکر مولکولی *cyt b* در مطالعات فیلوژغرافی کپور ماهیان (Ketmaier *et al.*, 2008 and 2009) این ژن برای مطالعه مولکولی انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای انجام مطالعات ریخت‌شناسی، از نمونه‌های موجود در موزه جانورشناسی دانشگاه شیراز (کلکسیون جانوری بخش زیست‌شناسی ZM-CBSU) و جهت مطالعه مولکولی، از نمونه‌های بافتی موزه جانورشناسی دانشگاه شیراز و دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شد. تعداد ۱۱۰ نمونه از

جمعیت‌های ۱۷ محل متعلق به زیرحوضه‌های آبریز تیگره، کل، پرسپیس و حوضه رودخانه کر از نظر ریخت‌شناسی بررسی شد (شکل ۱، جدول ۱).



شکل ۱- حوضه‌های آبریز ایران (حوضه بزرگ خلیج فارس شامل تمام زیرحوضه‌هایی است که به خلیج فارس می‌ریزند شامل تیگره-کارون، زهره، پرسپیس و هرمز).

مطالعه ریخت‌شناختی: دو نوع صفت ریخت‌شناختی، یعنی صفات شمارشی و ریخت‌سنجی روی نمونه‌های یاد شده، بررسی شد. در مجموع ۹ صفت شمارشی و ۳۰ صفت ریخت‌سنجی براساس روش اندازه‌گیری و شمارش ارائه شده در (Kottelat and Freyhof 2007) مورد سنجش قرار گرفت. صفات ریخت‌سنجی با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تحلیل‌های آماری روی اندازه‌گیری‌های استاندارد شده، یعنی نسبت صفات ریخت‌سنجی به طول استاندارد، طول سر و یا حداکثر عمق بدن، انجام شد. تحلیل واریانس چند متغیره (MANOVA) برای سنجش معنی‌داری دوریختی جنسی روی ۳۰ نمونه از حوضه فرات، مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA)، معنی‌داری آماری تفاوت میانگین صفات جمعیت‌های مختلف در سطح معنی‌داری $\alpha = 0.05$ بررسی شد. به منظور بررسی جمعیت‌های مختلف هم‌تافت گونه *A. mossulensis* براساس

تشابه صفات ریخت‌سنجی، تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) براساس ماتریس همبستگی صفات معنی‌دار، انجام شد. تحلیل های آماری بر صفات ریخت‌سنجی و شمارشی، به‌طور جداگانه و با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 16 و PAST v.2.17 انجام گرفت.

جدول ۱- فهرست نمونه‌های گونه شاه کولی جنوبی (*A. mossulensis*)..

ردیف	منطقه نمونه‌برداری	حوضه آبریز	موقعیت جغرافیایی طول شرقی / عرض شمالی
۱	اصفهان، سمیرم	تیگره *	۵۱،۴۴ ۳۱،۱۸
۲	ایلام، دهلران	تیگره *	۴۷،۰۵ ۳۳،۶۶
۳	آذربایجان غربی، پیرانشهر	تیگره *	۴۵،۳۳ ۳۶،۴۷
۴	خوزستان، کرخه	تیگره **	۴۸،۱۶ ۳۱،۵۴
۵	فارس، انارستان	پرسیس	۵۱،۵۳ ۲۹،۷۴
۶	فارس، ایچ	هرمز	۵۴،۲۴ ۲۹،۰۱۲
۷	فارس، تنگ چوگان	پرسیس **	۵۱،۵۸ ۲۹،۷۸
۸	فارس، چشمه قدمگاه	کر *	۵۲،۴۲ ۳۰،۲۵
۹	فارس، فهلپان	زهره	۵۱،۴۲ ۳۰،۲۳
۱۰	فارس، فیروزآباد	پرسیس *	۵۲،۵۶ ۲۸،۸۳
۱۱	فارس، کهمره	پرسیس **	۵۲،۱۸ ۲۹،۴۹
۱۲	کردستان، دیواندره	تیگره *	۴۷،۰۹ ۳۵،۵۲
۱۳	کردستان، سروآباد	تیگره **	۴۶،۳۷ ۳۵،۳۱
۱۴	کرمانشاه، گاماسیاب	تیگره	۴۸،۳۳ ۳۴،۳۲
۱۵	کهگیلویه و بویراحمد، یاسوج، بشار	تیگره *	۵۱،۵۸ ۳۰،۷۳
۱۶	مرکزی، شازند (صالح آباد)	تیگره *	۴۹،۲۹ ۳۳،۶۶
۱۷	همدان، لک لک	تیگره	۴۷،۹۴ ۳۴،۶۶

علامت *، نشان‌دهنده نمونه‌هایی است که در مطالعه مولکولی استفاده شده است. **نمونه‌هایی که فقط در آنالیز مولکولی وارد شده اند

مطالعه مولکولی (PCR و توالی‌یابی): برای انجام مطالعه مولکولی، در مجموع تعداد ۲۵ نمونه از حوضه‌های آبریز مختلف، بررسی شد. استخراج DNA از نمونه‌ها، از بافت باله و طبق پروتکل استاندارد روش نمکی صورت گرفت (Bruford *et al.*, 1998). قطعه ژن میتوکندریایی cyt b توسط آغازگرهای GluF و ThrR تکثیر شد. در برنامه دمایی و شرایط و مواد مورد نیاز جهت واکنش چرخه پلی‌مرز (جدول ۲) از منابع موجود، استفاده شد (Machordom and Doadrio, 2001). پس از انجام PCR نمونه‌های DNA استخراج شده جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: توالی‌های هومولوگ توسط MAFFT version 7 (Kato et al., 2002) هم‌تراز شد. فایل توالی‌های هم‌تراز شده جهت اجتناب از هرگونه ناهمخوانی به صورت چشمی بررسی شد. برای اطمینان از عدم وجود کدون پایانی، در نرم‌افزار MEGA6 مورد تحلیل قرار گرفت (Tamura et al., 2013). در نهایت توالی به طول ۱۰۲۲ نوکلئوتید برای هر نمونه بدست آمد. تحلیل بیزین با استفاده از روش زنجیره مارکوف مونت کارلو (Monte Carlo Chain Markov) با نرم‌افزار MrBayes3.2.2 انجام شد (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). *Alburnus orontis* و *A. kotschy* به‌عنوان گروه خارجی به‌منظور ریشه‌دار کردن درخت بکار گرفته شد. چهار زنجیره مارکوف مونت کارلو، با ده میلیون تکرار با پیش فرض قبلی انتخاب درخت در هر ۱۰۰۰ نسل اجرا گردید. مدل تکاملی مناسب براساس معیار Akaike در نرم‌افزار MrModeltest (Nylander, 2004) محاسبه شد. جهت حصول اطمینان از رسیدن پارامترهای بیشینه احتمال به حد ثبات، ۵۰۰۰ درخت اول نادیده گرفته و احتمال پسینی برای سایر درخت‌ها محاسبه شد. فاصله مولکولی براساس K2P بین جمعیت‌ها در نرم‌افزار Mega6 محاسبه شد. به‌منظور ارزیابی فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) در نرم‌افزار GenALEx6.5 (Peakall and Smouse, 2006) انجام شد و شاخص PhiPT برآورد شد. این شاخص، آنالوگ FST در نظر گرفته می‌شود. آزمون همبستگی فاصله ژنتیکی به فاصله جغرافیایی توسط تست مانتل نیز توسط نرم افزار GenALEx6.5 انجام شد. شبکه هاپلوتایپی در نرم‌افزار Network رسم گردید. لازم به ذکر است که باتوجه به نتایج درخت بیزین، برخی جمعیت‌ها در تحلیل‌های بعدی تلفیق شد.

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده و منبع مورد استفاده جهت رژیم حرارنی PCR

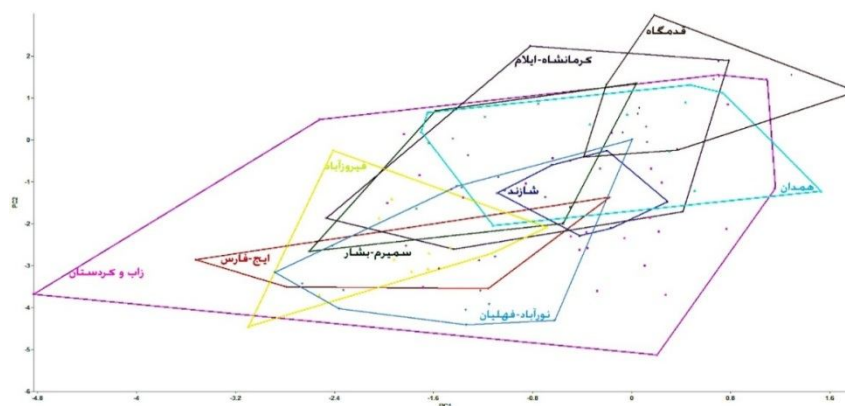
نام پرایمر	توالی پرایمرها	دمای اتصال پرایمرها	منبع
GluF:	5'AACCACCGTTGTATTCAACTACAA3'	۹۴°C	(Machordom and Doadrio, 2001)
ThR:	5'ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG3'		

نتایج

ریخت‌شناسی: تحلیل واریانس چندمتغیره، به‌منظور بررسی احتمال وجود دوریختی جنسی روی ۳۰ نمونه از زیرحوضه تیگره (حوضه خلیج فارس) انجام شد. براساس این تحلیل، دوریختی جنسی بین دو گروه نر و ماده، معنی‌دار نبود ($F=2.263$, $p=0.163$). از مجموع صفات ریخت‌سنجی نسبی محاسبه شده، بیشینه ارتفاع بدن، فاصله باله سینه‌ای از لگنی، فاصله پیش‌باله مخرجی، قطر چشم، فاصله پیش‌باله سینه‌ای، فاصله پس‌حده‌ای، طول آرواره بالا، طول ساقه دم، فاصله بین حده‌ای، طول

باله‌ها و طول سر در بین جمعیت‌های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). علی‌رغم وجود اختلاف معنی‌دار بین جمعیت‌ها در این صفات، هیچ‌یک از این جمعیت‌ها در تحلیل PCA از یکدیگر جدا نشدند.

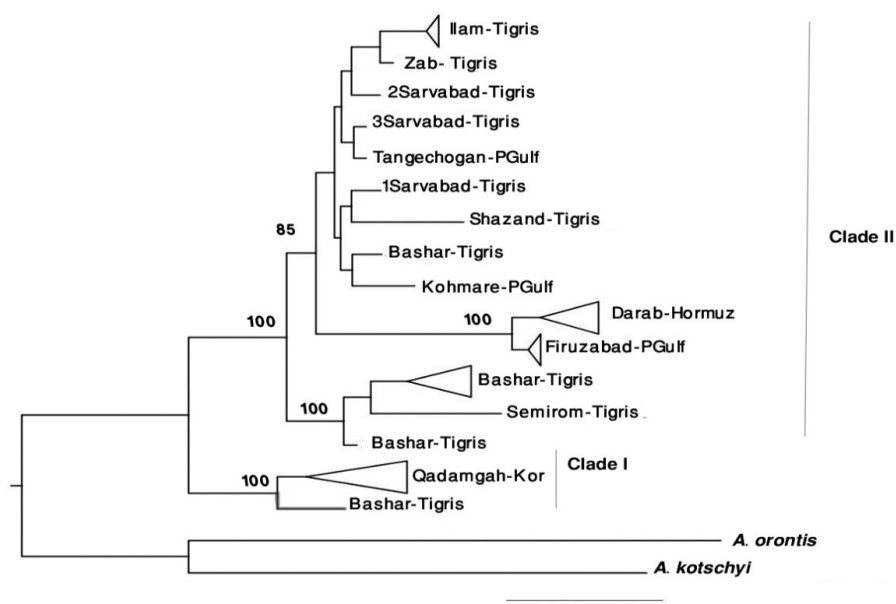
از بین ۹ صفت شمارشی صفات تعداد شعاع‌های باله لگنی، تعداد فلس‌های خط جانبی، تعداد ردیف فلس بالای خط جانبی، تعداد ردیف فلس زیر خط جانبی، تعداد فلس‌های دور ساقه‌دمی و تعداد خارهای آبششی در بین برخی جمعیت‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). در مقایسه جمعیت‌های رودخانه‌های مختلف، جدایی بین جمعیت‌های رودخانه‌ها در هر یک از حوضه‌ها مشاهده نشد. اما بین جمعیت‌های حوضه‌های مختلف، تفاوت‌هایی مشاهده شد. جمعیت شازند و جمعیت رود فیروزآباد در جنوب زیرحوضه پرسپس (رودخانه مند) تا حدود زیادی در مولفه اول از هم جدا شدند (شکل ۲). جمعیت قدمگاه در حوضه رودخانه کر نیز از جمعیت ایچ در شمال هرمز، نورآباد در زیرحوضه زهره و تا حدودی از صالح آباد شازند در تیگره در مولفه دو جدا می‌شود. همچنین این جمعیت و جمعیت فیروزآباد در جنوب حوضه خلیج فارس توسط مولفه یک کاملاً از هم جدا می‌شوند. در این تحلیل، مولفه یک که توجیه‌کننده ۳۱ درصد واریانس است بیشتر با صفات تعداد ردیف فلس‌های دور ساقه دمی و تعداد خارهای آبششی همبستگی دارد و مولفه دو، با ۲۳٪ کل واریانس مرتبط با تعداد ردیف فلس‌های بالای خط جانبی، تعداد فلس‌های خط جانبی و تعداد شعاع‌های باله‌ی لگنی است. همانگونه که در نمودار پراکنش نقطه‌ای شکل ۲ مشاهده می‌شود، جمعیت‌های کر (قدمگاه) و پرسپس (فیروزآباد، نورآباد، فهلین) و نیز کر و شمال هرمز (ایچ) در مولفه اول کاملاً از هم جدا می‌شوند.



شکل ۲- نمودار پراکنش نمونه‌ها براساس آزمون PCA صفات شمارشی در جمعیت‌های مورد مطالعه گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*)

تحلیل مولکولی: در مجموع از ۱۰۲۲ جایگاه، ۱۸۸ جایگاه، پلی‌مرفیک بود که از این تعداد ۸۵ جایگاه، از نظر پارسیمونی حاوی اطلاعات محسوب می‌شود. براساس نتایج نرم‌افزار Modeltest، مناسب‌ترین مدل تکاملی انتخاب شده، GTR+I+G بود.

در درخت بیزین بدست آمده، دو کلاذ قابل مشاهده است (شکل ۳). کلاذ اول، کلاذ قاعده‌ای و شامل نمونه‌های حوضه رودخانه کر و دو نمونه از رودخانه بشار (زیرحوضه کارون- تیگره) و کلاذ دوم، شامل تمام نمونه‌های حوضه‌های دیگر است. نمونه‌های مربوط به حوضه‌های آبریز مختلف، با هم گروه‌بندی شده و هیچ یک از حوضه‌ها کلاذ مجزایی را تشکیل نداد. نتایج فاصله ژنتیکی نیز تایید کننده نتایج تحلیل بیزین است. واگرایی ژنتیکی بین دو کلاذ ۱/۸ درصد محاسبه شد. بیشترین فاصله مشاهده شده بین جمعیت‌های قدمگاه (کر) و داراب (هرمز) و نیز بین قدمگاه (کر) و فیروزآباد (مند، پرسیس) است. کمترین مقدار مشاهده شده، در مورد جمعیت‌های یک حوضه، بین رودخانه‌های ایلام و سروآباد کردستان در حوضه تیگره بود. در بین حوضه‌های مختلف، کمترین فاصله بین تنگ چوگان (حله، پرسیس) و سروآباد (تیگره) و نیز فیروزآباد (پرسیس) و داراب (هرمز) مشاهده می‌شود (جدول ۳). فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف در حوضه پهنور تیگره، بین ۰/۳ تا ۱/۰ قرار داشت.



شکل ۳- درخت بیزین بدست آمده از داده‌های ژن *cyt b* جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*)

جدول ۳- فاصله ژنتیکی K2p بین جفت جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*)

ایلام	سروآباد	کهمره	تنگ چوگان	داراب	قدمگاه	بشار-سمیرم	فیروزآباد	شازند	<i>A. orontis</i>
ایلام									
سروآباد	٪۰/۳								
کهمره	٪۰/۶	٪۰/۴							
تنگ چوگان	٪۰/۳	٪۰/۱	٪۰/۳						
داراب	٪۱/۵	٪۱/۳	٪۱/۵	٪۱/۲					
قدمگاه	٪۱/۳	٪۱/۳	٪۱/۵	٪۱/۲	٪۲/۴				
بشار-سمیرم	٪۱/۱	٪۱/۱	٪۱/۱	٪۰/۹	٪۱/۹	٪۱/۶			
فیروزآباد	٪۱/۴	٪۱/۲	٪۱/۴	٪۱/۱	٪۰/۱	٪۲/۴	٪۱/۸		
شازند	٪۱/۱	٪۰/۸	٪۱/۱	٪۰/۷	٪۱/۹	٪۱/۶	٪۱/۸		
<i>A. orontis</i>	٪۷/۷	٪۷/۷	٪۸/۰	٪۷/۶	٪۸/۲	٪۸/۰	٪۸/۳	٪۸/۳	
<i>A. kotschy</i>	٪۵/۶	٪۵/۵	٪۵/۸	٪۵/۵	٪۶/۲	٪۵/۲	٪۵/۹	٪۶/۳	٪۸/۷

تحلیل AMOVA، تمایز کلی بین جمعیت‌های رودخانه‌های مختلف را معنی‌دار ($p < 0.001$) و معادل ۰/۵۷ (PhiPT) نشان داد که ۴۲٪ این تمایز، مربوط به تمایز درون‌جمعیتی و ۵۸٪ بین جمعیتی است.

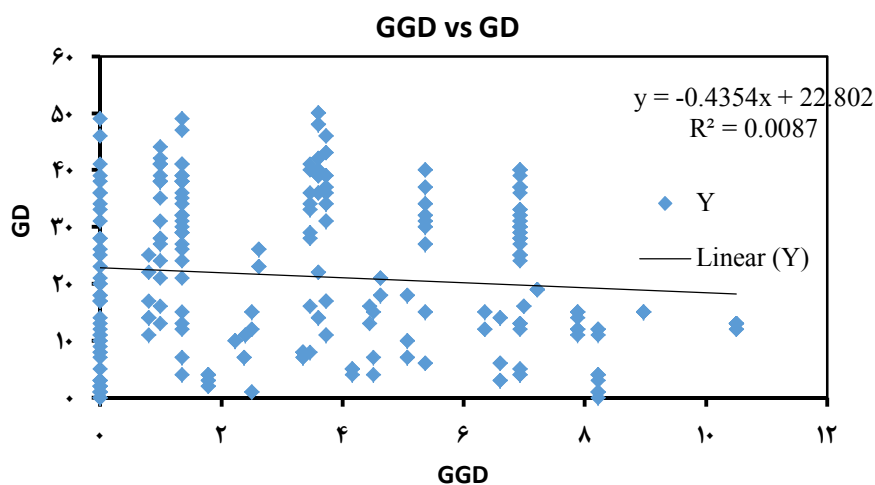
شاخص PhiPT برای برخی از جفت جمعیت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود. بیش‌ترین مقدار این شاخص معادل ۰/۸۹ بوده که بین جمعیت‌های قدمگاه (کر)-فیروزآباد (خلیج فارس) دیده می‌شود. کم‌ترین مقدار بین جفت جمعیت داراب (هرمز)-فیروزآباد (خلیج فارس) دیده می‌شود که مقدار آن ۰/۲۸ است (جدول ۴).

همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود براساس تست مانتل، فاصله جغرافیایی و ژنتیکی، ارتباط منفی با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.008$ را نشان می‌دهد. در تحلیل شبکه هاپلوتایپی کلاسترهای شبکه هاپلوتایپی تقریباً منطبق بر کلادهای درخت بیزین بود. بزرگترین شبکه هاپلوتایپی مربوط به افرادی از ایلام، کردستان، تنگ چوگان و زاب، کهمره بود (شکل ۵). نمونه‌های قدمگاه (کر) به همراه دو نمونه از رودخانه بشار، شبکه جدایی تشکیل دادند.

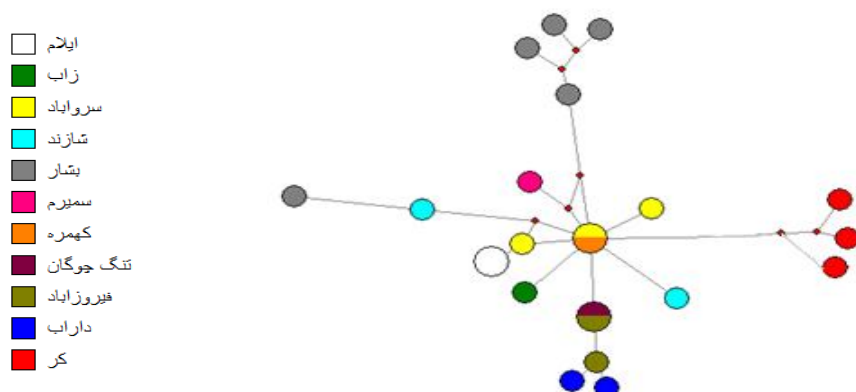
جدول ۴- شاخص درون زادآوری PhiPT برای جفت جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*) که در پایین قطر جدول نشان داده شده است.

ایلام-زاب	قدمگاه	داراب	فیروزآباد	کهمره-تنگ چوگان	بشار-سمیرم	شازند	سروآباد
۰	۰/۰۳۰	۰/۰۹۸	۰/۱۰۲	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	۰/۰۹۹	۰/۱۰۱
۰/۵۵	۰/۰۲۹	۰/۰۹۹	۰/۰۹۸	۰/۰۴۰	۰/۰۳۲	۰/۱۰۱	۰
۰/۸۳	۰/۰۶۸	۰/۰۹۸	۰/۳۳۰	۰/۳۳۱	۰/۰۴۰	۰	۰/۷۹۶
۰/۳۷	۰/۰۰۹	۰/۰۱۱	۰/۰۰۰	۰/۲۵۱	۰	۰/۴۰۲	۰/۳۵۵
۰/۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۴۹	۰/۳۳۶	۰	۰/۲۶۶	۰/۷۰۶	۰/۰۸۹
۰/۹۳	۰/۰۴۵	۰/۰۳۶	۰	۰/۸۸۰	۰/۴۶۳	۰/۹۴۴	۰/۹۲۴
۰/۸۶۷	۰/۰۳۰	۰	۰/۲۸۴	۰/۷۹۹	۰/۵۲۶	۰/۸۷۴	۰/۸۵۰
۰/۸۲۳	۰	۰/۸۷۵	۰/۸۹۳	۰/۷۹۹	۰/۵۲۹	۰/۸۵۰	۰/۸۱۹

اعداد بالای قطر، معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ را نشان می‌دهد.



شکل ۴- نمودار نتایج آزمون همبستگی فاصله جغرافیایی و ژنتیکی گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*)



شکل ۵- نمودار تحلیل شبکه هاپلوتاپی جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی (*A. mossulensis*)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحلیل‌های مولکولی مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که در دامنه پراکنش گونه شاه‌کولی جنوبی، جمعیت‌های مختلف تا حدود زیادی از هم متمایز و مجزا هستند، ولی جدایی آرایه‌شناختی را نشان نمی‌دهند. چنین ساختاری در بسیاری از جمعیت‌های حوضه‌های جنوبی کشور دور از انتظار نیست چرا که تاریخچه پیچیده اتصال و جدایی حوضه‌های جنوبی کشور طی مراحل یخبندان و بین یخبندانی پلیستوسن، موید این مطلب می‌باشد که جمعیت‌ها الگوهایی جدایی و ارتباط متعددی را تجربه کرده‌اند. برای برخی گونه‌ها نظیر گونه‌های جنس *Aphanius* این وقایع زمین‌شناختی، منجر به گونه‌زایی شده‌اند (Teimori, 2013). در مورد برخی آرایه‌ها نظیر گونه *Barbus Kessler, 1877* گونه‌زایی شده‌اند (et al., 2004). به‌طور کلی احتمالاً همین وقایع، در الگوهای پراکنش و ارتباط جمعیت‌های شاه‌کولی جنوبی نیز نقش داشته است به‌طوری‌که جمعیت‌ها برای مدت زمان کافی جدا نبوده‌اند تا این جدایی به‌طور کامل در صفات ریخت‌شناختی آنها منعکس شود. تا حدود پنج هزار سال قبل که دریا به سطح امروزی خود رسید، بین رودهای حوضه آبریز خلیج فارس شامل زیر حوضه تیگره، پرسیس و هرمز، بارها طی یخبندان‌های پلیستوسن ارتباط ایجاد شده است (Coad, 1987; Bobek, 1963; Esmaeili et al., 2014 and 2015).

از طرف دیگر تفاوت‌های مشاهده شده در ساختار جمعیتی گونه شاه‌کولی جنوبی در حوضه‌های جنوبی دور از انتظار نمی‌باشد چرا که متمایز در ماهیان آب شیرین باتوجه به درون‌آمیزی پایین بین جمعیت رودخانه‌های مختلف در مقایسه با جمعیت‌های مناطق دریایی بیشتر است (Ward et al.,).

(1994). براساس نتایج تحلیل‌های مختلف، بیشترین تمایز مشاهده شده در مطالعه حاضر مربوط به جمعیت قدمگاه در حوضه کر می‌باشد. در تحلیل بیزین نمونه‌های کر به‌همراه تعدادی از نمونه‌های رودخانه بشار، کلاد قاعده‌ای درخت را تشکیل داده‌اند. موقعیت قاعده‌ای کلاد کر، پیشنهاد می‌کند که احتمالاً شاه‌کولی جنوبی در این حوضه، قدمت بیشتری دارد و سپس به حوضه‌های دیگر پراکنش پیدا کرده است. تمایز نسبی جمعیت کر، در تحلیل AMOVA نیز دیده می‌شود که درجات بالایی از جدایی بین جمعیت کر و سایر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. جدایی جمعیت کر و هرمز، در تحلیل ریخت‌شناسی و نیز مولکولی (نتایج AMOVA و واگرایی ژنتیکی) دیده می‌شود. جمعیت کر همچنین جدایی زیادی از جمعیت فیروزآباد در جنوب حوضه خلیج فارس نشان می‌دهد که علت آن احتمالاً جدایی نسبتاً طولانی مدت این دو حوضه است. چراکه حداقل از یازده هزار سال قبل با بالا آمدن کوه استهبانات در طی آخرین دوره یخبندان (Würm) ارتباط بین حوضه رود کر و حوضه آبریز رود مند قطع شد (Butzer, 1976; Bobek, 1963). علی‌رغم تمایز نسبی مشاهده شده درمورد جمعیت کر، واگرایی ژنتیکی مشاهده شده بین این جمعیت و سایر جمعیت‌ها در حد تغییرات درون گونه‌ای است. همانگونه که ذکر شد، کلاد قاعده‌ای ۱/۸ درصد واگرایی نسبت به کلاد دیگر نشان داد و حتی واگرایی ۲/۴ درصدی بین کر و هرمز، کمتر از میانگین ذکر شده برای گونه‌های *Alburnus* می‌باشد که برطبق منابع (Ketmaier et al., 2008 and 2009) معادل ۳/۷ تا ۷ درصد و در این مطالعه، ۵ تا ۸ درصد، می‌باشد. البته در مطالعه‌ای دیگر واگرایی حدود دو درصد، به‌همراه تغییرات ریخت-شناختی برای معرفی جمعیتی از گونه *Alburnus arborella* به‌عنوان گونه جدید *A. neretvae* استفاده شد (Buj et al., 2010). اما گونه یاد شده در درخت بیشینه احتمال ارائه شده توسط جیگر و همکاران (Geiger et al., 2014) در کلاد مربوط به گونه *A. arborella* قرار گرفته است که نشان دهنده واگرایی کم و درحد تغییرات درون گونه‌ای *A. neretvae* از سایر جمعیت‌های *A. Arborella* است. جمعیت کر از نظر صفات ریختی مورد بررسی، با برخی جمعیت‌های حوضه دجله همپوشانی داد. این امر با نتایج بدست آمده توسط برخی محققین (Bianco and Banareescu, 1982) در تطابق است که جمعیت کر و دجله را متعلق به یک زیرگونه می‌دانستند.

علاوه بر حوضه رودخانه کر، جمعیت داراب در شمال زیرحوضه هرمز (رود کل) به‌همراه جمعیت فیروز آباد در جنوب زیر حوضه پرسیس، کلاد مجزایی در درخت بیزین تشکیل داده است که با نتایج شبکه هاپلوتایپی نیز در تطابق است. شاخص PhipT بین جمعیت‌های یاد شده نسبتاً پایین است که نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بین آنهاست. بر طبق اظهارات کد (Coad, 1987) حوضه‌های آبریز پرسیس و هرمز در طی زمان در سرچشمه رودها به هم مرتبط بوده اند و این امر مبادله عناصر فونی را تسهیل کرده است. جریان ژنی جمعیت هرمز با سایر جمعیت‌های مورد بررسی نسبتاً کم است. فاصله

مولکولی کم بین سایر جمعیت‌های خلیج فارس (تنگ چوگان و کهمره) و با جمعیت‌های تیگره و اشتراک هاپلوتایپ مشاهده شده بین آنها تا حدود زیادی قابل پیش‌بینی است چراکه علاوه بر تاریخچه پیوستگی این حوضه‌ها در دوره پلیستوسن (Esmaili et al., 2015)، امروزه نیز رودهای این دو حوضه بویژه در بخش‌های شمالی حوضه خلیج فارس و در دشت کم‌ارتفاع خوزستان، با هم در ارتباط هستند.

نتایج آزمون همبستگی فاصله جغرافیایی و ژنتیکی نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین تمایز ژنتیکی و فاصله جغرافیایی وجود ندارد. به عبارت دیگر، دورترین جمعیت‌ها لزوماً متمایزترین جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی نیستند. شیب منفی نمودار نیز دور از انتظار نیست، چرا که بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت کر و هرمز است که اتفاقاً فاصله جغرافیایی کم‌تری نیز دارند.

به‌طور کلی باتوجه به تغییرات مولکولی مشاهده شده، جدایی ژنتیکی در جمعیت‌های حوضه‌های جنوبی هرمز و کر بالاست. این امر در جمعیت‌های حوضه‌های مجاور و در گونه‌های دیگر نیز قابل مشاهده است. مثال روشنی از آن، هم‌تافت گونه *Capoeta damascina* است. جمعیت‌های این هم‌تافت گونه بصورت مجزا تکامل پیدا کرده و خود، مجموعه‌ای از شش گونه معتبر است (Alwan et al., 2016). *C. saadii* یکی از این شش گونه است که در حوضه‌های جنوبی یعنی کر، خلیج فارس، مهارلو، کرمان و هرمز پراکنش دارد. هاپلوتایپ‌های این گونه در مطالعه یاد شده، بین جمعیت‌های حوضه‌های مختلف واگرایی زیادی نشان می‌دهد که دلیل آن، شارش ژنتیکی محدود بین حوضه‌ها عنوان شده است.

برطبق داده‌های موجود، واگرایی مشاهده شده بین جمعیت‌ها در حد تغییرات درون‌گونه‌ای است. تصمیم‌گیری نهایی درمورد وضعیت آرایه‌شناختی جمعیت‌های گونه شاه‌کولی جنوبی نیازمند به روش‌های دقیق‌تر جمعیت‌شناختی است. بررسی صفات ریختی بیشتر، افزودن مارکرهای هسته‌ای، زمان‌سنجی وقایع تبارزایی این گونه در کل دامنه پراکنش جهانی و تطبیق آنها با وقایع زمین‌شناختی، درک روشن‌تر و جامع‌تری از وضعیت جمعیت‌های نسبتاً محصور این گونه بدست خواهد داد.

منابع

- Alwan N., Esmaili H.R., Krupp F. 2016. Molecular phylogeny and zoogeography of the *Capoeta damascina* species complex (Pisces: Teleostei: Cyprinidae). PLOS ONE, 11: e0156434.
- Bianco P.G., Banarescu P. 1982. A contribution to the knowledge of the Cyprinidae of Iran (Pisces, Cypriniformes). Cybium, 6: 75-96.

- Bobek H. 1963. Nature and implications of Quaternary climatic changes in Iran. Proceedings of the Rome Symposium organized by UNESCO and WHO, Changes of Climate, Paris, pp: 403–413.
- Brown I., Ehrlich P.R. 1980. Population biology of the checkerspot butterfly, *Euphydryas chalcedona*: structure of the Jasper Ridge colony. *Oecologia*, 47: 239–251.
- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J.F.Y., Burke T. 1998. Multi-Locus and Single-Locus DNA Fingerprinting. In: Hölzel AR (Eds.). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, pp: 287–336.
- Buj I., Vukic J., Sanda R., Perea S., Caleta M., Marčić Z., Bogut I., Povž M., Mrakovcic M. 2010. Morphological comparison of bleaks (*Alburnus*, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. *Folia Zoologica*, 59: 129–141.
- Butzer K.W. 1976. *Geomorphology from the Earth*. Harper & Row series in geography. Joanna Cotler Books. 263P.
- Coad B.W. 1987. Zoogeography of the Freshwater Fishes of Iran. Proceedings of the Symposium on the Fauna and Zoogeography of the Middle East, Mainz, pp: 213–228.
- Coad B.W. 1996. Zoogeography of the fishes of the Tigris-Euphrates Basin. *Zoology in the Middle East*, 13: 51–70.
- Coad B.W. 2014. Freshwater fishes of Iran. Updated 28 April 2014. Available from: www.briancoad.com.
- Coad B.W., Vilenkin B.Y. 2004. Co-occurrence and zoogeography of the freshwater fishes of Iran. *Zoology in the Middle East*, 31: 53–62.
- Esmaili H.R., Babai S., Gholamifard A., Pazira A., Gholamhosseini A., Coad B.W. 2015. Fishes of the Persis region of Iran: an updated checklist and ichthyogeography. *Iranian Journal Ichthyology*, 2: 201–223.
- Esmaili H.R., Teimori A., Sayyadzadeh G., Masoudi M., Reichenbacher B. 2014. Phylogenetic relationships of the tooth-carp *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the river systems of southern and south-western Iran based on mtDNA sequences. *Zoology in the Middle East*, 60: 29–38.
- Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Berrebi P., Bohlen J., Casal-Lopez, M., Delmastro G.B., Denys G.P. 2014. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 14: 1210–1221.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- 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, 8(6): 855-909.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K.I., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14): 3059–3066.
- Ketmaier V., Bianco P. G., Durand J. D. 2008. Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 362–367
- Ketmaier V., Finamore F., Largiadèr C., Milone M., Bianco P.G. 2009. Phylogeography of bleaks *Alburnus spp.* (Cyprinidae) in Italy, based on cytochrome b data. *Journal of Fish Biology*, 75: 997–1017.
- Kotlik P., Bogutskaya N.G., Ekmekci F.G. 2004. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, 13: 87–95.
- Kottelat M., Freyhof J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat. 646P.
- Luck G.W., Daily G.C., Ehrlich P.R. 2003. Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 331–336.
- Machordom A., Doadrio I. 2001. Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 18: 252–263.
- Mohammadian-kalat T., Aliabadian M., Esmaceli H.R., Abdolmalaki S., Nejhad R.Z. Vatandoust S. 2015. Species list and distribution map of the genus *Alburnus* Rafinesque, 1820 (Cyprinidae: Leuciscinae) in Iran. Check List, the Journal of Biodiversity, 11(5) (1743): 1-5.
- Nylander J.A.A. 2004. Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.
- Peakall R.O.D., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- Teimori A. 2013. The evolutionary history and taxonomy of *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) species in Iran and the Persian Gulf region. PhD Thesis, Ludwig Maximilian University of Munich. Munich, Germany.
- Ward R.D., Woodward M., Skibinski D.O.F. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fish. *Journal of Fish Biology*, 44: 213–232.

