



بررسی وضعیت آرایه‌شناسی جمعیت گاوماهیان (Teleost: Gobiidae) در شش رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر براساس ژن سیتوکروم اکسیداز COI

نسرين نيك‌مهر^۱، سهيل ايگدرى^{۲*}، هادي پورباقر^۳، آرمين يوسفي^۳

^۱ دانشجوی دکتری شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ دانشیار گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳ کارشناس ارشد شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

به دلیل شباهت ریختی بالا بین جمعیت و گونه‌های جنس *Ponticola* در سواحل جنوبی دریای خزر، شناسایی آن‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی براساس کلیدهای شناسایی دشوار است. امروزه نشانگرهای مولکولی به عنوان روش‌های مکمل در شناخت بهتر وضعیت آرایه‌شناسی ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تحقیق حاضر بررسی وضعیت آرایه‌شناسی گاوماهیان در شش رودخانه (سياهروود، زرين گل، بابلرود، تجن، سفيدرود (دو جمعیت بیجار و کیسموم)، کسلیان) در حوضه جنوبی دریای خزر براساس روش شناسه‌گذاری (بارکدینگ) Maximum Likelihood با استفاده از ژن COI میتواند ریایی با ترسیم درخت شجره‌شناسی با روش‌های Bayesian و DNA Likelihood بررسی شبکه هاپلوتایپی و ارتباط فاصله جغرافیایی و تمایز ژنتیکی انجام شد. نتایج نشان داد که میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین جمعیت‌های مورد مطالعه ۰/۶۹-۰/۶۸ است که براساس معیارهای ژنتیکی برای تفکیک گونه‌ای اندک است. همچنین دارنگاره ترسیم شده و شبکه هاپلوتایپی تمامی جمعیت‌های مورد بررسی را هاپلوتایپ‌های گونه *P. gorlap* نشان داد.

واژه‌های کلیدی:

گاوماهیان، دریای خزر، ژن سیتوکروم اکسیداز، آرایه‌شناسی

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۷/۱۰/۰۶

پذیرش: ۹۸/۰۱/۱۸

نویسنده مسئول مکاتبه:

سهيل ايگدرى، دانشیار گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

ایمیل: soheil.eagderi@ut.ac.ir

۱ | مقدمه

ترین زیرخانواده گاوماهیان، Benthophilinae است که شامل گروه Nelson Ponticolini و Benthophilini Neogobiini هایPonticolini باشد (et al., 2016). گونه‌های Ponticolini در منطقه پونتوکاسپین *P. cephalargoides*, *Ponticola. bathybius* (PontoCaspian) *P. geobelli*, *P. eurycephalus*, *P. cyrius*, *P. constructor*, *P. rattan*, *P. platyrostris*, *P. kessleri*, *P. iranicus*, *gorlap* Neilson and Stepien, 2009; *P. syrman* و *P. rhodionis* (Esmaeili et al., 2018). تاکنون گونه‌های (*P. bathybius*) (Esmaeili et al., 2018) در حوضه جنوبی دریای خزر گزارش شده است جنس *Ponticola* در حوضه جنوبی دریای خزر پیدا شده است (Esmaeili et al., 2018).

گاوماهیان (Gobiidae) از بزرگترین خانواده‌های ماهیان با ۱۳۵۹ گونه در ۱۸۹ جنس هستند که در آب‌های شیرین، لب‌شور و سیستمهای دریایی بهویژه در مناطق گرمسیری حضور دارند (Nelson et al., 2016). اعضای این خانواده معمولاً ارزش تجاری کمی دارند و دسترسی به نمونه‌های آن دشوار است، از این‌رو کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Bogutskaya et al., 2013). این ماهیان نقش مهمی در اکوسیستم‌های آبی ایفا می‌کنند. به عنوان مثال، منابع غذایی و یا رقیب Corkum et al., (2004) اگرچه گونه‌های متعددی از گاوماهیان در حوضه دریای خزر یافت می‌شوند، ولی اعتبار گونه‌ای بسیاری از آن‌ها هنوز براساس مطالعات مولکولی تأیید نشده است (Eagderi et al., 2016). قدیمی-

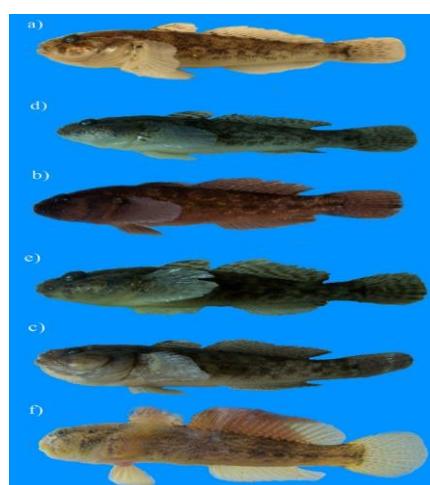
مناطق کوهستانی با آب‌های تقریباً تمیز ساکن هستند و در مناطق میانه و پائین دست رودخانه‌ها وجود ندارند (Derzhavin, 1926). در رودخانه‌های کوچک تالاب‌انزلی این گونه در نواحی پائین دست با جریانی آهسته و بستری رسی یافت می‌شود. همچنین در رودخانه سیاه‌درویشان که رودی با جریان شدید و جنس بستر قله سنگی است نیز گزارش شده است (Ahnelt and Holcik, 1996).

Ponticola با توجه به تنوع بالای ویژگی‌های ریختی اعضای جنس در حوضه جنوبی دریای خزر، برای درک بهتر وضعیت آرایه‌شناختی جمعیت‌های گاوماهیان رودخانه‌های مختلف آن نیاز است که از سایر مارکرها از جمله تکنیک DNA barcoding استفاده شود. توالی ژن میتوکندریایی COI به عنوان یک مارکر قوی در شناسه‌گذاری (Barcodeing) و آرایه‌شناسی اغلب ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است. از این‌رو این مطالعه با هدف بررسی وضعیت آرایه‌شناختی گاوماهیان شش رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر که ابهاماتی در وضعیت آرایه‌شناسی آن‌ها براساس مطالعات قبلی وجود دارد، براساس ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) به اجرا درآمد.

۲ | مواد و روش‌ها

نمونه‌های گاوماهیان از رودخانه‌های کسلیان (قائم‌شهر)، بابلرود، سفیدرود (دو جمعیت شاخه فرعی رود بیجار و کیسوم)، سیاه‌رود (قائم‌شهر)، تجن (ساری) و زرین‌گل (علی‌آباد کتول) توسط دستگاه الکتروشوکر از هر رودخانه صید (شکل ۱ و جدول ۱) و تعداد ۳ نمونه در اatanول ۹۶٪ تثبیت شد و سپس طی دو مرحله با فاصله زمانی ۱۲ ساعت عملیات تعویض ا atanول انجام شد. به علاوه تعداد ۱۰-۳۰ نمونه از هر جمعیت برای شناسایی ریختی آن‌ها براساس کلیدهای شناسایی در فرمالین فسفاته با فری ۱۰٪ تثبیت شد.

شبیه یکدیگر بوده، از این رو شناسایی آن‌ها براساس ویژگی‌های ریخت ظاهری دشوار است و این امر سبب شده برخی گونه‌های این جنس را به عنوان یک کمپلکس در نظر بگیرند (Eagderi et al., 2016). برخی مطالعات آرایه‌شناسی روی گونه‌های جنس *Ponticola* در Neilson and Stepien, (2009)، از جمله در رودخانه‌های کوچک تالاب انزلی گونه *P. cyrius* گزارش شده است (Ahnelt and Holcik, 1996)، ولی عبدالی و رحمانی (2001) جمعیت‌های ساکن *Neogobius flaviatilis* رودخانه‌های حوضه جنوبی خزر را گونه Karimian (2013) جمعیت رودخانه‌های زرین‌گل و کبودوال را گونه *N. pallasi* معرفی کرده است. اخیراً وجود تنوع بالایی از جنس *Ponticola* در حوضه جنوبی دریای خزر گزارش و گونه *P. iranicus* از بخش غربی حوضه جنوبی دریای خزر توصیف شده است (Vasil'eva et al., 2015). گونه *P. gorlap* (Kessler, 1874) از دریای خزر توصیف شد و بین جمعیت‌های دریای خزر و سیاه این گونه تفاوت‌هایی بین تعداد شعاع‌های باله سینه‌ای و فاصله نسبی پوزه تا مخرج و مخرج تا نوک باله دمی را گزارش نمودند. گونه *P. gorlap* بدلیل رنگ زرد بدن، نداشتن برآمدگی، سر تقریباً مثلثی شکل و نداشتن الگوی خال دار روی گونه و پایه باله سینه‌ای از گونه *P. kessleri* Berg (1949) متمایز شناخته شد (Berg, 1949). بدلیل این تفاوت‌ها برگ (*P. gorlap*) گونه *P. kessleri* به عنوان زیر گونه *P. kessleri* در نظر گرفت. گونه *P. gorlap* کف‌زی بوده و در آب‌های شور، شیرین و نیمه‌شور دریای خزر ساکن است. در دریای خزر اعضای این گونه در سواحل روی بستر صخره‌ای یا شنی، از عمق ۱۰-۲۰ متری تا عمق تقریبی ۱۰-۱۵ متری حضور دارند و تعداد کمی از آن‌ها نیز در دریای باز (آب‌های عمیق) یافت می‌شوند (Ragimov, 1965, 1968, 1976).



شکل ۱- نمای جانبی برخی نمونه‌های مورد مطالعه گاوماهی‌های در رودخانه‌های (a) سیاه‌رود، (b) زرین‌گل، (c) بابلرود، (d) تجن، (e) کیسوم و (f) بیجار

جدول ۱ - مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری جمعیت‌های مختلف گونه *P. gorlap*

ردیف	ایستگاه	شناسه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع (m)
۱	زدین گل	علی‌آباد کنول	36°53'2.52"N	54°57'06.66"E	۲۷۶
۲	پالرود	بابل	36°29'38.49"N	52°41'10.55"E	.
۳	تجن	ساری	36°31'19.83"N	53°05'22.66"E	۶۵
۴	سفیدرود	بیجار	37°00'50.47"N	49°38'11.60"E	۸۸
۵	سفیدرود	کسیوم	37°07'16.96"N	49°44'08.14"E	۵۱
۶	سیاهرود	قائمشهر	36°26'35.09"N	52°53'47.99"E	۳۹
۷	کلیسان	قائمشهر	36°12'19.1"N	53°00'56.0"E	۴۷۰

(Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال گردید. قطعات تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند. (Hall, 1999) توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7.1.3 و پیرايش 1.8.3 و عملیات روی‌هم‌گذاری توالی‌های ژن COI با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 1.8.3 انجام شد. بهمنظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در ترسیم درخت تبارزایی، توالی‌های به دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن NCBI با سایر توالی‌های موجود مقایسه و توالی‌های دیگر این جنس از بانک ژن استخراج شد (جدول ۲). مدل تکاملی نیز با استفاده از نرم‌افزار IQ-TREE 1.6.0 انتخاب شد (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). برای بررسی روابط شجره‌شناسی به روش Bayesian Inference از نرم‌افزار MrBayes 3.1.2 با تکرار ۱۰ میلیون نسل (Ronquist *et al.*, 2012) و IQ-Tree برای ترسیم دارنگاره Maximum Likelihood از نرم‌افزار MEGA 6 برای تعیین فاصله ژنتیکی براساس K2P و نرم‌افزار FigTree 1.4.2 استفاده شد (Hoang *et al.*, 2018). برای تعیین آرایه‌ها استفاده شد (Kumar *et al.*, 2008). همچنین برای ترسیم دارنگاره‌های ایجاد شده نیز از نرم‌افزار Babka 2015 (Rambaut, 2015) استفاده گردید (Outgroup). براساس Babka (Neilson and Stepien, 2009) گونه *P. gorlap* با شماره دسترسی KM373669 انتخاب شد. رابطه بین پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه براساس آزمون مانتل (Mantel test) در نرم‌افزار Past براساس معیار Jukes-Cantor مورد بررسی قرار گرفت. بهمنظور رسم شبکه هاپلوتایپ و نمایش روابط هاپلوتایپ‌های به دست آمده از نرم افزار Network 5.0.0.3 براساس الگوریتم Median-Joining (MJ) استفاده شد. در واقع شبکه هاپلوتایپی نشان دهنده روابطی است که در درخت ML نشان داده می‌شود ولی در گراف شبکه جزئیات بیشتری را می‌توان دید.

استخراج DNA با استفاده از روش بهینه‌شده فنل-کلروفروم صورت گرفت. در این روش قطعه باله سینه‌ای سمت راست در بافر استاندارد STE به همراه پروتینیاز K به مدت ۲۴ ساعت هضم و سپس خالص‌سازی با استفاده از فنل و کلروفرم انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، DNA در آب قطر حل شد. کیفیت استخراج شده توسط ژل آگارز ۱٪ و کمیت آن توسط دستگاه نانودرایپ مورد سنجش قرار گرفت. بهمنظور تکثیر ژن COI از یک جفت پرایمر 5'-TCAACCAACCACAAAGACAT .FishF1 و برگشت 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCA .FishR1 (TGGCAC3' و AAGAATCA3' .Ward *et al.*, 2005) برای انجام واکنش PCR براساس دستورالعمل شرکت سازنده پرایمرها (Thermo Scientific) از μL ۵۰ محلول PCR شامل μL ۲۵ محلول Taq 2X Mastermix red، مقدار μL ۱ از هر پرایمر با غلظت μM ، مقدار μL ۵ از الگو و μL ۱۸ آب قطره‌یونیزه شده درون میکروتیوپ μL ۲۰۰ استفاده شد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای و اسربشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C و ۳۰ چرخه یک دقیقه‌ای با دمای ۹۴ و ۵۸/۵°C و درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای اسربشته‌سازی، اتصال پرایمر و تکثیر و در نهایت یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C بهمنظور بست نهایی انجام شد. بهمنظور اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروforeز و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و سپس برای مشاهده باندهای حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر، در معرض تابش UV قرار داده شد.

بهمنظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر، ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و سپس جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی

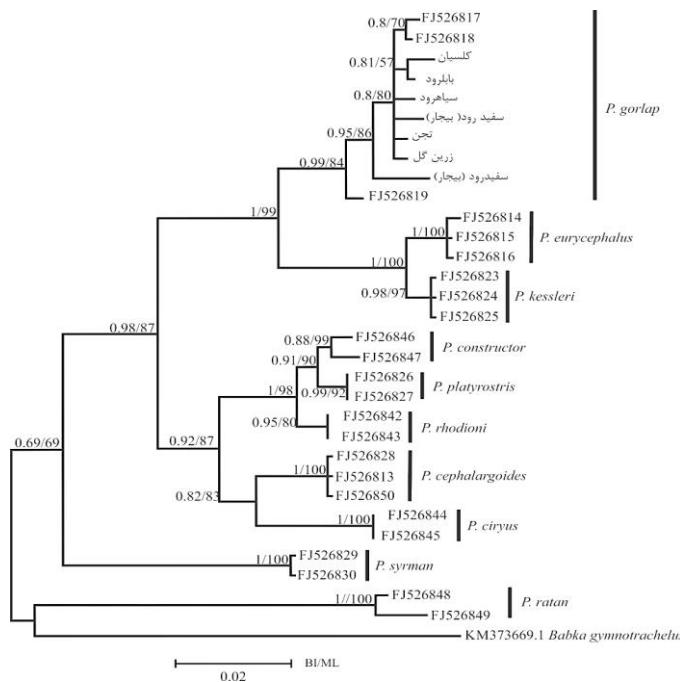
جدول ۲ - نام علمی، شماره دسترسی بانک ژن و موقعیت مکانی توالی‌های دانلود شده از بانک ژن

شماره	گونه	شماره دسترسی	موقعیت مکانی	شماره	گونه	شماره دسترسی	موقعیت مکانی
۱	<i>P. cephalargoides</i>	FJ526828	تنگه کرج، اوکراین	۱۳	<i>P. gorlap</i>	FJ526819	دریای خزر، لیکران، آذربایجان
۲	<i>P. cephalargoides</i>	FJ526813	خلیج رودخانه دنستر، اوکراین	۱۴	<i>P. kessleri</i>	FJ526823	رودخانه دنستر، اوکراین
۳	<i>P. cephalargoides</i>	FJ526850	خلیج رودخانه دنستر، اوکراین	۱۵	<i>P. kessleri</i>	FJ526824	سمفروبول، اوکراین
۴	<i>P. cirus</i>	FJ526844	رودخانه آراگوی، گرجستان	۱۶	<i>P. kessleri</i>	FJ526825	رودخانه دانوب، سیبری
۵	<i>P. cirus</i>	FJ526845	رودخانه پتسا، گرجستان	۱۷	<i>P. platyrostris</i>	FJ526826	کرج، اوکراین
۶	<i>P. constructor</i>	FJ526846	رودخانه خوبی، گرجستان	۱۸	<i>P. platyrostris</i>	FJ526827	کرج، اوکراین
۷	<i>P. constructor</i>	FJ526847	رودخانه اپ، گرجستان	۱۹	<i>P. ratan</i>	FJ526848	دریای آزو، اوکراین
۸	<i>P. eurycephalus</i>	FJ526814	خلیج ادسا، اوکراین	۲۰	<i>P. ratan</i>	FJ526849	دریای آزو، اوکراین
۹	<i>P. eurycephalus</i>	FJ526815	خلیج سوختی، اوکراین	۲۱	<i>P. rhodionis</i>	FJ526842	بارانوکا، روسیه
۱۰	<i>P. eurycephalus</i>	FJ526816	خلیج ادسا، اوکراین	۲۲	<i>P. rhodionis</i>	FJ526843	رودخانه خروتو، روسیه
۱۱	<i>P. gorlap</i>	FJ526817	الیوکا، روسیه	۲۳	<i>P. syman</i>	FJ526829	رودخانه دانوب، اوکراین
۱۲	<i>P. gorlap</i>	FJ526818	دریای خزر، نایران، آذربایجان	۲۴	<i>P. syman</i>	FJ526830	رودخانه دانوب، اوکراین

۳ | نتایج

تحقیق پیشنهاد شد و هر دو دارنگاره ترسیم شده با استفاده از روش‌های Bayesian Inference و Maximum Likelihood یکسان بودند. به همین دلیل تنها دارنگاره Bayesian انتخاب و اعداد بوت‌استرپ ML و احتمال پیشین BI حاصل از هر دو درخت روی گره‌ها درج شد (شکل ۲). براساس دارنگاره‌های ترسیم شده، گونه‌های جنس *Ponticola* در شش کلاد خواهری شامل یک کلاد هاپلوتاپ-های *P. gorlap*, قرار گرفتند و اعتبار گونه‌ای آن‌ها با عدد بوت‌استرپ بالا تأیید شد.

در این مطالعه توالی زیر واحد ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) برای ۲۱ نمونه از ۷ جمعیت صیدشده از شش رودخانه متعلق به جنس *Ponticola* به طول ۶۳۸ جفت باز به دست آمد، که به دلیل تشابه توالی‌های هر جمعیت، تنها یکی از آن‌ها برای آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت. نام گونه و شماره دسترسی گونه‌های جنس *Ponticola* موجود در حوضه پنتوکاسپین (شامل حوضه‌های دریای سیاه، آзов، خزر و آral است) استخراج شده از ژن بانک در جدول ۱ آورده شده است. براساس نتایج، مدل تکاملی TIM₂+F+I+G₄ برای توالی‌های این



شکل ۲ - دارنگار ترسیم شده به روش BI و ML. شماره دسترسی نمونه‌های بانک ژن در جلوی آنها نوشته شده است، اعداد بالای گره‌ها در سمت راست، عدد BI بدست آمده برای ML حدود ۱۰۰۰ تکرار و عدد سمت چپ احتمال پیشین برای BI ۱۰ میلیون نسل محاسبه شد.

جغرافیایی گونه‌های مورد مطالعه همبستگی معنی‌داری را نشان نداد (P=0.07823 و R=0.0782).

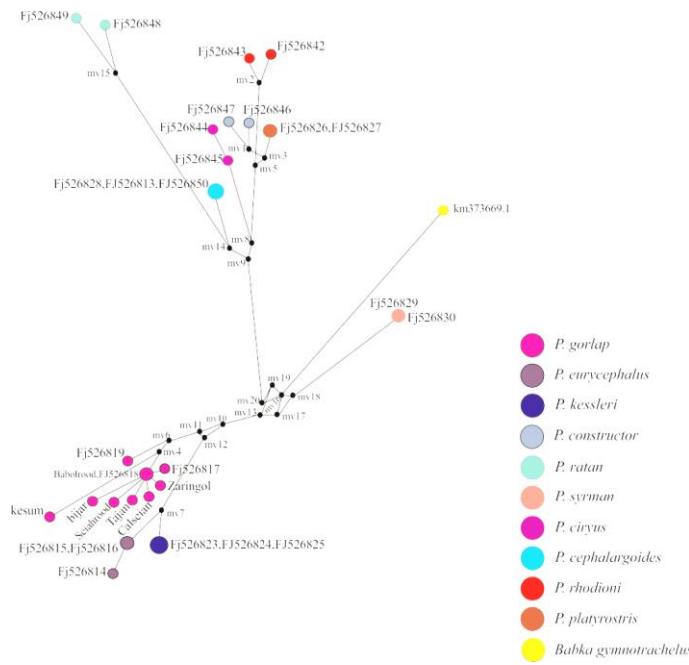
براساس نتایج، میانگین فاصله ژنتیکی K_{2P} بین جمعیت‌های مورد مطالعه گونه P. gorlap در محدوده ۰/۶۹-۱/۶۸ درصد محاسبه شد (جدول ۳). نتایج آزمون مانتل (Mantel test) بین داده‌های مولکولی و

جدول ۳- میانگین فاصله ژنتیکی K_{2P} در بین گونه‌های مورد مطالعه بر اساس درصد تمایز توالی ژن COI

ردیف	آرایه‌ها	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
۱	P. cirus									
۲	P. gorlap									
۳	P. syman									
۴	جمعیت رودخانه سیاهرود					۸/۶۶	۰/۹۰	۷/۷۶		
۵	جمعیت رودخانه سفیدرود (بیجار)					۰/۹۶	۸/۶۶	۱/۰۲	۷/۳۶	
۶	جمعیت رودخانه کلسانیان					۱/۱۲	۰/۷۹	۸/۸۵	۱/۰۷	۷/۹۵
۷	جمعیت رودخانه سفیدرود (کیسوم)					۱/۷۸	۱/۹۵	۱/۶۲	۸/۰۵	۷/۳۸
۸	جمعیت رودخانه تجن					۱/۴۵	۰/۶۳	۰/۷۹	۰/۴۷	۸/۴۵
۹	جمعیت رودخانه زرین‌گل					۰/۴۷	۱/۶۲	۰/۷۹	۰/۶۳	۸/۲۶
۱۰	جمعیت رودخانه بابلرود					۰/۳۲	۰/۴۷	۱/۶۲	۰/۴۷	۸/۲۴

جهشی در کنار شش هاپلوتاپ دیگر (FJ526817)، کسلیان، سیاهرود، تجن، زرین‌گل، بیجار و کیسوم) قرار دارند. هاپلوتاپ‌هایی که اتصالات جهشی با بیش از یک هاپلوتاپ دارند و معمولاً اندازه دایره بزرگ‌تری (فراوانی زیاد) دارند، هاپلوتاپ اعدادی نمونه‌های بابلرود و نابران آذربایجان مشخص شدند (Posada and Crandall, 2001). جمعیت کیسوم رودخانه سفیدرود نسبت به مابقی جمعیت‌ها دیرتر جدا شده و به هاپلوتاپ P. gorlap (FJ526819) نزدیک‌تر می‌باشد.

براساس نتایج، شبکه هاپلوتاپی ترسیم شده ۲۰ گره میانی را نشان داد و از مجموع ۷ جمعیت گاوماهی مورد مطالعه، تعداد ۶ هاپلوتاپ یافت شد (شکل ۳). در مجموع شاخص تنوع هاپلوتاپی (Hd) ۰.۹۷۹۸ محاسبه شد. هاپلوتاپ‌های رودخانه‌های کلسیان، بابلرود، سفیدرود شامل دو جمعیت بیجار و کیسوم)، سیاهرود، تجن و زرین‌گل در کنار P. gorlap گرفتند. جمعیت بابلرود و هاپلوتاپ P. gorlap (FJ526818) با یکدیگر و هر دو این هاپلوتاپ‌ها با اتصالات



شکل ۳- شبکه هاپلوتاپی ترسیم شده برای ژن COI نمونه‌های مورد بررسی. اندازه دایره‌ها نشان‌دهنده فراوانی هاپلوتاپ‌های است. بردارهای میانی (mv) بیان‌کننده از دست رفتن یا عدم حضور هاپلوتاپ است که با نقاط سیاه کوچک نشان داده شده است.

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

توالی ژن COI میتوکندریایی به طور گستردگی در مطالعات آرایه‌شناسی DNA ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا تغییرات آن نسبت به

هسته‌ای بسیار سریع‌تر بوده و در نتیجه توانایی بیشتری در بیان اختلافات بین گونه‌های نزدیک دارد (Ward et al., 2005). به دلیل

وسعت زیستگاه‌های در دسترس سبب پیدایش چندین هاپلوتایپ متنوع در مقایسه با سایر رودخانه‌های کوچک‌تر شده‌اند.

۵ | تشریف و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۹۷۰۱۴۴۷۰، با حمایت‌های صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و دانشگاه تهران انجام شد.

پست الکترونیک نویسنده‌گان

nasrin_nikmehr@yahoo.com

نسرين نيكمهر:

soheil.eagderi@ut.ac.ir

سهیل ایگدری:

poorbagher@ut.ac.ir

هدی پورباقر:

soheil.eagderi@yahoo.com

آرمین يوسفی:

REFERENCES

- Abdoli A., Rahmani H. 2001. Assay diet of two gobiidae species *Neogobius melanostomus*, *Neogobius fauviiatilis* in Gardsht National Park, Madsaroo. Agricultural Sciences and Natural Resources, 1: 3-15. (In Persian).
- Ahnelt H., Holcik J. 1996. Distribution of two species of the genus *Neogobius* (Pisces: Gobiidae) in the catchment area of the southern Caspian Sea. Acta Universitatis Carolinae Biologica, 40(1-2): 99-114.
- Berg L.S. 1949. Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries. Vol. 3, Izdatel'vesto Akademii Nauk SSSR, Moscow, Russia. 510 P.
- Bogutskaya N.G., Kiâško P.V., Naseka A.M., Orlova M.I. 2013. Identification keys for fish and invertebrates of the Caspian Sea. Vol. 1, Fishes and mollusks. Tovarišestvo naučnyh izdanij KMK, Sankt-Peterburg–Moskva, Russia...543.P.
- Corkum L.D., Sapota M.R., Skora K.E. 2004. The round Goby, *Neogobius melanostomus*, a fish invader on both sides of Atlantic Ocean. Biological Invasions, 6: 173-181.
- Derzhavin A.N. 1926. Fishes of the Karasuk River. Izvestiya Bakinskoi Ikhtiologicheskoi Laboratorii, 2(1):161-184. (In Russian).
- Eagderi S., Nasri M., Jouladeh-Roudbar A. 2016. Gobiids of Iran and a key to them. Ava Viana Publication Co., Tehran, Iran. 74 P. (In Persian).
- Esmaeili H.R., Sayyadzadeh G., Eagderi S., Abbasi K. 2018. Checklist of freshwater fishes of Iran. FishTaxa, 3(3): 1-95.
- Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Denys G.P. 2014. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. Molecular Ecology Resources, 14(6): 1210-1221.
- Hall T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
- Hoang D.T., Chernomor O., Von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast

شباهت ریختی بالای اعضای جنس *Ponticola* نه تنها شناسایی جمعیت‌های مختلف یک گونه، بلکه جدایی گونه‌های این جنس براساس کلیدهای شناسایی تعریف شده دشوار است (Vasil'eva et al., 1993; Miller and Vasil'eva et al., 2015; Eagderi et al., 2016). از طرفی بررسی وضعیت دقیق آرایه‌شناسی جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف گاوماهیان در رودخانه‌های حوضه جنوبی خزر تاکنون انجام نشده است.

براساس تحقیقات قبلی میزان تمایز ژنتیکی در بین راسته، جنس، گونه و حتی درون جمعیت‌های گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت بوده و مقدار عدد ثابتی نیست. در مطالعات گذشته فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008; Geiger et al., 2014 حدود ۰٪-۲٪ درصد گزارش شده است (al.). در منطقه مدیرانه این مقدار حدود ۰٪-۲٪ گزارش شده است (Geiger et al., 2014). نمونه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر نیز جزء منطقه پنتوكاسپین می‌باشد چراکه براساس مطالعات رید و اورلوا (Reid and Orlova, 2002) دریاهای مدیرانه و سیاه، راه ارتباطی با دریای خزر داشته و همچنین فون ماهیان دریای خزر و سیاه شباهت‌های زیادی دارند، از این رو تصمیم-گیری بر پایه فاصله ژنتیکی ۰٪-۲٪ (Geiger et al., 2014) برای جدایی گونه‌های حوضه جنوبی خزر قابل اعتمادتر است. براساس نتایج، حداقل فاصله ژنتیکی مشاهده شده بین جمعیت‌های مورد بررسی در این ۱/۶۸ درصد بود. همچنین تمامی جمعیت‌های مورد بررسی در این تحقیق در کلاد خواهی گونه *P. gorlap* قرار گرفتند. از این رو تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه گونه *P. gorlap* در ۶ رودخانه مورد مطالعه هستند.

گونه *P. gorlap* در ایران در گستره وسیعی از رودخانه‌ها از آستانه تا گرگان رود و احتمالاً تا اترک، مرداب و سواحل ازلى، خلیج گرگان، جنوب شرقی و غربی خزر و جنوب بخش‌های مرکزی خزر گزارش شده است (Eagderi et al., 2016) که همگی براساس صفات ریختی گزارش شده‌اند و نتایج این مطالعه تأیید کننده دامنه پراکنش بالای این گونه است. در سواحل مازندران (امیرآباد، ساری، جوبیار، بابلسر، سرخ‌رود، نوشیر) گونه‌های غالب گاوماهیان این منطقه را *N. pallasi* و *P. gorlap* تشکیل می‌دهد (Yousefi et al., 2016). بعد از آن *P. gorlap* میتوکندریایی COI میتوکندریایی تمام‌اً متعلق به گونه *P. gorlap* نشان داد و حضور *N. pallasi* در رودخانه‌های مورد بررسی تأیید نشد. بین هاپلوتایپ‌های ماهیان نمونه برداری شده از ماهیان حوضه جنوبی خزر و گونه *P. gorlap* متعلق به کشورهای آذربایجان و روسیه تفاوت اندکی وجود دارد. نتایج شبکه هاپلوتایپی نشان داد که منشاء بیشتر جمعیت مورد مطالعه این گونه (*P. gorlap*) یکسان بوده و احتمالاً جمعیت‌های دریایی این گونه پس از ورود به رودخانه‌های مختلف حوضه جنوبی دریای خزر هاپلوتایپ‌های متمایزی را به‌واسطه جدایی مکانی در طی دوره تکاملی شکل داده‌اند، ولی نتایج نشان داد که برخی از جمعیت‌ها از قبیل جمعیت رودخانه سفیدرود به‌واسطه

- bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2): 518-522.
- 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*, 3(6): 1-8.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. 2017. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature Methods*, 14: 587-589.
- Karimian E. 2013. Comparison of some morphometric and dynamical characteristics of sand gobies *Neogobius pallasi* (Berg, 1916) in the streams of Kaboodvall, Zarigel and Shiraz Golestan. *Applied Ichthyological Research*, 1(2): 11-26.
- Kessler K.F. 1874. The description of fishes from families common on the Black and Caspian seas. *Trudy Saint Petersburg Obshchestva*, 5:191-324. (In Russian).
- Kumar S.A., Lo P.H., Chen SH.M. 2008. Electrochemical selective determination of ascorbic acid at redox active polymer modified electrode derived from direct blue 71. *Elsevier*, 41: 518-523.
- Miller P.J., Vasil'eva E.D. 2003. *Neogobius Iljin*, 1927. In: Miller PJ (Eds.). The freshwater fishes of Europe. Vol. 8/I. Mugilidae, Atherinidae, Atherinopsidae, Blenniidae, Odontobutidae, Gobiidae 1. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany. pp:163-171
- Neilson M.E., Stepien C.A. 2009. Escape from the Ponto-Caspian: Evolution and biogeography of an endemic goby species flock (Benthophilinae: Gobiidae: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1): 84-102.
- Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V.H. 2016. Fishes of the World. 3rd ed. Wiley, New York, USA. 707 P.
- Posada D., Crandall K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1): 37-45.
- Ragimov D.B. 1965. On the distribution of gobies at the west coast of the Middle and South Caspian. *Doklady Akademii Nauk Azerbaijan SSR*, 21(12): 47-50 (In Russian).
- Ragimov D.B. 1968. The distribution of gobies at the west coasts of the Middle and South Caspian. *Doklady Akademii Nauk Azerbaijan SSR*, 4: 66-74 (In Russian).
- Ragimov D. B. 1976. Materials on distribution and abundance of gobies at the east coasts of the Middle and South Caspian. *Doklady Akademii Nauk Azerbaijan SSR*, 2: 83-87 (In Russian).
- Rambaut A. 2015. FigTree version1.4.0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/> software/ figtree.
- Reid D.F., Orlova M.I. 2002. Geological and evolutionary underpinnings for the success of Ponto-Caspian species invasions in the Baltic Sea and North American Great. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(7): 1144-1158.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Bioinformatics*, 61: 539-542.
- Vasil'eva E.D., Mousavi-Sabet H., Vasil'ev V.P. 2015. *Ponticola iranicus* sp. nov. (Actinopterygii: Perciformes: Gobiidae) from the Caspian Sea basin. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45(2): 189-197.
- Vasil'eva E.D., Vasil'ev V.P., Pinčuk V.I. [Pinchuk V.I.]. 1993. Kraniologičeskij analiz byčkov podroda *Ponticola* Iljin, 1927. III. Sravnitel'no-morfologičeskoe issledovanie *Neogobius kessleri*, N. ratan i dopolnitelnye svedeniâ po N. syrman v svâzi s diagnostikoji ob"ěmom podroda *Ponticola*. ([Craniological analysis on gobies from the subgenus *Ponticola* Iljin, 1927. III. Comparative morphological investigation of *Neogobius kessleri*, N. ratan and additional data on N. syrman in relation with diagnostic and structure of the subgenus *Ponticola*). *Voprosy Ikhtiologii*, 33(5): 609-617. (In Russian).
- 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(1462): 1847-57.
- Yousefi M.R., Roushan R.H., Hosseiniard S.M. 2016. Parasitic fauna of Gobiidae in Mazandaran coastal zones, North of Iran 2011. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(2): 273-276.

نحوه استناد به این مقاله:

نیکمهر ن., ایگدری س., پورباقر ه., یوسفی آ. بررسی وضعیت آرایه‌شناسی جمعیت گاوماهیان (Teleost: Gobiidae) در شش رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر براساس ژن سیتوکروم اکسیداز COI. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبد کاووس. ۱۳۹۹، ۸(۲): ۲۷-۳۴.

Nikmehr N., Eagderi S., Poorbagher H., Yousefi A. Taxonomic status of six populations of the Gobiids (Teleost, Gobiidae) in the southern Caspian Sea basin using COI gene. *Journal of Applied Ichthyological Research*, University of Gonbad Kavous. 2020, 8(2): 27-34.

Taxonomic status of six populations of the Gobiids (Teleost, Gobiidae) in the southern Caspian Sea basin using COI gene

Nikmehr N¹., Eagderi S*²., Poorbagher H²., Yousefi A³.

¹PhD student, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

²Associate Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³ M.Sc. of Fisheries, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 27-12-2018

Accepted: 07-04- 2019

Corresponding author:

Eagderi S. Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Email: soheil.eagderi@ut.ac.ir

Abstract

Due to the high morphological similarities among populations and species of *Ponticola* genus in the southern Caspian Sea, it is difficult to identify them based on the provided keys. Molecular markers are used as a supplementary tool to a better understanding of the taxonomic status of fish species. This study was conducted to understand the taxonomic status of gobiids from six rivers (Siah, Zaringol, Babol, Tajan, Sefid vis. Bijar and Kisum populations, and Kelsian) in the southern Caspian Sea basin. The taxonomic status was studied based on DNA barcoding using mitochondrial COI gene by reconstructing phylogenetic tree based on ML and BI methods and drawing haplotype network and assessment of the geographic and genetic distances. The results showed a mean genetic distance (K2P) of 0.69-1.68 among the studied populations which is too low to consider them as distinct species based on the genetic criteria. Also, BI and ML cladograms and haplotype network showed that all populations are haplotypes of *P. gorlap*.

Keywords: Gobiidae, Caspian Sea, COI, Taxonomy