



بررسی جایگاه تبارشناختی ماهی زردپَر سرمخروطی *Luciobarbus conocephalus* (Kessler, 1872) در حوضه آبریز هریرود با استفاده توالی ژن میتوکندریایی *Cytb*

آرش جولاده رودبار، حمید فرحمند*، امیرعابد علم دوست، باقر مجازی امیری، سهیل ایگدری

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۹/۰۷/۲۳	
اصلاح: ۹۹/۱۱/۱۸	
پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۵	
کلمات کلیدی:	
تبارشناسی	
تمایز ژنتیکی	
سس ماهی	
کپورماهیان	

اخیراً زردپَر سرمخروطی *Luciobarbus conocephalus* از رودخانه هریرود برای اولین بار گزارش شده است اما در مورد اعتبار این گونه در بین محققان شک و تردید وجود دارد. برخی آن را به عنوان زیرگونه و برخی دیگر آن را به عنوان مترادف زردپَر سر بزرگ *L. capito* می‌دانند. بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی جایگاه تبارشناسی و اعتبارسنجی این گونه انجام شد. بدین منظور نمونه‌های منتسب به این گونه از رودخانه هریرود (حدفاصل پایین دست سد دوستی و پل خاتون) صید شدند. ژن سیتوکروم بی *Cytb* برای دو نمونه توالی‌یابی شد. با استفاده از توالی‌های حاصله و دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI از اعضای این جنس، درخت‌های تبارشناسی به روش Bayesian inference و تخمین Maximum likelihood ترسیم شد. با توجه به نتایج به دست آمده، زردپَر سرمخروطی گونه مجزا و معتبر از *L. capito* است. زردپَر سرمخروطی در درخت‌های تبارشناسی ترسیم شده در خوشه مجزا از *L. capito* پشتیبانی بالا قرار گرفت، همچنین نتایج هم‌ردیفی ژن *Cytb* این گونه نیز، در ۱۱ جایگاه منحصر به فرد با *L. capito* تفاوت نشان داد. علاوه بر این میانگین فاصله ژنتیکی K2P برای دو گونه زردپَر سرمخروطی و زردپَر سر بزرگ در حدود ۱/۳ درصد به دست آمد که به نظر می‌رسد برای گونه‌های معتبر در جنس *Luciobarbus* فاصله‌ای پذیرفته شده است.

مقدمه

کشور ایران به دلیل قرار گرفتن در محل تلاقی سه ابرومگاه Palearctic, Afrotropic و Indomalaya به عنوان یکی از مناطق خاص جهان با تنوع خیره‌کننده جاندارن شناخته می‌شود (Abell et al., 2008; Coad, 2018; Yousefi et al., 2020). با وجود این که ایران با میانگین بارندگی سالانه کمتر از ۲۵۰ میلی‌متر به عنوان کشوری نیمه‌خشک دسته‌بندی می‌گردد (Javanmard et al., 2010)، اما دارای تنوع بالایی در آبزیان، به‌ویژه ماهیان است (Jouladeh-Roudbar et al., 2015, 2020; Yousefi et al., 2020). در آخرین فهرست به روز شده ماهیان ایران، حضور ۲۶۴ گونه مشتمل بر ۹۷ جنس و ۳۳ خانواده گزارش شده است که از این تعداد ۷۹ گونه بومزاد (Endemic) بوده و صرفاً در کشور ایران یافت می‌شوند (Roudbar et al., 2020).

بیشترین تعداد گونه ماهیان در آب‌های داخلی ایران در حوضه‌هایی یافت می‌شود که دارای ارتباط با دریاها هستند (به عنوان مثال حوضه آبریز کاسپین با ۱۰۶ گونه و تیگریس با ۱۰۳ گونه)، اما حوضه‌های درون‌ریز و ایزوله ایران اغلب از تعداد گونه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hfarahmand@ut.ac.ir

کمتری بهره می‌برند (Coad, 2018; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020). در سالیان اخیر مطالعات نسبتاً جامعی روی فون ماهیان آب‌های داخلی ایران انجام شده است (Freyhof *et al.*, 2014; Freyhof *et al.*, 2016; Ghanavi *et al.*, 2016;) اما به نظر می‌رسد حوضه‌های شرقی ایران چندان دقیق مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2017; etc. احتمالاً دشواری در نمونه‌برداری و قرار گرفتن اغلب رودخانه‌های بزرگ و دائمی این حوضه‌ها در مناطق مرزی (نظیر هریرود و هیرمند) از جمله دلایلی است که باعث شده است فون ماهیان این مناطق کمتر مورد مطالعه و شناخت قرار بگیرند. بر اساس مطالعات Esmaeili و همکاران (2010)، ۱۱ گونه بومی از حوضه آبریز هریرود گزارش شده است؛ اما در آخرین گزارش صورت گرفته این تعداد به ۱۸ گونه رسیده است (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020).

جنس زردپرماهیان *Luciobarbus* متعلق به خانواده کپورماهیان Cyprinidae می‌باشند و در دنیا دارای حدوداً ۵۰ گونه است (Eschmeyer *et al.*, 2018). اعضای این جنس در اروپا، جنوب غرب آسیا و آفریقا پراکنده شده‌اند (Kottelat and Freyhof, 2007). در کشور ایران نه گونه از این جنس یافت می‌شود (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020). ویژگی‌ها ریختی این جنس شامل بدنی استوانه‌ای و فشرده از دو طرف، اندازه متوسط تا خیلی بزرگ، فلس‌های بزرگ تا بسیار کوچک (۱۰۳-۲۶ فلس روی خط جانبی)، فاقد غلاف فلسی (scale sheath) در اطراف مخرج، اغلب دارای دو جفت سیبلیک، لب‌ها اغلب توسعه‌یافته، آخرین شعاع غیرمنشعب باله پشتی به شدت استخوانی و خار مانند با لبه مژرس، معمولاً ۸-۷ شعاع منشعب باله پشتی، باله مخرجی کوتاه، دندان حلقی ۳ ردیفی قاشقی یا قلبی شکل، بدن غالباً به رنگ قهوه‌ای یا کرم بدون لکه‌های تیره (به استثناء *L. subquincunciatus*). لازم به ذکر است تمامی گونه‌های جنس *Luciobarbus* در ایران دارای دو جفت سیبلیک هستند، اما ممکن است در اثر اختلالات ژنتیکی در برخی نمونه‌ها این تعداد کمتر باشد (Kottelat and Freyhof, 2007).

اخیراً گونه *L. conocephalus* (شکل ۲، A) از رودخانه هریرود برای اولین بار گزارش شده است (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020)، اما در مورد اعتبار این گونه تردید وجود دارد زیرا Coad (1995) این گونه را مترادف *L. capito* قرار داده و از درجه اعتبار ساقط نموده است، اگرچه Berg (1949) آن را در حد زیرگونه معتبر می‌داند. با این وجود Jouladeh-Roudbar و همکاران (2020) این گونه را معتبر برشمردند. با توجه به اینکه گونه *L. conocephalus* دارای اندازه بدن بزرگ و جمعیت نسبتاً متوسطی در دریاچه سد دوستی و رودخانه هریرود (در پایین دست سد) است، کمی عجیب به نظر می‌رسد که چرا تا سال ۲۰۲۰ مورد شناسایی و گزارش قرار نگرفته است. در رابطه با عدم گزارش این گونه می‌توان دو فرضیه را مطرح نمود. اول اینکه در دریاچه سد دوستی و رودخانه هریرود سیاه ماهی هراتی *Capoeta heratensis* (شکل ۲، B) نیز به همراه این گونه به صورت هم‌جا (Sympatric) حضور دارد که از لحاظ ظاهری شباهت نسبتاً زیادی (دوجفت سیبلیک و شکل بدن مشابه) به این گونه، به‌ویژه در نمونه‌های تثبیت شده در محلول فرمالین دارد که سبب عدم تشخیص این دو گونه از یکدیگر شده است و دوم اینکه گونه موجود در سد دوستی احتمالاً *L. capito* باشد که صرفاً در سال‌های اخیر به دریاچه سد دوستی معرفی شده است. زیرا پیش‌تر نیز گزارشی از معرفی این گونه به دریاچه سد لتیان وجود داشت (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020).

با توجه به مسائل مطرح شده به نظر می‌رسد در مورد حضور و اعتبار گونه *L. conocephalus* تردید وجود دارد، بنابراین این مطالعه به منظور شناسایی و بررسی وضعیت تبارشناسی گونه *Luciobarbus* موجود در رودخانه هریرود با استفاده از توالی ژن سیتوکروم بی *Cytb* هدف‌گذاری گردید. در مطالعات مختلف با توجه به اندازه بزرگ‌تر ژن سیتوکروم بی (در حدود ۱۱۴۰ جفت باز) نسبت به ژن سیتوکروم اکسیداز COI از این ژن برای بررسی روابط خویشاوندی در میان اعضای جنس *Luciobarbus* استفاده شده است (Machordom and Doadrio, 2001; Tsigenopoulos *et al.*, 2003; Buonerba *et al.*, 2015; Gante *et al.*, 2013)، بنابراین در این مطالعه نیز از این ژن استفاده گردید تا وضعیت آرایه‌شناسی این گونه به شکل مطلوب‌تری بررسی و نتیجه‌گیری در رابطه با آن حاصل گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای انجام این مطالعه در سال ۱۳۹۶ از رودخانه هریرود (شکل ۱)، حد فاصل پایین دست سد دوستی و پل خاتون (Lat: 35.958024°, Long: 61.136302°) با استفاده از دستگاه الکتروفیشر نمونه‌برداری انجام شد. قسمتی از باله سینه‌ای سمت راست بدن دو نمونه در اتانول ۹۶ درصد فیکس و جهت انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه بافته از باله‌ها صورت گرفت (Miller *et al.* 1988). از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی استفاده شد. واکنش PCR: جهت تکثیر ژن *Cytb* از پرایمر رفت ($5'$ -AACCACCGTTGTTATTCAACTACAA- $3'$) و برگشت ($5'$ -AACCTCCGACATCCGGCTTACAAGACCG- $3'$) THR Fish2 R 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 ($MgCl_2$)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر ($dNTPs$ 10 mM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۵ $u/\mu l$) و ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۱/۷ میکرولیتر آب مقطر بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت 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.

توالی‌یابی: پس از اطمینان از تکثیر موفق و بدون آلودگی قطعه مورد نظر ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. قطعه‌های تکثیر شده با استفاده از آغازگر رفت *GluFish F* توالی‌یابی شدند.

آنالیز داده‌ها: توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2020 ویرایش شدند. عملیات یکپارچگی توالی‌های ژن COI با استفاده از CLUSTALW در نرم‌افزار Bioedit انجام شد (Hall *et al.*, 2011). به منظور یافتن توالی‌های مشابه جهت ترسیم درخت تبارشناسی، توالی ویرایش شده با استفاده از جستجوی BLAST در بانک جهانی NCBI با سایر توالی‌های این جنس مقایسه شدند. مدل تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار MrModeltest2 انتخاب شد (Nylander, 2004). بر اساس نتیجه حاصله از این نرم‌افزار، مدل K2+G برای تجزیه و تحلیل پیشنهاد شد. برای ترسیم درخت‌های تبارشناسی از روش inference Bayesian در نرم‌افزار MrBayes v. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) و تکرار ۱۰ میلیون نسل و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML GUI v. 2.0 (Edler *et al.*, 2021) و ۱۰ هزار تکرار استفاده شد. برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی توالی‌های حاصل از روش K2P در نرم‌افزار MEGA v. 7.0 استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016). همچنین برای ترسیم درخت‌های به دست آمده نیز از نرم‌افزار FigTree v. 1.5 استفاده گردید (Rambaut, 2009). گونه *Cyprinus carpio* نیز به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.



شکل ۱. رودخانه هریرود، زیستگاه زردپَر سرمخروطی *L. conocephalus*. مرز بین دو کشور ایران و ترکمنستان.

نتایج

پس از رویت و ویرایش نتایج تعیین توالی ژن سیتوکروم بی *Cytb* در نمونه‌ها، قطعه‌ای به طول حدود ۸۰۰ جفت باز به دست آمد. دو نمونه تعیین توالی شده دارای هاپلوتایپ مشابه بودند، لذا یکی از آن‌ها در ترسیم درخت تبارشناسی مورد استفاده قرار گرفت. پس از ترسیم و مقایسه درخت‌های تبارشناسی با دو روش Maximum likelihood و Bayesian inference به دلیل توپولوژی نسبتاً مشابه صرفاً از درخت BI استفاده شد و نتایج به دست آمده از احتمال پسین (BI posterior probability) و بوت استرپ (ML bootstrap) پیش از هر خوشه درج گردید (شکل ۳). در درخت تبارشناسی ترسیم شده سعی شد حداقل از یک توالی گونه‌های جنس *Luciobarbus* که ژن سیتوکروم بی آن‌ها در بانک ژن NCBI موجود بود، استفاده شود تا بتوان گونه ساکن رودخانه هریرود را با آن‌ها مقایسه و نتیجه‌گیری شفاف‌تری ارائه نمود. با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت‌های تبارشناسی BI و ML گونه ساکن رودخانه هریرود با توالی به شماره دسترسی KP712171 (حوضه دریای آرال) با احتمال پسین ۱ و بوت استرپ ۱۰۰ در یک خوشه و همچنین به صورت خواهری در کنار خوشه *L. capito* (حوضه دریای کاسپین) با احتمال پسین و بوت استرپ کامل قرار گرفتند. علاوه بر این گونه‌های *L. esocinus* و *L. xanthopterus* (حوضه تیگرس) نیز به صورت غیر قابل تفکیک در یک خوشه احتمال پسین و بوت استرپ کامل قرار گرفتند. با توجه به نتایج هم‌دیفی حدود ۸۰۰ جفت باز از ژن *Cytb* گونه *Luciobarbus* رودخانه هریرود با گونه *L. capito*، در ۱۱ جایگاه دارای چندشکلی (Polymorphism) منحصر به فرد است. بر اساس نتایج حاصل، از میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد بررسی جنس *Luciobarbus* کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۵ درصد بین دو گونه *L. guercifensis* و *L. nasus* و بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۱۴/۲



شکل ۲. A: زردپر سرمخروطی *Luciobarbus conocephalus*، صید شده از رودخانه هریرود، پل خاتون، خراسان رضوی؛ B: سیاه ماهی هراتی *Capoeta heratensis*، صید شده از رودخانه کلات، خراسان رضوی

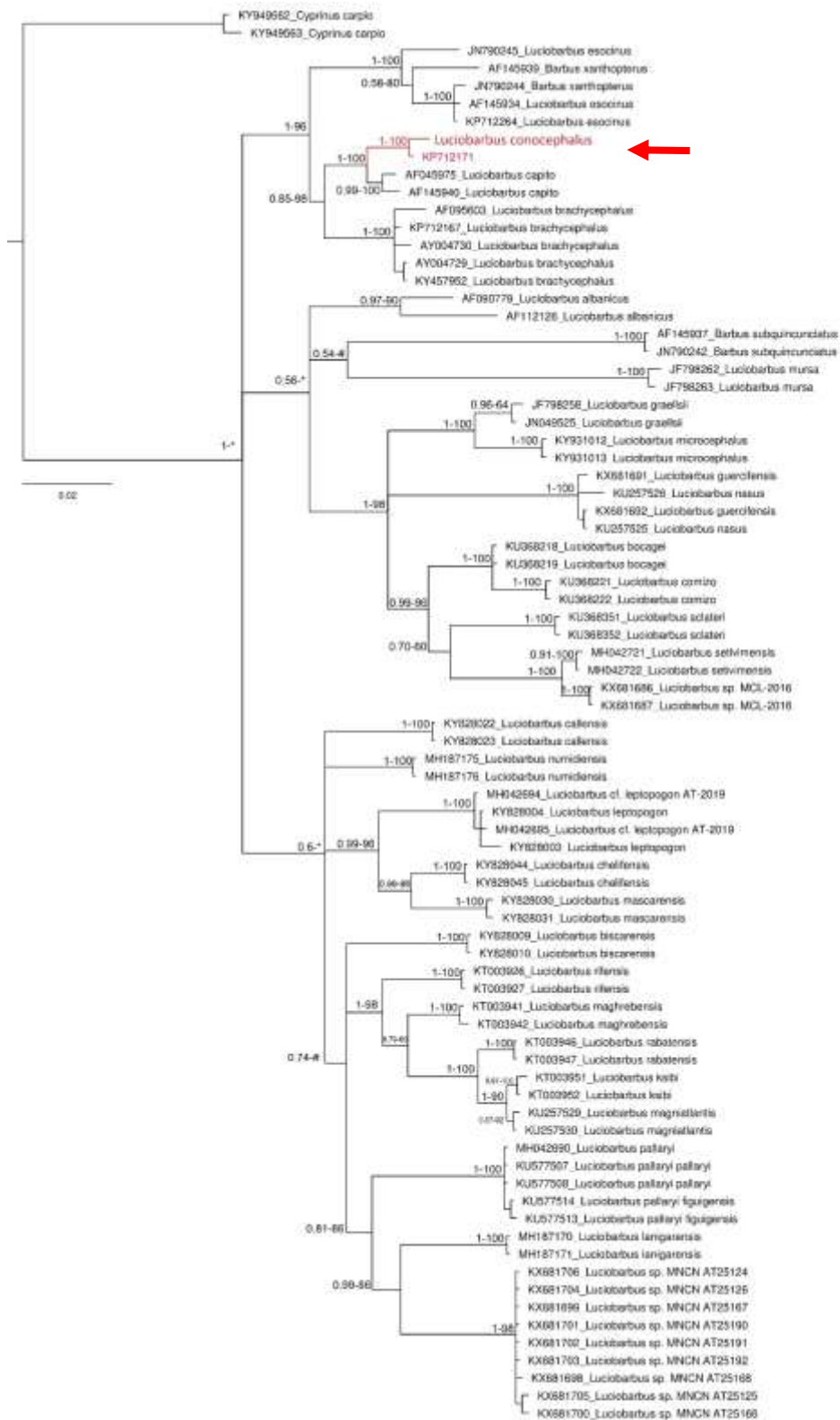
جدول ۱. میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد مطالعه جنس *Luciobarbus* بر اساس درصد تفاوت در ژن *Cytb*.

ردیف	نام تاکسون	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷			
۱	<i>L. bocagei</i>																														
۲	<i>L. brachycephalus</i>	۹/۵																													
۳	<i>L. callensis</i>	۹/۵	۶/۷																												
۴	<i>L. capito</i>	۲/۶	۳/۳	۹/۵																											
۵	<i>L. chelifensis</i>	۲/۶	۷/۶	۴/۵	۹/۷																										
۶	<i>L. comizo</i>	۴/۸	۹/۵	۶/۷	۰/۶	۰/۱																									
۷	<i>L. conocephalus</i>	۸/۶	۶/۵	۵/۱	۶/۵	۲/۳	۷/۶																								
۸	<i>L. esocinus</i>	۰/۴	۸/۶	۷/۶	۵/۳	۸/۶	۳/۴	۸/۶																							
۹	<i>L. graellsii</i>	۷/۷	۰/۷	۴/۵	۸/۸	۳/۷	۹/۹	۵/۸	۳/۴																						
۱۰	<i>L. guercifensis</i>	۶/۴	۷/۵	۱/۵	۳/۴	۰/۶	۴/۵	۶/۷	۰/۶	۳/۴																					
۱۱	<i>L. lanigarensis</i>	۱/۷	۵/۸	۷/۵	۱/۴	۲/۸	۶/۴	۶/۴	۲/۶	۴/۵	۶/۷																				
۱۲	<i>L. leptopogon</i>	۴/۸	۱/۹	۱/۱۱	۰/۹	۸/۶	۲/۱۰	۸/۷	۳/۷	۲/۶	۰/۷	۲/۱۰																			
۱۳	<i>L. maghrebensis</i>	۰/۷	۳/۴	۴/۸	۱/۱۰	۴/۶	۸/۴	۵/۹	۳/۵	۳/۵	۴/۵	۶/۵	۰/۹																		
۱۴	<i>L. magniatlantis</i>	۰/۲	۶/۷	۴/۵	۶/۹	۱/۱۱	۳/۷	۹/۵	۷/۱۰	۴/۶	۴/۶	۹/۵	۷/۶	۱/۱۰																	
۱۵	<i>L. mascarensis</i>	۶/۴	۵/۴	۹/۵	۶/۵	۱/۸	۱/۱۰	۱/۸	۹/۵	۲/۹	۲/۶	۹/۵	۸/۴	۲/۶	۷/۸																
۱۶	<i>L. microcephalus</i>	۵/۱۰	۰/۱۲	۰/۱۱	۴/۱۲	۴/۹	۹/۴	۲/۲	۷/۷	۶/۷	۱/۵	۱/۹	۹/۷	۳/۱۰	۱/۹	۱/۵															
۱۷	<i>L. mursa</i>	۹/۹	۳/۱۰	۹/۱۰	۷/۹	۵/۱۲	۱/۱۰	۱/۸	۳/۹	۳/۹	۱/۸	۲/۹	۱/۱۰	۱/۸	۵/۹	۱/۱۰	۷/۸														
۱۸	<i>L. nasus</i>	۴/۸	۴/۵	۱/۸	۶/۹	۴/۸	۱/۹	۱/۷	۵/۰	۱/۵	۷/۵	۱/۵	۸/۴	۰/۶	۴/۵	۶/۷	۰/۶	۸/۴													
۱۹	<i>L. numidiensis</i>	۷/۵	۲/۹	۷/۸	۰/۴	۶/۴	۵/۳	۹/۵	۳/۴	۷/۵	۷/۸	۹/۴	۸/۳	۷/۶	۸/۴	۳/۴	۰/۴	۳/۷													
۲۰	<i>L. pallaryi</i>	۸/۴	۶/۷	۷/۱۰	۵/۱۰	۹/۵	۹/۴	۳/۴	۹/۷	۱/۵	۶/۷	۲/۱۰	۲/۶	۷/۵	۷/۸	۶/۵	۶/۵	۲/۶	۴/۵	۷/۸											
۲۱	<i>L. rabatensis</i>	۶/۴	۳/۴	۷/۸	۰/۱۰	۷/۱۱	۸/۴	۲/۱	۲/۲	۷/۶	۶/۵	۷/۸	۵/۱۰	۷/۶	۶/۵	۸/۹	۷/۶	۲/۶	۱/۵	۹/۵	۳/۹										
۲۲	<i>L. rifensis</i>	۲/۲	۳/۴	۰/۳	۹/۷	۲/۹	۴/۱۰	۵/۳	۰/۲	۵/۱	۵/۶	۳/۴	۸/۷	۵/۶	۳/۴	۰/۹	۳/۵	۸/۴	۱/۵	۴/۸											
۲۳	<i>L. sclateri</i>	۸/۹	۳/۱۱	۷/۱۰	۷/۸	۲/۶	۷/۱۰	۱/۱۰	۶/۱۱	۸/۹	۳/۱۲	۲/۱۰	۶/۵	۴/۵	۸/۸	۱/۸	۸/۴	۷/۸	۹/۷	۵/۱۰	۳/۷										
۲۴	<i>L. setivimensis</i>	۲/۶	۰/۱۱	۸/۱۰	۸/۱۰	۹/۹	۲/۶	۵/۱۰	۳/۷	۷/۱۰	۳/۱۲	۰/۱۱	۲/۱۱	۸/۱۰	۷/۵	۵/۶	۷/۹	۲/۸	۹/۵	۲/۱۰	۲/۸	۷/۹	۸/۸	۹/۴							
۲۵	<i>L. subquincunciatus</i>	۸/۱۱	۱/۱۱	۵/۱۲	۲/۱۲	۷/۱۱	۷/۱۰	۹/۱۰	۸/۱۲	۳/۱۰	۵/۱۲	۲/۱۳	۵/۱۲	۲/۱۴	۵/۱۰	۳/۱۰	۷/۹	۵/۱۱	۲/۱۰	۲/۱۰	۹/۱۲	۸/۱۰	۱/۱۱	۲/۱۰	۱/۹						
۲۶	<i>L. xanthopterus</i>	۳/۱۰	۷/۹	۱/۹	۳/۷	۹/۷	۸/۶	۷/۵	۱/۷	۲/۱۰	۵/۸	۰/۹	۴/۸	۶/۷	۹/۹	۵/۶	۱/۷	۰/۸	۸/۲	۳/۴	۱/۷	۶/۷	۸/۳	۶/۷	۱/۴	۵/۶					
۲۷	<i>Luciobarbus</i> sp. MMCN	۴/۹	۸/۱۱	۵/۱	۲/۶	۰/۱۱	۴/۱۱	۸/۱۰	۳/۹	۷/۵	۱/۱۱	۸/۶	۷/۱۰	۹/۱۲	۶/۱۱	۷/۱۱	۲/۱۰	۱/۵	۵/۶	۱/۹	۶/۷	۴/۵	۶/۹	۶/۷	۷/۹	۲/۸	۹/۴				
۲۸	<i>Luciobarbus</i> sp. MCL	۱/۱۱	۷/۸	۸/۱۲	۱/۱۱	۰/۱۱	۳/۴	۶/۵	۷/۶	۸/۴	۶/۱۰	۴/۱۱	۷/۲	۴/۵	۸/۴	۶/۴	۹/۵	۴/۸	۵/۱۰	۴/۸	۱/۵	۰/۹	۹/۵	۶/۵	۶/۴	۴/۶	۰/۹				

بین دو گونه *L. subquincunciatus* و *L. leptopogon* به دست آمد (جدول ۱). همچنین کمترین میزان فاصله ژنتیکی برای گونه *L. conocephalus* به میزان ۱/۵ درصد با گونه *L. capito* و بیشترین میزان آن نیز به مقدار ۱۰/۲ با گونه *L. subquincunciatus* محاسبه گردید.

بحث

در گذشته مزیت استفاده از ژن *Cytb* در مطالعات تبارشناسی و آزمودن نظریه‌های زیست جغرافیایی برای جنس *Luciobarbus* به اثبات رسیده است (Zardoya and Doadrio 1998; Tsigenopoulos and Berrebi, 2000; Machordom and Doadrio, 2001; Doadrio et al., 2002). در حالیکه پیش از این تصور می‌شد این جنس باید در دودمان *Barbus* قرار بگیرد، اما مطالعات Tsigenopoulos و همکاران (2003) نشان داد این دودمان مستقل از *Barbus* و تک نیایی (monophyletic) است. در مورد نحوه انتشار اعضای *Luciobarbus* نظریه‌های متفاوتی ارائه شده است، اما اغلب این نظریه‌ها بر انتشار سریع در بین چهار ناحیه اکتیوژئوگرافی (خاورمیانه، شبه جزیره ایبری، شمالغرب آفریقا و یونان) تأکید دارد (Tsigenopoulos et al., 2003). بیشتر گونه‌های *Luciobarbus* می‌توانند با توجه به منشأ جغرافیایی آن‌ها مشخص گردند و به نظر می‌رسد که منشأ و توزیع امروزی آن‌ها تحت تأثیر رویدادهای بزرگ زمینشناختی نظیر بحران شورس مسینین (Messinian salinity crisis) بوده است (Tsigenopoulos and Berrebi, 2000; Machordom and Doadrio, 2001; Doadrio et al., 2002). بیشترین تنوع ژنتیکی در اعضای این جنس در گروه‌های محصور شده جغرافیایی مشاهده می‌شود که



اوراسیا

آفریقا

شکل ۳. درخت تبارشناسی ترسیم شده به روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference. شماره دسترسی نمونه‌ها در بانک NCBI قبل از نام گونه‌ها درج شده است. در شاخه‌هایی که عدد بوت استرپ زیر ۵۰ بوده از علامت * استفاده شده، در صورتی که شاخه در روش ML موجود نبوده روی شاخه علامت # قرار داده شده است.

تنها تکه کوچکی از تنوع ژنتیکی در بین آن‌ها توزیع شده، این مساله به طور کلی به عنوان شاهدهی بر انتشار سریع (Rapid Radiation) اعضای این جنس شناخته می‌شود (Doadrio *et al.*, 1998; Tsigenopoulos and Berrebi, 2000; Tsigenopoulos *et al.*, 2002).

با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی MI و BI گونه‌های اوراسیا و شمال آفریقا در دو خوشه مجزا با پشتوانه بالا قرار گرفته‌اند، پیش از این نیز جدا بودن دودمان گونه‌های آفریقای از گونه‌های اوراسیا در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده بود (Tsigenopoulos *et al.*, 2003). با توجه به نتایج (شکل ۳)، خوشه اوراسیا به چهار خوشه فرعی تقسیم می‌گردد که از این بین سه خوشه بین النهرین (گونه‌های *L. esocinus* و *L. xanthopterus*)، پونتو کاسپین (*L. capito*، *L. brachycephalus* و *L. conocephalus*) و شبیه جزیره ایبری (*L. graelsii*، *L. microcephalus*، *L. guercifencic*، *L. nasus*، *L. bocagei*، *L. setivimensis*، *L. sclateri*، *L. comizo* و *Luciobarbus* sp.) با حمایت بالا حمایت می‌شوند، اما خوشه چهارم (*L. albanticus* و *L. mursa subquincunciatus*) در درخت ترسیم شده فاقد حمایت بالا است. ایجاد پولی‌تومی و دوشاخگی در بررسی روابط تبارشناسی دست کم می‌تواند ناشی از دو مسأله باشد، اول کمبود تاکسون‌های مورد مطالعه و یا عدم کارایی روش تجزیه و تحلیل و دوم همزمانی چندگانه وقایع گونه‌زایی. در گذشته نیز بسیاری از مطالعات در بازسازی تبارشناسی اعضای *Luciobarbus* به این مساله اشاره کرده بودند (Machordom and Doadrio, 2001; Doadrio *et al.*, 2002; Tsigenopoulos *et al.*, 2003; etc).

همانطور که اشاره شد گونه *L. conocephalus* به تازگی از رودخانه هریرود برای اولین بار گزارش شده است (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020) اما در مورد اعتبار این گونه شک و تردید وجود دارد. این گونه در سال ۱۸۷۲ از رودخانه زرافشان در کشور ازبکستان معرفی شد. اما Berg (1949) آن را صرفاً به عنوان زیرگونه معتبر دانست ولی Coad (1995) این گونه را مترادف *L. capito* قرار داده و از درجه اعتبار ساقط نمود. حال می‌توان با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت‌های تبارشناسی و فاصله ژنتیکی K2P ژن‌های سیتوکروم بی، فرضیه مطرح شده در مورد این گونه را پاسخ داد. نتایج این مطالعه نشان داد گونه *L. conocephalus* معتبر و مجزا از *L. capito* است. زیرا در درخت‌های ترسیم شده در خوشه مجزا با حمایت بالا قرار گرفته است، همچنین به طور میانگین در حدود ۱/۳۸ درصد با این گونه فاصله ژنتیکی دارد که در مقایسه با سایر گونه‌های مجاور به نظر فاصله قابل قبولی می‌باشد. پیش از این حداقل وجود پنج گونه مشترک *Alburnoides holciki*، *Gobio nigrescens*، *Paracobitis longicauda* و *Sabanejewia aralensis* (گونه آخر صرفاً در هریرود افغانستان) بین حوضه هریرود و آمودریا به اثبات رسیده بود که این می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط این دو حوضه در گذشته باشد (Coad, 2014; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2016).

زیستگاه طبیعی گونه *L. conocephalus* در ایران رودخانه‌های هریرود و کشف است. در حال حاضر با توجه به خشک‌سالی‌های اخیر، رودخانه کشف خشک و به رودخانه فصلی تبدیل شده است و در مواقعی که در آن آب جریان می‌یابد نیز اغلب به دلیل شوری بالا آبزیان در آن یافت نمی‌شوند. رودخانه هریرود در ایران نیز چندان وضع مناسبی ندارد و پس از طی نمودن چند کیلومتر پس از سد دوستی خشک می‌گردد. بنابراین گستره زیستگاه این گونه در ایران به شدت با کاهش مواجه شده است. در حال حاضر تنها جمعیت در دسترس این گونه در سد دوستی یافت می‌شد که به شدت تحت فشار صید قرار دارد و از جمعیت احتمالی این گونه در افغانستان نیز اطلاعاتی در دسترس نیست.

در آخر باید بیان کرد که زردپر سرمخروطی تنها گونه جنس *Lucobarbus* است که در نیمه شرقی کشور ایران یافت می‌شود. از یک طرف خشک‌سالی و از بین رفتن زیستگاه این گونه و از طرف دیگر صید، باعث کاهش جمعیت آن‌ها شده و احتمالاً در آینده نیز روند کاهش شدیدتر خواهد شد. بنابراین اگر به زودی از طرف سازمان حفاظت محیط زیست مورد حمایت و حفاظت قرار نگیرند، احتمالاً در آینده نه چندان دور شاهد قرار گرفتن زردپر سرمخروطی در زمره گونه‌های در معرض تهدید/خطر خواهیم بود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله از جناب آقای دکتر بوریس لوین (B. Levin) به دلیل در اختیار گذاشتن توالی‌های ژن *Cytb* زردپر سرمخروطی از مکان مرجع (Type locality) این گونه، تشکر می‌نمایند. همچنین نویسندگان از آقای دکتر عدنان شهدادی و سه داور محترم دیگر، به جهت اصلاحات مقاله فوق سپاس‌گذاری می‌نمایند.

منابع

- Abell, R., Thieme M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas, S.C., Bussing, W., Stiassny, M.L.J., Skelton, P., Allen G.R., Unmack, P., Naseka, A., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J.V., Heibel, T.J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H.L., Reis, R.E., Lundberg, J.G., Sabaj Pérez, M.H., Petry, P. 2008. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *Bioscience*. 58: 403-414.
- Berg, L.S. 1949. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, 4th edition. Part 1. Akademia Nauk USSR, Moscow & Leningrad. 466 p.
- Buonerba, L., Pompei, L., Lorenzoni, M. 2013. First record of Iberian barbel *Luciobarbus graellsii* (Steindachner, 1866) in the Tiber River (Central Italy). *BioInvasions Records*. 2(4): 297-301.
- Coad, B.W. 2018. Freshwater fishes of Iran. Available from: <http://www.briancoad.com/SpeciesAccounts/Cyprinidae.IntroductionandAbramis%20to%20Cyprinus.htm#Capoeta>. Accessed 28 August 2014.
- Coad, B.W. 1995. Freshwater fishes of Iran. *Acta scientiarum naturalium. Academiae scientiarum Bohemicae – Brno*. 29(1): 1-64.
- Coad, B.W. 2014. Fishes of Afghanistan. Pensoft. 393 p.
- Doadrio, I., Bouhadad, R., Machordom, A. 1998. Genetic differentiation and biogeography in Saharan populations of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Folia Zoologica Praha*. 47: 7-20.
- Doadrio, I., Carmona, J.A., Machordom, A. 2002. Haplotype diversity and phylogenetic relationships among the Iberian barbels (*Barbus*, Cyprinidae) reveal two evolutionary lineages. *Journal of Heredity*. 93(2): 140-147.
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., Silvestro, D. 2021. raxmlGUI 2.0: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*. 12(2): 373-377.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R., van der Laan, R. 2018. 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
- Esmaili, H.R., Coad, B.W., Gholamifard, A., Nazari, N., Teimori, A. 2010. Annotated checklist of the freshwater fishes of Iran. *Zoosystematica Rossica*. 19: 361-386.
- Freyhof, J., Esmaili, H.R., 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(1): 11-38.
- Freyhof, J., Geiger, M.F., Goltzarianpour, K., Patimar, R. 2016. *Sasanidus*, a new generic name for *Noemacheilus kermanshahensis* Bănărescu & Nalbant, with discussion of *Ilamnemacheilus* and *Schistura* (Teleostei, Nemacheilidae). *Zootaxa*. 4107(1): 65-80.
- Gante, H.F., Doadrio, I., Alves, M.J., Dowling, T.E. 2015. Semi-permeable species boundaries in Iberian barbels (*Barbus* and *Luciobarbus*, Cyprinidae). *BMC Evolutionary Biology*. 15(1): 111-121.
- Ghanavi, H.R., Gonzalez, E.G., Doadrio, I. 2016. Phylogenetic relationships of freshwater fishes of the genus *Capoeta* (Actinopterygii, Cyprinidae) in Iran. *Ecology and Evolution*. 6(22): 8205-8222.
- Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2(1): 60-61.
- Javanmard, S., Yatagai, A., Nodzu, M.I., BodaghJamali, J., Kawamoto, H. 2010. Comparing high-resolution gridded precipitation data with satellite rainfall estimates of TRMM 3B42 over Iran. *Advances in Geosciences*. 25: 119-125.
- Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S., Esmaili, H.R. 2016. First record of the striped bystranka, *Alburnoides taeniatus* (Kessler, 1874) from the Hari River basin, Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 4(5): 788-791.

- Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S., Murillo-Ramos, L., Ghanavi, H.R., Doadrio, I. 2017. Three new species of algae-scraping cyprinid from Tigris River drainage in Iran Teleostei: Cyprinidae. *FishTaxa*. 2(3): 134-155.
- Jouladeh-Roudbar, A., Ghanavi, H.R., Doadrio, I. 2020. Ichthyofauna from Iranian freshwater: Annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment. *Zoological Studies*. 59: 21. doi:10.6620/ZS.2020.59-21.
- Jouladeh-Roudbar, A., Vatandoust, S., Eagderi, S., Jafari-Kenari, S., Mousavi-Sabet, H. 2015. Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. *AAFL Bioflux*. 8(6): 855-909.
- Kottelat, M., Freyhof, J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat. 646 p.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870-1874.
- Machordom, A., Doadrio, I. 2001. Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18(2): 252-263.
- Miller, S.A., Dykes, D., Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215-1215.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Rambaut, A. 2009. FigTree v1. 3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61(3): 539-542.
- Sevilla, R.G., Diez, A., Noren, M., Mouchel, O., Jerome, M., Verrez-Bagnis, V., Van Pelt, H., Favre-Krey, L., Krey, G., Consortium, T.F., Bautista, J.M. 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome *b* and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7(5): 730-734.
- Tsigenopoulos, C.S., Berrebi, P. 2000. Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14(2): 165-179.
- Tsigenopoulos, C.S., Durand, J.D., Ünlü, E., Berrebi, P. 2003. Rapid radiation of the Mediterranean *Luciobarbus* species (Cyprinidae) after the Messinian salinity crisis of the Mediterranean Sea, inferred from mitochondrial phylogenetic analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80 (2): 207-222.
- Tsigenopoulos, C.S., Kotlik, P., Berrebi, P. 2002. Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*. 75(1): 83-99.
- Yousefi, M., Jouladeh-Roudbar, A., Kafash, A. 2020. Using endemic freshwater fishes as proxies of their ecosystems to identify high priority rivers for conservation under climate change. *Ecological Indicators*. 112: 106-137.
- Zardoya, R., Doadrio, I. 1998. Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 265(1403):1365-1372.