

## آرایه شناسی مولکولی و تبارشناسی (*Rutilus s. str.* (Teleostei: Leuciscidae))

### در حوضه جنوبی دریای خزر

آرش جولاده رودبار،<sup>۱</sup> علی نزل آبادی،<sup>۲</sup> امجد نوائیان<sup>۳</sup>

#### چکیده

جنس *Rutilus* یکی از جنس‌های مهم خانواده کپورماهیان سرمخروطی *Leuciscidae* است که اعضای آن از شرق سیبری تا غرب اروپا پراکنده شده‌اند. همواره شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های این جنس به دلیل شباهت‌های بالای ریختی و وجود جمعیت‌های حد واسط برای محققان مشکل ساز بوده است. اگر چه در مطالعات مختلف ویژگی‌های ریختی اعضای این جنس بررسی شده است اما آرایه‌شناسی مولکولی و تبارشناسی اعضای آن در جنوب دریای خزر مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین به منظور بررسی وضعیت اعضای *Rutilus* در جنوب دریای خزر مطالعه‌ای با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی انجام شد. نمونه‌های اعضای این جنس از تور پره مناطق ساحلی شهرهای بندر ترکمن، بندرگز، بابلسر، نور، رامسر، بندر انزلی و آستارا خریداری شد. پس از تکثیر ژن *COI*، قطعه مذکور توالی‌یابی شد. با استفاده از توالی‌های حاصله و دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن *NCBI* درخت‌های تبارشناسی به روش *Bayesian inference*، تخمین *Maximum likelihood* و شبکه‌های پلوتایی ترسیم شد. با توجه به نتایج بدست آمده نمونه‌های تعیین توالی شده از حوضه جنوبی دریای خزر در خوشه *R. frisii* قرار گرفتند. همچنین حضور گونه‌های *R. rutilus* و *R. kutum* در مناطق مورد بررسی تأیید نشد. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار در ژن *COI* و تنوع فنوتیپی بسیار بالا به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از پلاستیسیته اکولوژیک، تحمل درجات مختلفی از شوری، دارا بودن جمعیت‌های ساکن و مهاجر در بین اعضای این جنس باشد.

واژه‌های کلیدی: ایران، فاصله ژنتیکی، فنوتیپ، کپورماهیان، *COI*

۱. دانش‌آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

( نویسنده مسئول: [jouladehroudbar@ut.ac.ir](mailto:jouladehroudbar@ut.ac.ir) )

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره)، تهران، ایران

## مقدمه

خانواده کپورماهیان سر مخروطی Leuciscidae با دارا بودن ۱۴ جنس و ۴۱ گونه معتبر در حدود ۱۵ درصد از فون ماهیان آب‌های داخلی ایران را تشکیل می‌دهد (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015; 2020). جنس *Rutilus* یکی از جنس‌های اقتصادی این خانواده است که در حال حاضر دارای ۱۰ گونه معتبر بوده و اعضای آن در سراسر اوراسیا، در آب‌های شور، لب شور و شیرین یافت می‌شود (Eschmeyer *et al.*, 2018; Coad, 2018; Levin *et al.*, 2017). گستره جغرافیایی تحت اشغال این گونه از شرق سبیری شروع شده و تا غرب اروپا ادامه پیدا می‌کند (Kottelat & Freyhof, 2007; Ketmaier *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2017).

حداقل شش گونه از این جنس در حوضه‌های دریای سیاه-آزوف، کاسپین، آرال و اقیانوس منجمد شمالی توصیف شده است. اعتبار این گونه‌ها اغلب در مطالعات مختلف به چالش کشیده شده و مورد بحث بوده است (Reshetnikov *et al.*, 2003; Mina *et al.*, 2006; Kottelat & Freyhof, 2007; Coad, 2018; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020). از طرفی دیگر ساختار جمعیتی گونه‌های پونتو-کاسپین کاملاً پیچیده بوده و اغلب آن‌ها دارای جمعیت‌های ساکن و یا رود کوچ (anadromous) هستند که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوضه دریای سیاه، آزوف، آرال و کاسپین وارد می‌شوند (Levin *et al.*, 2017). به طور سنتی جمعیت غیر مهاجر به عنوان *R. rutilus* شناخته شده است (Levin *et al.*, 2017; Coad, 2018). اخیراً مطالعات نسبتاً جامع و کاملی در ارتباط با فیلوژنی مولکولی و فیلوژئوگرافی این جنس در گستره زیستی آن صورت گرفته است که نتایج قابل تأملی از وضعیت آرایه‌شناسی اعضای این جنس در اورا سیارائه می‌دهد (Ketmaier *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2017). بر اساس نتایج ارائه شده سه دودمان اصلی از جنس *Rutilus* شناسایی شده است. ۱- دودمان *R. frisii*، ۲- *Rutilus rutilus s. str.* و ۳- گروه گونه‌هایی که در دریای آنگان، کاسپین، سیاه-آزوف و آرال، آب‌های داخلی آسیای مرکزی، رودخانه‌های سبیری و اقیانوس منجمد شمالی پراکنده شده‌اند. بر اساس نتایج بدست آمده از تعیین توالی ژن *Cytb* دسته سوم اختلاف ژنتیکی معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین گونه‌های *R. schelkovnikovi*، *R. r. aralensis*، *stoumboudae* از درجه اعتبار ساقط و مترادف *Rutilus rutilus* قرار گرفتند.

بر اساس مطالعات مختلف تاکنون تاکسون‌های *Rutilus caspicus* (Yakovlev 1870)، *Rutilus lacustris* (Pallas 1814)، *Rutilus rutilus* (Linnaeus 1758) *lutum* Kamenskii, 1901، *R. r. caspius* و *R. r. caspius natio kurensis* Berg 1932، *natio knipowitschi* Pravdin 1927 از دریای کاسپین و رودخانه‌های منتهی به آن گزارش شده است (Bogutskaya & Naseka, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007; Coad 2018; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020).

اغلب این تاکسون‌ها از لحاظ ریختی دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند که باعث شده شناسایی و تفکیک آن‌ها را با مشکل مواجه کند (Berg 1949; Abdolhay *et al.*, 2010; Kashefi *et al.*, 2012; Kohestan-Eskandari *et al.*, 2014). علی‌رغم اینکه جمعیت‌های این جنس در مطالعات مختلف از لحاظ ریختی بررسی و مطالعه شده‌اند اما در مورد وضعیت آرایه‌شناسی آن‌ها در حوضه جنوبی دریای کاسپین مطالعه‌ای صورت نگرفته و مشخص نیست کدام تاکسون یا تاکسون‌های نامبرده شده معتبر بوده و در قسمت‌های جنوبی یافت می‌شوند. لذا این مطالعه به منظور بررسی وضعیت آرایه‌شناسی و تبارشناسی این جنس در جنوب دریای کاسپین برای روشن شدن وضعیت نمایندگان آن با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز سی هدف گذاری شد.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** برای انجام این تحقیق در خلال سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸ نمونه‌های بالغ با ویژگی ریختی متفاوت شامل تعداد فلس روی خط جانبی، شعاع باله پشتی، شعاع باله سینه‌ای، خار آبششی و رنگ بدن، از جنس *Rutilus* از مناطق ساحلی شهرهای بندرترکمن (۲ نمونه)، بندرگز (۲ نمونه)، بابلسر (۱ نمونه)، نور (۳ نمونه)، رامسر (۳ نمونه)، محمود آباد (۳ نمونه)، بندر انزلی (۳ نمونه) و آستارا (۳ نمونه) از صیادان تور پره خریداری شد (جدول ۱ و شکل ۱). قسمتی از باله سینه‌ای سمت راست بدن نمونه‌های خریداری شده در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و جهت انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

جدول ۱- ویژگی‌های ریختی نمونه‌های مورد مطالعه در هر ایستگاه

ردیف	محل صید	شعاع باله پشتی	شعاع باله سینه‌ای	فلس روی خط جانبی	خار آبششی	رنگ بدن
۱	بندرترکمن	۹	۱۴	۴۷	۱۴	کرم
۲		۹	۱۹	۴۸	۱۴	نقره‌ای
۳	بندرگز	۱۰	۱۵	۵۴	۱۱	نقره‌ای-طلایی
۴		۹	۱۴	۵۱	۱۵	نقره‌ای
۵	بابلسر	۸	۱۸	۴۹	۱۳	نقره‌ای-طلایی
۶	نور	۱۰	۱۹	۵۳	۱۴	نقره‌ای-طلایی
۷		۱۰	۱۷	۵۰	۱۴	کرم
۸	رامسر	۱۰	۱۴	۵۲	۱۲	کرم
۹		۹	۱۵	۵۰	۱۱	کرم
۱۰	محمود آباد	۹	۱۹	۴۹	۱۴	کرم
۱۱		۸	۱۸	۵۳	۱۴	نقره‌ای
۱۲	محمود آباد	۱۰	۱۸	۵۸	۱۳	نقره‌ای-طلایی
۱۳		۹	۱۸	۴۸	۱۱	کرم
۱۴	بندر انزلی	۹	۱۶	۵۸	۱۵	نقره‌ای
۱۵		۹	۱۷	۴۶	۱۱	کرم
۱۶	بندر انزلی	۱۰	۱۹	۵۴	۱۳	کرم
۱۷		۹	۱۹	۵۵	۱۲	نقره‌ای
۱۸	آستارا	۸	۱۵	۵۴	۱۲	نقره‌ای
۱۹		۹	۱۴	۴۹	۱۴	نقره‌ای-طلایی
۲۰	آستارا	۱۰	۱۵	۴۹	۱۲	نقره‌ای



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه برداری؛ ۱- بندر ترکمن، ۲- بندرگز، ۳- بابلسر، ۴- نور، ۵- رامسر، ۶- بندر انزلی و ۷- آستارا.

**استخراج DNA:** پس از تبخیر الکل از باله‌های تثبیت شده، قسمتی از باله، در آب مقطر هموژن شد، سپس با استفاده از کیت شرکت BIO-RAD استخراج DNA انجام شد. برای اطمینان حاصل کردن از کیفیت و کمیت DNA های استخراجی از روش های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز ۰/۷ درصد به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد.

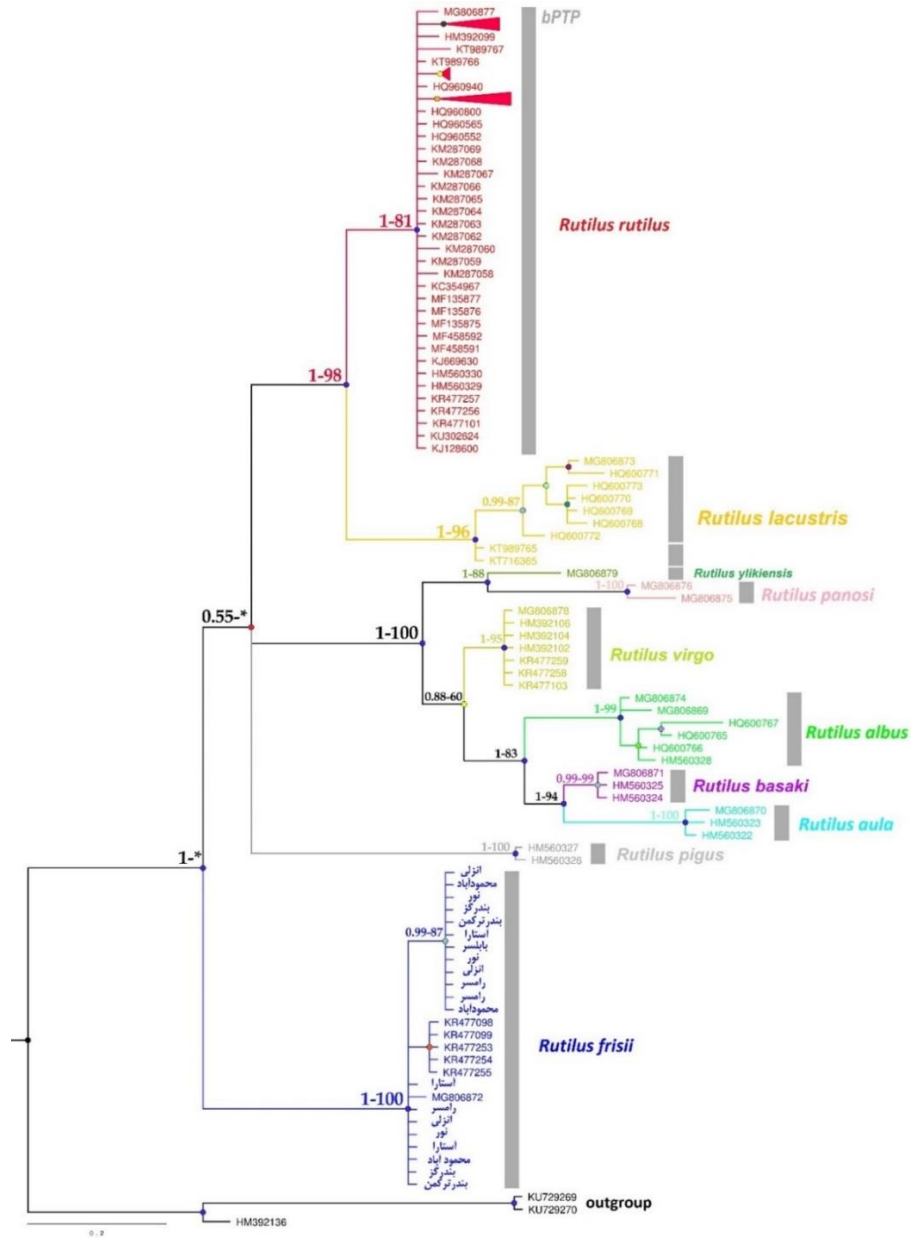
**واکنش PCR:** برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز سی میتوکندریایی نمونه ها از آغازگر رفت (5'-FishF1-3') و برگشت (3'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-5'-FishR1) استفاده شد (Ward *et al.* 2005). حجم واکنش نهایی PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که از مقدار شش میکرولیتر بافر 10X، ۳ میکرولیتر منیزیم کلرید (MgCl<sub>2</sub>)، دو میکرولیتر پرایمر رفت و دو میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر dNTPs (10 mM)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم تک پلیمرز (۵ u/μl) و ۲ میکرولیتر DNA الگو بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، به دنبال آن سی و چهار چرخه (واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۷ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر موفق ناحیه COI پنج میکرولیتر از محصول PCR همراه با Dye رنگ آمیزی روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و سپس الکتروفورز شد و در ادامه در معرض تابش نور U.V قرار داده شد.

**توالی‌یابی:** پس از حصول اطمینان از تکثیر موفق و بدون آلودگی قطعه مورد نظر ۲۵ میکرولیتر از محصول PCR توسط کیت خالص سازی شرکت ماکروژن (MacroGen, Korea) خالص سازی و جهت توالی‌یابی به همان شرکت ارسال شد. قطعه تکثیر شده با استفاده از پرایمر FishR1 توالی‌یابی شدند.

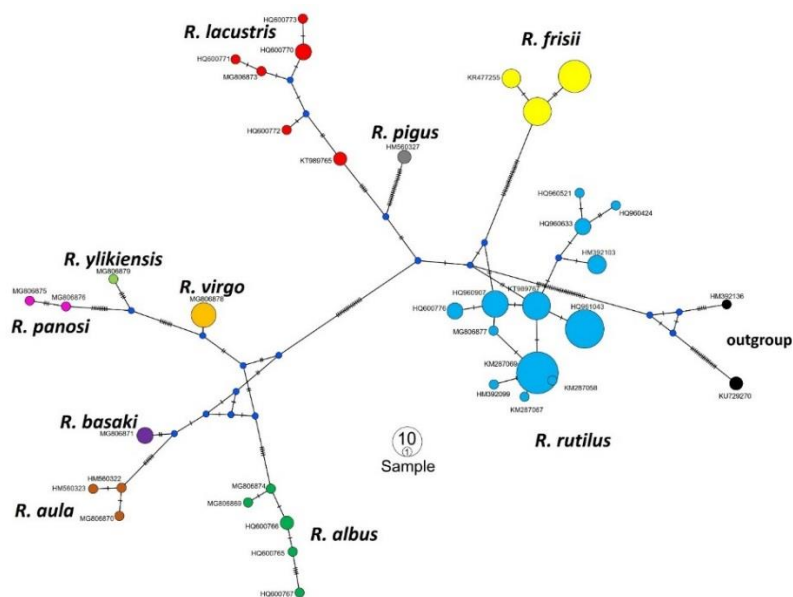
**آنالیز داده‌ها:** توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2020 ویرایش شدند. عملیات یکپارچه‌سازی توالی‌های ژن COI با استفاده از ClustalW multiple alignment در نرم‌افزار BioEdit v. 7.2.5 انجام شد (Hall 1999). به منظور یافتن توالی‌های مشابه جهت ترسیم درخت تبارشناسی، توالی ویرایش شده با استفاده از جستجوی BLAST در بانک جهانی NCBI با سایر توالی‌های این جنس مقایسه شدند. مدل تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار jModelTest انتخاب شد (Darriba et al. 2012). براساس نتیجه حاصله از این نرم‌افزار، مدل T92+G برای تجزیه و تحلیل پیشنهاد شد. برای ترسیم درخت‌های تبارشناسی از روش Bayesian inference در نرم‌افزار MrBayes v. 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) و تکرار ۵ میلیون نسل و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML GUI v. 2.0 (Silvestro & Michalak, 2012) و ۵ هزار تکرار استفاده شد. برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی توالی‌های حاصله از روش K2P در نرم‌افزار MEGA v. 7.0 استفاده شد (Kumar et al. 2016). همچنین برای ترسیم درخت‌های بدست آمده نیز از نرم‌افزار FigTree v. 1.5 استفاده گردید (Rambaut 2009). برای تجزیه و تحلیل مرزبندی گونه‌ای از روش bPTP و تعداد ۲۰۰ هزار نسل استفاده شد. برای ترسیم شبکه هاپلوتایپی نیز از نرم‌افزار PopART v. 1.7 استفاده شد. گونه *Squalius cephalus* نیز به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد.

## نتایج

پس از دریافت نتایج تعیین توالی از شرکت ماکروژن و تصحیح آن‌ها، ۶۳۰ جفت باز از ۲۰ نمونه برای آنالیز بدست آمد. علاوه بر این ۱۱۲ توالی دیگر اعضاء این جنس از بانک جهانی NCBI استخراج شد و با توالی‌های فوق هم‌مردیف شدند که در نتیجه از مجموع ۶۳۰ جفت باز، ۱۲۳ جایگاه دارای چند شکلی (پلی مورفیسم) و ۵۰۷ جایگاه ثابت و فاقد چند شکلی (مونومورفیسم) بودند. همچنین از ۶۳۰ باز مورد بررسی ۱۰۸ جایگاه به عنوان Parsim-informative شناسایی شد. پس از ترسیم درخت‌های تبارشناسی Maximum likelihood و Bayesian inference مشخص گردید که دارای شکل مشابهی هستند. بنابراین درخت BI انتخاب، اعداد احتمال پسین (BI posterior probability) و بوت استرپ (ML bootstrap) حاصله پیش از هر گره درج گردید (شکل ۲). با توجه به نتایج حاصله از درخت‌های تبارشناسی، ۱۰ گونه *R. albus*، *R. virgo*، *R. panosi*، *R. ylikiensis*، *R. lacustiris*، *R. rutilus*، *R. frisia* و *R. pigu*، *R. aula*، *R. basaki* در خوشه‌های مجزا که با میزان بالای BI و ML قرار گرفتند. همچنین نتایج مرزبندی گونه‌های bPTP نیز برای تمامی خوشه‌های ذکر شده گونه واحد بود اما برای خوشه *R. lacustiris* دو گونه پیش بینی شد. علاوه بر این نتایج تحلیل بازهای توالی‌های بررسی شده نشان داد ترکیب باز تیمین ۳۰/۲ درصد، آدنین ۲۴/۸ درصد، گوانین ۱۹/۵ درصد و سیتوزین ۲۵/۶ درصد است. همچنین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌های جنس *Rutilus* مورد تجزیه و تحلیل در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۳/۲۰ بین دو گونه *R. albus* و *R. panosi* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۸۲ بین دو گونه *R. aula* و *R. basaki* است (جدول ۲). همچنین فاصله درون گونه‌ای برای *R. frisia* به میزان ۰/۰۳ درصد، *R. rutilus* ۰/۱۶ درصد، *R. panosi* ۰/۲۷ درصد، *R. albus* ۰/۲۵ و *R. lacustris* ۰/۲۰ درصد محاسبه شد. شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده نیز در شکل ۳ به نمایش درآمده است.



شکل ۲- درخت تبارشناسی ترسیم شده به روش Maximum likelihood و Bayesian inference. شماره دسترسی نمونه‌های استفاده شده از بانک NCBI در مقابل خوشه‌ها درج شده است، شاخه‌هایی که در درخت ML وجود نداشتند با علامت \* مشخص شده است. نتایج مرزبندی گونه‌ای bPTP نیز به نوار خاکستری رنگ به نمایش درآمده است.



شکل ۳- شبکه هاپلو تایی ترسیم شده اعضای جنس *Rutilus* با استفاده از توالی‌های COI مورد بررسی در این مطالعه.



شکل ۴- نمای جانبی ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii* صیدشده از سواحل مابین بابلسر و فریدونکنار



شکل ۵- نمای جانبی ماهی کلمه *Rutilus lacustris* صید شده از رودخانه ارس

جدول ۲- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد بررسی جنس *Rutilus* بر اساس درصد تفاوت در ژن COI.

ردیف	گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱	<i>R. frisii</i>										
۲	<i>R. rutilus</i>	۲/۲۸									
۳	<i>R. ylikiensis</i>	۲/۸۱	۲/۵۹								
۴	<i>R. virgo</i>	۲/۶۱	۲/۳۹	۰/۹۱							
۵	<i>R. panosi</i>	۲/۸۵	۲/۶۹	۱/۲۴	۱/۶۳						
۶	<i>R. albus</i>	۳/۰۸	۲/۷۳	۱/۸۶	۱/۰۹	۲/۵۳					
۷	<i>R. lacustris</i>	۲/۴۷	۱/۲۴	۲/۷۷	۲/۵۷	۲/۸۱	۲/۹۴				
۸	<i>R. basaki</i>	۳/۰۳	۲/۵۰	۱/۴۹	۰/۹۲	۲/۲۲	۱/۰۸	۲/۷۸			
۹	<i>R. aula</i>	۳/۱۳	۲/۴۹	۱/۹۷	۱/۳۹	۲/۵۱	۱/۵۳	۲/۸۸	۰/۸۲		
۱۰	<i>R. pingus</i>	۲/۶۵	۲/۴۵	۲/۹۵	۲/۷۶	۳/۰۰	۳/۲۰	۲/۴۵	۳/۱۸	۳/۰۸	
۱۱	برون گروه	۴/۲۴	۴/۲۷	۴/۴۰	۴/۷۳	۴/۶۰	۴/۷۸	۴/۲۰	۴/۸۱	۴/۸۱	۴/۷۰

### بحث و نتیجه گیری

همانطور که اشاره شد تاکنون تاکسون تاکسون‌های *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870) *Rutilus lacustris* (Pallas 1814) *R. r. caspius* و *R. r. caspius natio kurensis* Berg, 1932 *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) *Rutilus kutum* Kamenskii, 1901 Bogutskaya & Naseka, 2004; Kottelat & Freyhof, 2007; ) از کشور ایران گزارش شده است (Coad, 2018; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020). با توجه به نتایج بدست آمده از ترسیم درخت‌های تبارشناسی ML و BI، مرزبندی گونه‌ای bPTP و همچنین میانگین فاصله ژنتیکی K2P نشان داد جمعیت‌های ساکن حوضه جنوبی دریای خزر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارد (جدول ۲ و شکل ۲). گواه این مسأله فاصله درون جمعیتی بسیار اندک (۰/۰۳ درصد) در بین نمونه‌های بررسی شده است. با توجه به نتایج درخت‌های تبارشناسی ترسیم شده، اعتبار سه گونه *R. rutilus*، *R. frisii* (شکل ۴)، *R. lacustris* (شکل ۵) و از حوضه دریای کاسپین به نظر قابل تأیید است. همچنین تمامی نمونه‌های تعیین توالی شده از حوضه جنوبی دریای خزر با ساپورت بالا در خوشه *R. frisii* قرار گرفته‌اند. علاوه بر این توالی هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی، حضور گونه *R. rutilus* را در مناطق نمونه‌برداری شده در حوضه جنوبی دریای خزر تأیید نکرد. پیش از این نیز در مطالعه‌ای مشابه Levin و همکاران (2017) حضور گونه دیگر از جنس *Rutilus* را تأیید نکرده بودند.

همانطور که اشاره شد در مطالعات مختلف به تنوع ریختی بالای اعضای جنس *Rutilus* در حوضه جنوبی دریای خزر اشاره شده است (Abdolhay *et al.*, 2010; Kashefi *et al.*, 2012; Kohestan-Eskandari *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد این تنوع فنوتیپی بسیار بالا ناشی از پلاستیسیته اکولوژیک، تحمل درجات مختلفی از شوری است و دارا بودن جمعیت‌های ساکن و مهاجر باعث



ایجاد جمعیت های مختلف با ویژگی های متفاوت در بین اعضای جنس *Rutilus* در حوضه هایی مانند پونتو-کاسپین گردیده است (Reshetnikov *et al.*, 2003; Bogutskaya & Naseka, 2004; Mina *et al.*, 2006; Kottelat & Freyhof, 2007; Levin, 2017).

پس از بررسی نتایج این مطالعه و مقایسه آن با نتایج دیگر مطالعات ریخت سنجی جمعیت های جنس *Rutilus* این سوال به ذهن می رسد، که علت اختلاف زیاد در ویژگی های ریختی و عدم اختلاف در ژنوم میتوکندریایی اعضای این جنس چیست؟ به نظر می رسد تغییرات فنوتیپی اعضای این جنس ممکن است در خلال مراحل تکامل لاروی در آب شیرین، لب شور و یا شور اتفاق بیافتد. به عنوان مثال در برخی مطالعات تغییرات سریع فنوتیپی در هنگام معرفی جمعیت ساکن آب شیرین به دریاچه های لب شور گزارش شده که باعث ایجاد ویژگی های فنوتیپی مشابه جمعیت های مهاجر گردیده است (Kozhara & Mironovsky, 1995; Kozhara, 1997; Levin 2017). یکی از مواردی که به نظر می رسد به عنوان یکی از علل اصلی نمود تغییرات فنوتیپی در جمعیت های مهاجر و یا ساکن این جنس با شد فرآیند استخوان سازی درون غشایی (Intramembranous ossification) است. با توجه به اینکه محیط یونی آب شیرین و دریا با یکدیگر کاملاً متفاوت است به نظر می رسد ظرفیت معدنی شدن (mineralization) اندام های ماهیان می تواند تحت تاثیر این محیط قرار بگیرد. استخوانی شدن با دریافت مواد معدنی محیطی مقدمه تشکیل بسیاری از استخوان ها در بدن ماهیان است (Brighton & Hunt, 1991).

یکی دیگر از مواردی که می تواند توجیه کننده عدم وجود اختلاف ژنتیکی در ژن COI بین جمعیت های *Rutilus* باشد وجود منشأ اکولوژیک برای جمعیت های آن است (Levin *et al.*, 2017). با توجه به نتایج حاصله از ترسیم شبکه هاپلوتایپی دو گونه *R. rutilus* و *R. frisii* دارای تعداد نسبتاً بالای هاپلوتایپ بودند. به نظر می رسد وجود هاپلوتایپ های متفاوت ساکن دریای سیاه و کاسپین می تواند به علت قرار گرفتن جغرافیای پونتوکاسپین به عنوان یک دیرینه-پناهگاه (palaeorefugium) برای اعضای این جنس برای گذر از دوران یخبندان و احتمالاً گسترش مجدد در پسایخبندان باشد. در مطالعات متفاوتی از این منطقه به عنوان یک پناهگاه مهم برای جانداران اورا سیاه در دوره های متفاوت یخبندان یاد شده است (Bernatchez, 2001; Kotlik *et al.*, 2004; Culling *et al.*, 2006; Hänfling *et al.*, 2009; Timoshkina *et al.*, 2009). از طرفی برخی گونه های این جنس (*R. basaki* و *R. virgo*) دارای تعداد اندکی هاپلوتایپ بودند. وجود تعداد کم هاپلوتایپ می تواند نشان دهنده کلونیزه شدن جمعیت فعلی به وسیله والدینی تحت تاثیر عواملی مانند اثر بنیانگذار (founder effect) باشد (Levin *et al.*, 2017).

در مجموع با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه اختلاف معنی داری را در بین جمعیت های مورد بررسی در جنوب دریای کاسپین نشان نداد. بنابراین بر اساس تقدم در نام گذاری پیشنهاد می گردد گونه *R. frisii* به عنوان گونه معتبر در نظر گرفته شده و دیگر تاکسون های نامبرده شده به عنوان مترادف آن در نظر گرفته شوند. البته پیشنهاد فوق بر اساس نتایج تعیین توالی ژن میتوکندریایی COI ارائه شد، بنابراین پیشنهاد می گردد برای بهتر مشخص شدن وضعیت آرایه شناختی اعضای این جنس از ژن های هسته ای نیز استفاده شود تا بتوان نتیجه گیری کامل تری ارائه نمود.

## منابع

- Abdolhay, H.A. Khalijah, D.S. Pourkazemi, M. Shapor, S.S. Rezvani, S. Satar, M.K. and Hosseinzadeh Sahafi, H. (2010) Morphometrics studies of Mahisefid (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) from selected rivers in the southern Caspian Sea. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 9: 1-18
- Berg, L.S. (1949) Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries, 4th edition. Part 1. Akademia Nauk USSR, Moscow and Leningrad. 466 p.
- Bernatchez, L. (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution. 55: 351–379.
- Bogutskaya, N.G. and Naseka, A.M. (2004) Catalogue of Agnathans and Fishes of Fresh and Brackish Waters of Russia with Comments on Nomenclature and Taxonomy. The Russian Academy of Sciences, Moscow.
- Brighton, C.T. and Hunt, R.M. (1991) Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. Journal of Bone and Joint Surgery. 73: 832-847.
- Coad, B.W. (2018) Freshwater Fishes of Iran Updated 2 May 2018. [Cited 2 May 2018]. Available from: [www.briancoad.com](http://www.briancoad.com).
- Culling, M.A. Janko, K. Boron, A. Vasil'ev, V.P. and Hewitt, G.M. (2006) European colonization by the spined loach (*Cobitis taenia*) from Ponto- Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation. Molecular ecology. 15: 173-190.
- Darriba, D. Taboada, G.L. Doallo, R. and Posada, D. J. (2012) 2: More models, new heuristics and high-performance computing. Nature Methods. 9: 772.
- Eschmeyer, W.N. Fricke, and 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
- Hall, T. A. (1999) "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Hänfling, B. Dümpelmann, C. Bogutskaya, N.G Brandl, R. and Brändle, M. (2009) Shallow phylogeographic structuring of *Vimba vimba* across Europe suggests two distinct refugia during the last glaciation. Journal of Fish Biology. 75: 2269-2286.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics. 17: 754-755.
- Jouladeh-Roudbar, A. Vatandoust, S. Eagderi, S. Jafari-Kenari, and S., Mousavi-Sabet, H. (2015). Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation. 8: 855-909
- Jouladeh-Roudbar, A. Ghanavi, H.R. and Doadrio, I. (2020) Ichthyofauna from Iranian freshwater: annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment, Zoological Studies. 59: 0d
- Kashefi, P. Bani, A. and Ebrahimi, E. (2012) Morphometric and meristic variations between non-reproductive and reproductive kutum females (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901), in the southwest Caspian Sea. Italian journal of zoology. 79: 337-343.

- Ketmaier, V. Bianco, P.G. and Durand, J.D. (2008) Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 362–367.
- Kohestan-Eskandari, S. Anvarifar, H. Mousavi-Sabet, H. Yousefi, M. and Khanzade, M. (2014) A morphology-based hypothesis for homeward migration success and population differentiation in the anadromous kutum *Rutilus kutum* (Pisces: Cyprinidae) along the southern Caspian Sea, Iran. *Folia Zoologica*. 63: 151-160.
- Kotlík, P. Markov, A. S. Choleva, L. Bogutskaya, N.G. Ekmekci, F.G. and Ivanova, P.P. (2008) Divergence with gene flow between Ponto- Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frisii* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular ecology*. 17: 1076-1088.
- Kottelat, M. and Freyhof, J. (2007) Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat 646 p.
- Kozhara, A.V. (1997). Regular phenotypic changes accompanying osmotic adaptations in some cyprinids: micro vs macroevolution. *Zhurnal obshchei biologii*. 58: 17–26.
- Kozhara, A. V. and Mironovsky, A. N. (1995). Selection for tolerance to the increased mineralization—a possible factor of intraspecific divergence in the bream (*Abramis brama* (L), Cypriniformes, Cyprinidae) from the Caspian Sea drainage. *Zhurnal Obshchei Biologii*. 56: 239–247.
- Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 33: 1870-1874.
- Levin, B.A. Simonov, E.P. Ermakov, O.A. Levina, M.A. Interesova, E.A. Kovalchuk, O.M. Malinina, Y.A. Mamilov, N.S. Mustafayev, N.J. Pilin, D.V. Pozdeev, I.V. and Pozdeev, I.V. (2017) Phylogeny and phylogeography of the roaches, genus *Rutilus* (Cyprinidae), at the Eastern part of its range as inferred from mtDNA analysis. *Hydrobiologia*. 788: 33-46.
- Mina, M.V. Reshetnikov, Y.S. and Dgebuadze, Y.Y. (2006) Taxonomic novelties and problems for users. *Journal of Ichthyology*. 46: 476-480.
- Rambaut, A. (2009) FigTree v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Reshetnikov, Y.S. Popova, O.A. and Sokolov, L.I. (2003) Atlas of Russian Freshwater Fishes, Vol. 1. Nauka, Moscow.
- Silvestro, D. Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAXML. *Organisms Diversity and Evolution*. 12: 335-337.
- Timoshkina, N.N. Barmintseva, A.E. Usatov, A.V. and Muge, N.S. (2009) Intraspecific genetic polymorphism of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Russian Journal of Genetics*. 45: 1098-1106.
- Ward, R.D. Zemiak, T.S. Innes, B.H. Last, P.R. and Hebert, P.D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360:1847–1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716.

## Molecular systematics and phylogeny of *Rutilus* s. str. (Teleostei: Leuciscidae) at the southern part of Caspian Sea

Received: 2021.11.6

Accepted: 2022.2.7

### Abstract

*Rutilus* is one of the most important genera of the Leuciscidae family, whose members are distributed from Eastern Siberia to Western Europe. Due to the similarity of morphologic characters and the existence of intermediate populations, it has always been difficult for researchers to identify the species and populations of this genus. Although several studies have been conducted based on morphological characters of members of this genus, the molecular systematics and phylogeny of *Rutilus* in the southern Caspian Sea have not been studied. A study was performed by using the COI gene sequence to investigate the status of *Rutilus* members in the southern Caspian Sea. Samples of members of this genus were purchased from the beaches of Bandar-e-Turkmen, Bandar-e-Gaz, Babolsar, Nour, Ramsar, Bandar-e-Anzali, and Astara. After amplifying the COI gene, the fragment was sequenced. Using the sequence results and other sequences in the NCBI gene bank, phylogeny trees were plotted by the Bayesian inference method, Maximum likelihood estimation, and haplotype network. The sequenced specimens from the southern basin of the Caspian Sea were placed in the *R. frisii* clade. Also, the presence of *R. rutilus* and *R. kutum* species in the studied areas was not confirmed. Due to the insignificant difference in COI gene and phenotypic diversity, it seems the differences are due to ecological plasticity, tolerance to salted waters coupled with degrees of salinity, and having resident and migratory populations among members of this genus.

**Keywords:** *Carps, COI, Genetic distance, Phenotype, Iran*

---

1. PhD student, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Master's student, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran ( \*Corresponding Author: jouladehroudbar@ut.ac.ir)
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Yadgar Imam (RA), Tehran, Iran