Nova Biologica Reperta 7(1): 1-8 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.1.1

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۱، صفحات ۱ الی ۸ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

بررسی ارتباط ماهیان کور غار لرستان (*Garra thyphlops* و *Garra lorestanensis*) و جمعیت‌های ماهی گلچراغ (*Garra gymnothorax*) در حوضه‌های دز و کرخه

ایرج هاشم زاده سقرلو[۱]، سیده نرجس طباطبایی[۲]، نبی‌ا... قائدرحمتی[۳]، محسن امیری[۳] و لوئیس برناتچز[۴]

[۱] گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲] گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران؛ [۳] اداره کل حفاظت محیط زیست استان لرستان، لرستان، ایران؛[۴] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لاوال، کبک، کانادا
مسئول مکاتبات: ایرج هاشم‌زاده سقرلو، ihashem@nres.sku.ac.ir

چکیده. غار محل زیست ماهیان کور لرستان در حوضه رود دز در مجاورت رودخانه سزار در منطقه‌ای با ساختار کارستی قرار گرفته است. در مجاورت رودخانه سزار در دیواره‌های دره رودخانه چشمه‌هایی وجود دارد که ممکن است امکان ورود ماهیان رودخانه‌ای را به داخل منابع آب زیرزمینی فراهم کنند. این مشاهدات احتمال رابطه مهاجرتی در بین ماهیان *Garra gymnothorax* رودخانه سزار و ماهیان کور *Garra typhlops* و *Garra lorestanensis* را پیش می‌آورد. علاوه بر این در بین ماهیان کور در مورد هر گونه، تنوع شکل بدن قابل مشاهده است. تنوع فنوتیپی یادشده ممکن است گویای تنوع ژنتیکی ناشناخته‌ای در بین این ماهیان باشد و یا ناشی از شرایط محیطی حاکم بر بخش‌های مختلف غار ماهی کور باشد. در این مطالعه برای پاسخ به سوالات موجود از روش‌های تعیین توالی ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد یک (COI) و تعیین توالی نسل جدید استفاده شده است. نتایج نشان می‌دهد اشکال دوکی شکل و اشکال دارای بدن کشیده و غیر دوکی گونه‌های *G. typhlops* و *G. lorestanensis* از نظر ترکیب ژنوم و ژن میتوکندریایی تفاوتی ندارند. همچنین نتایج مقایسه ترکیب ژنومی ماهیان کور و ماهی *G. gymnothorax* رودخانه‌های دز و کرخه نشان می‌دهد احتمالا نفوذ ژنتیکی بسیار کمی (کمتر از ۳ درصد) از گونه *G. gymnothorax* به ماهی کور *G. typhlops* وجود دارد. شاید بتوان این نفوذ ژنتیکی کم ماهیان سطح‌زی را به سازگاری پایین‌تر آن‌ها برای ورود و انطباق با شرایط زیستگاه زیرزمینی نسبت داد.

واژه‌های کلیدی. ترکیب ژنوم، تنوع شکل، توالی‌یابی نسل جدید، ژنوم میتوکندریایی، غار ماهی کور

The analysis of the relationship between Lorestan cave barbs (*Garra typhlops* and *Garra lorestanensis*) and *Garra gymnothorax* populations in Dez and Karkheh River drainages

Iraj Hashemzadeh Segherloo[1], Seyedeh Narjes Tabatabaei[2], Nabiallah Ghaed Rahmati[3], Mohsen Amiri[3] & Louis Bernatchez[4]

[1]Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahr-e-Kord University, Shahr-e-Kord, Iran; [2]Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; [3]Lorestan Province Department of Environment, Khoramabad, Iran; [4]Department of Biology, Laval University, Quebec, Canada
Correspondent author: Iraj Hashemzadeh Segherloo, ihashem@sku.ac.ir

Abstract. The cave barb habitat is located in a Karst formation along the Sezar River. The springs on the walls of the Sezar River valley may provide a means for fish in surface waters to penetrate into the underground waters. These observations propose the probability for a migratory relationship between *Garra gymnothorax* in the Sezar River and the cave barbs (*Garra typhlops* and *Garra lorestanensis*). In addition, a variety of different body shapes including fusiform and slender body forms are observed among the cave fish. This phenotypical variation may be a sign of an unknown genetic diversity or could be attributed to the variable environmental conditions in different parts of the subterranean habitat. To clarify the situation, we used the sequences of mtDNA cytochrome oxidase subunit I and next generation sequencing method. The results showed that the fusiform and slender body shapes of *G. typhlops* and *G. lorestanensis* were not different with regard to their mtDNA and genomic compositions. Moreover, the analysis of the genomic

Received 22.04.2018/ Revised 23.08.2018/ Accepted 03.09.2018/ Published 04.04.2020
دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۱/ اصلاح: ۱۳۹۷/۰۶/۰۱/ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲/ انتشار: ۱۳۹۹/۰۱/۱۶

their mtDNA and genomic compositions. Moreover, the analysis of the genomic showed that a limited level of gene flow (less than 3%) from *G. gymnothorax* probably existed in *G. thyphlops.* The low level of gene flow may be related to the lower fitness and adaptability of the surface dwelling fish to the subterranean life conditions.

Key words. Cave barb locality, genome composition, mitochondrial genome, morphological diversity, next generation sequencing

مقدمه

اولین زیستگاه شناسایی شده ماهیان کور ایران در منطقه پاپی استان لرستان در مجموعه‌های کارستی سلسله کوه‌های زاگرس در مجاورت رودخانه دز به صورت خروجی یک غار قرار دارد (Hashemzadeh Segherloo et al., 2012a). در این زیستگاه سه گونه ماهی کور شامل *Garra typhlops*، *Garra lorestanensis* و *Eidinemacheilus smithii* وجود دارند (Hashemzadeh Segherloo et al. 2016; Mousavi-Sabet & Eagderi, 2016). سطح آب در این زیستگاه در فصل‌های مختلف تغییرات زیادی دارد، به طوری که در فصل‌های بارندگی سطح آب بالا آمده و جویبار کوچکی به نام کایه‌رو را ایجاد می‌کند (Coad, 2019). جویبار کایه‌رو پس از عبور از دو آبشار به نهر دیگری به نام آب سیرم تخلیه شده و پس از حدود ۵ کیلومتر به رودخانه سزار می‌ریزد. در بررسی‌ها و مشاهدات دیواره‌های رودخانه سزار چشمه‌های مختلفی وارد رودخانه می‌شوند. وجود حفره‌ها و چشمه‌های یادشده این احتمال را پیش می‌آورد که ماهیان *Garra gymnothorax* با نفوذ به چشمه‌ها و حفرات موجود به زیستگاه‌های زیرزمینی راه یافته و با ماهیان کور *Garra typhlops* و *Garra lorestanensis* تبادل ژنتیکی انجام دهند.

ماهیان کور مورد بررسی در این مطالعه (*G. typhlops* و *G. lorestanensis*) معمولا دارای بدن دوکی شکل، دارای رنگ کرمی-صورتی روشن و فاقد چشم هستند (Sargeran et al., 2008). تفاوت ظاهری ماهیان یادشده در وجود دیسک دهانی در ماهی *G. lorestanensis* و عدم وجود دیسک دهانی در *G. typhlops* است (Sargeran et al., 2008) که احتمالا این تفاوت در شکل دهان نوعی سازگاری با کنج‌های اکولوژیک متفاوت موجود در بخش‌های مختلف زیستگاه زیرزمینی به منظور استفاده از انواع منابع غذایی و کاهش رقابت بین‌گونه‌ای است (Hashemzadeh Segherloo et al., 2018). در بین ماهیان کور دارای بدن دوکی شکل نمونه‌هایی مشاهده می‌شود که دارای بدن کشیده و لاغرتری در مقایسه با فرم‌های موجود در دهانه زیستگاه هستند. این تفاوت در شکل بدن می‌تواند گویای تفاوت‌های ژنتیکی و یا تفاوت‌های بوم شناختی باشد که ریشه‌یابی این تفاوت‌ها نیازمند انجام مطالعات بوم شناسی و ژنتیکی دقیق است.

مطالعاتی که تاکنون در مورد ماهیان کور غار لرستان انجام شده است، شامل بررسی‌های ریخت‌شناسی (Sargeran et al., 2008; Mousavi-Sabet & Eagderi, 2016)، بررسی‌های ژنتیک جمعیت با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (Farashi, 2014) و توالی‌های میتوکندریایی (Hashemzadeh Segherloo et al., 2012a; Farashi et al., 2014) بوده است. مطالعات ریخت‌شناسی به دلیل اثرات محیط بر ریخت ماهیان و تغییرات غیرژنتیکی نمی‌توانند اطلاعات دقیقی در مورد علت واقعی تفاوت‌های مشاهده شده در اختیار قرار دهند (Hashemzadeh Segherloo et al., 2012b). برای ریشه‌یابی مشاهدات به صورت دقیق‌تر و با کمترین تأثیرپذیری از عوامل محیطی می‌توان از روش‌های مولکولی استفاده کرد (Hallerman, 2003). در بررسی‌های مولکولی می‌توان علاوه بر روش‌های مطالعات آنزیمی، دو نوع نشانگر DNA شامل ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) و ژن‌های هسته‌ای nDNA را مدنظر قرار داد (Hallerman, 2003). روش‌های مطالعات آنزیمی به دلیل ماهیت نمونه‌برداری‌های بافتی که نیازمند کشتن جانوران مورد بررسی هستند و همچنین به دلیل محدودیت‌های فنی و تنوع کمتر آن‌ها امروزه کمتر استفاده می‌شوند (Dunham, 2011). ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندریایی به دلیل وراثت تک‌والدی تنها می‌توانند گویای تقویم و رخدادهای شجره مادری باشند و اطلاعات خاصی را در مورد شجره پدری در اختیار قرار نمی‌دهند (Hallerman, 2003)، از سوی دیگر در ژنوم هسته‌ای نیز می‌توان از ژن‌های موجود در کروموزوم جنسی نر برای ردیابی و بررسی شجره پدری موجودات استفاده کرد که به دلیل ناشناخته بودن چنین ژن‌ها و کروموزوم‌های جنسی نر در اغلب ماهیان استفاده از این رویکرد با محدودیت همراه است. علاوه بر این در بررسی‌های جمعیتی و حتی شجره‌شناسی این ژن‌ها به دلایلی مثل تفاوت ضرایب نوترکیبی و جهش در قسمت‌های مختلف ژنوم نمی‌توانند معیار مناسبی برای مشاهدات بوم‌شناختی باشند (Hashemzadeh Segherloo et al., 2018). استفاده از نشانگرهایی مثل نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات جمعیتی و بوم‌شناسی می‌تواند

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]

[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

راه‌گشا باشد. اما این روش‌ها نیازمند در دست داشتن تعداد نمونه‌های جمعیتی کافی (معمولا بیش از ۳۰ نمونه) هستند تا بتوانند گواه مناسبی از تنوع موجود در جمعیت‌های مورد بررسی باشند. در مورد گونه‌های در معرض خطر مثل ماهیان کور غار که بر پایه کتاب فهرست سرخ گونه‌های در معرض خطر اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) در گروه گونه‌های آسیب‌پذیر (Vulnerable) قرار دارند، به دلایل حفاظتی و همچنین به علت محدودیت احتمالی اندازه جمعیت نمی‌توان نمونه‌های کافی تهیه نمود. علاوه بر این ممکن است در طی نمونه‌برداری ماهیان از دست بروند. امروزه با پیدایش روش توالی‌یابی نسل جدید و توسعه روش‌های آماری بررسی داده‌های این روش، امکان تعیین توالی هزاران توالی از سراسر ژنوم برای چندین فرد به طور همزمان و در یک واکنش فراهم شده است (Hashemzadeh Segherloo et al., 2018). یکی از مزایای این روش تولید بیش‌ترین داده از تنوع موجود در جمعیت با استفاده از تعداد نمونه‌های محدود است که این روش را به گزینه مناسبی برای مطالعات بوم‌شناسی، حفاظتی و حتی برای اصلاح نژاد در امور تکثیر و پرورش دام مبتنی بر نشانگرها مبدل کرده است (Decker et al., 2014).

پیرو مطالب یادشده در مورد گونه‌های ماهیان کور، در این مطالعه روابط احتمالی ژنتیکی ماهیان *G. gymnothorax* در حوضه‌های کرخه و دز با ماهیان کور *G. typhlops* و *G. lorestanensis* و همچنین رابطه ژنتیکی اشکال ماهی کور دارای شکل بدن متفاوت با اشکال معمولی ماهیان کور با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید و همچنین با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد یک (COI) مورد بررسی قرار می‌گیرد.

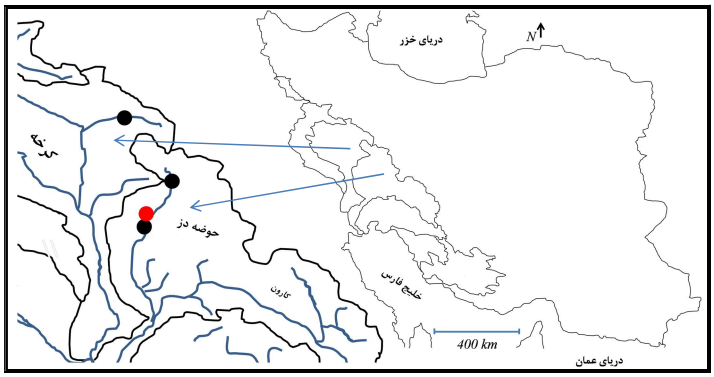
مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه نمونه برداری‌ها در فروردین و اردیبهشت سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۵ (نمونه‌برداری ماهیان کور) و در شهریورماه ۱۳۹۵ (نمونه‌برداری ماهیان *G. gymnothorax*) در حوضه‌های کرخه و دز انجام شد. برای نمونه برداری ماهیان کور از تور ساچوک و برای نمونه برداری ماهی *G. gymnothorax* از الکتروشوکر کول پشتی SAMUS استفاده شد. در این مطالعه تعداد پنج قطعه ماهی *G. lorestanensis*، شش قطعه ماهی *G. typhlops* و هفت قطعه ماهی *G. gymnothorax* (دو قطعه از رودخانه سزار و پنج قطعه از رودخانه کرخه) تهیه شد (شکل ۱). در زمان نمونه برداری از ماهیان کور نمونه‌های صید شده در داخل آکواریم قرار گرفته و از آن‌ها عکس تهیه شد. برای بررسی ژنتیکی نمونه‌ها، باله سینه‌ای آن‌ها معمولا بعد از بیهوشی در محلول گل میخک قطع شده و در الکل اتانل ۹۶ درصد تثبیت می‌شد. در مورد ماهیان *G. gymnothorax* نمونه‌ها به صورت کامل در الکل تثبیت می‌شدند. نمونه‌های ماهیان کور برپایه وجود یا عدم وجود دیسک دهانی به گروه‌های *G. typhlops* و *G. lorestanensis* و بر پایه شکل بدن (دوکی یا کشیده بودن بدن) در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. در زمان نمونه برداری رفتار طبیعی ماهیان کور در محیط غار با استفاده از دوربین زیرآبی GOPRO HERO2 و همچنین در آکواریم ثبت شد.

برای انجام بررسی‌های مولکولی ژنوم نمونه‌ها با استفاده از روش استخراج نمک (Aljanabi & Martinez, 1997) با یک تیمار RNAse برای تجزیه RNA موجود در نمونه استخراج شد (Benestan et al., 2015). برای تعیین توالی نسل جدید از روش GBS (Genotyping-by-Sequencing) در کشور کانادا استفاده شد. پس از تعیین توالی نمونه‌ها پردازش داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Stacks انجام شد (Catchen et al., 2013). در نهایت تعداد ۱۱۲۵۷ جهش تک نوکلئوتیدی (SNP) در نمونه‌های مورد بررسی شناسایی شد. برای بررسی رابطه ژنتیکی در بین ماهیان *G. gymnothorax* و ماهیان کور داده‌های به دست آمده با استفاده از تحلیل ترکیب ژنتیکی موجود در نرم‌افزار ADMIXTURE بررسی شد (Alexander & Lange, 2011). برای تعیین گروه‌بندی مناسب ترکیبات ژنتیکی مشاهده شده، خطای ارزیابی (CV) برای تعداد گروه‌های مختلف (K) محاسبه شد. در این روش تعداد خوشه‌هایی که مقدار خطای ارزیابی آن‌ها کم‌تر باشد به عنوان تعداد خوشه‌های واقعی مدنظر قرار می‌گیرند، البته در کنار مقدار خطای ارزیابی باید در تفسیر تعداد خوشه‌ها دلایل و شواهد زیستی هم مدنظر قرار گیرد (Decker et al., 2014).

برای تکثیر ژن COI از پرایمرهای FishF1 و FishR1 استفاده شد (Hubert et al., 2008). تکثیر ژن COI در واکنش‌هایی به حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از هشت میکرولیتر میکس آماده AccuStart II PCR SuperMix، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ میکرومولار و یک میکرولیتر DNA انجام شد. عملیات تکثیر ژن COI در یک چرخه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه دمایی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۹ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه) و یک چرخه یک دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

برای تعیین توالی این ژن از پرایمر پیشرو و از دستگاه ABI Prisma3130 استفاده شد.



شکل ۱- نقشه پراکنش نقاط نمونه‌برداری در حوضه‌های دز و کرخه. نقاط سیاه‌رنگ نشان‌دهنده نقاط نمونه برداری گونه *G. gymnothorax* و نقطه قرمز رنگ نشان‌دهنده محل غار ماهی کور است.

Fig. 1. Distribution map of sampling localities in the Dez and Karkheh River drainages. The black points denote the sampling localities for *G. gymnothorax* and the red point denotes the cave barb locality.

کیفیت توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bioedit v.7.2.5 به صورت چشمی در مقایسه با توالی‌های موجود در بانک ژن و همچنین با توجه به توالی اسیدهای آمینه برای تایید صحت داده‌ها کنترل شد. برای بررسی جایگاه شجره‌شناسی توالی‌ها دارنگاره الحاق همسایگی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 ترسیم شد.

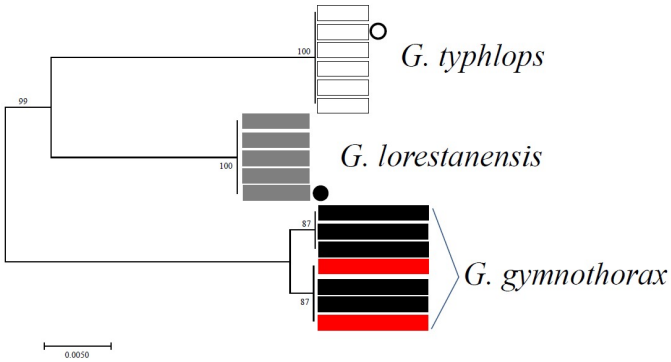
نتایج و بحث

در بین نمونه‌های تهیه شده دو قطعه ماهی کور دارای بدن کشیده وجود داشت که یک نمونه دارای دیسک دهانی و نمونه دیگر فاقد دیسک دهانی بود (شکل ۲). در بررسی رفتار نمونه‌ها در آکواریم در بیش‌تر موارد نمونه‌های دارای دیسک به دیواره-های آکواریم و نمونه‌های بدون دیسک بیش‌تر به ستون آب گرایش داشتند. این امر می‌تواند با کارایی دیسک دهانی برای اتصال به سطوح و همچنین به کارایی آن در حفظ موقعیت ماهی در جریان تند آب ارتباط داشته باشد (Hashemzadeh Segherloo et al., 2017). با توجه به اینکه ماهیان کور در منابع آب زیرزمینی زیست نموده و احتمالا با محدودیت فضای زیستگاهی و منابع تغذیه‌ای روبه‌رو هستند، این احتمال وجود دارد که از دست رفتن دیسک دهانی در گونه *G. typhlops* برای کاهش رقابت و استفاده از زیستگاه‌هایی باشد که بقای بیش‌تر این گونه را در رقابت با گونه *G. lorestanensis* فراهم می‌کند. با این وجود روشن شدن این موضوع نیازمند انجام مطالعات بیش‌تر و طولانی مدت‌تری در محیط طبیعی و در محیط آزمایشگاهی است و نمی‌توان در این مورد با اطلاعات و مشاهدات محدود موجود نظر قطعی داد. در این مطالعه توالی به طول تقریبی ۶۵۰ جفت باز از انتهای 5' ژن سیتوکروم اکسیدار زیرواحد یک (COI) تعیین شد. نتایج بررسی ژن میتوکندریایی یادشده نشان داد نمونه‌های دارای شکل بدن کشیده دارای هاپلوتایپ‌های مشابه افراد دارای شکل بدن دوکی شکل هستند و در دارنگاره الحاق همسایگی در خوشه‌های متعلق به افراد دارای دیسک و بدون دیسک دوکی شکل قرار گرفتند (شکل ۳). با توجه به شکل بدن می‌توان این احتمال را مطرح نمود که ماهیان دارای بدن کشیده که گاهی در دهانه غار ماهی کور دیده می-شوند از ماهیانی هستند که در اعماق زیستگاه و در شرایط محدود از نظر تغذیه‌ای زیست می‌کنند، زیرا در شرایط محدودیت غذایی در ماهیان غارزی کاهش وزن و فاکتور وضعیت در سایر نقاط نیز گزارش شده است (Wilkens & Hüppop, 1986). در صورت صحیح در نظر گرفتن این فرض شاید بتوان عنوان نمود که هر دو گونه ماهیان کور در اعماق زیستگاه زیرزمینی نیز پراکنش توأم دارند اما در رابطه با این‌که دو گونه یادشده در قسمت‌های مختلف زیستگاه دارای همباشی هستند نمی‌توان نظری ارائه نمود. بر پایه مقادیر خطای ارزیابی محاسبه شده برای تعداد گروه‌های مختلف (K) کمترین مقدار خطای ارزیابی متعلق به حالت سه گروهی (K=3) است و در نتیجه وجود سه ترکیب ژنتیکی اصلی در بین نمونه‌های مورد مطالعه محتمل‌ترین حالت است (شکل ۴). در مقادیر گروه‌بندی بالاتر نیز تغییر قابل توجهی در گروه‌های ژنتیکی مشاهده نشد. نتایج بررسی ترکیب ژنتیکی نیز نشان می‌دهد که اشکال غیردوکی شکل ماهیان کور دارای ترکیب ژنتیکی مشابه با اشکال دوکی شکل بوده گروه‌بندی آن‌ها با گروه‌بندی مرتبط با دیسک دهانی و ژنوم میتوکندریایی کاملا مطابقت دارد (شکل ۵). در نتیجه

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

شکل ۲- تصاویر اشکال کشیده و دوکی شکل بدن ماهی کور. **A**. از راست به چپ: فرم کشیده بدون دیسک، فرم بدون دیسک دوکی شکل، فرم بدون دیسک با پوزه رو به بالا و فرم دیسک دار کشیده. **B**. اشکال کشیده بدون دیسک (B1) و دیسک‌دار (B2) و فرم بدون دیسک دوکی شکل (B3).

Fig. 2. Fusiform and slender body shapes of the Blind Cave barb. **A.** From right to left: slender non-disc form, fusiform non-disc form, non-disc form with oblique snout, and disc bearing form with a slender body shape. **B**. the non-disc (B1) and disc bearing cave barbs with slender body form (B2) and the non-disc form with a fusiform body shape (B3).



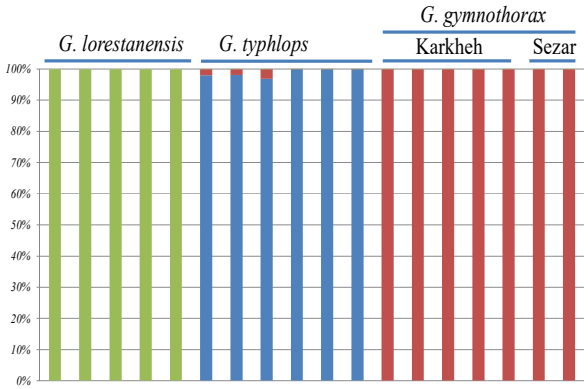
شکل ۳ – دارنگاره الحاق همسایگی ترسیم شده برای ۵۵۸ جفت باز انتهای '5 ژن سیتوکروم اکسیدار زیرواحد یک (COI). اعداد موجود در کنار شاخه‌ها ضرایب بوتسترپ محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار هستند. مستطیل‌های سفید و خاکستری در مورد ماهیان کور به ترتیب نشان‌دهنده افراد متعلق به گونه‌های *G. typhlops* و *G. lorestanensis* بوده و در مورد گونه *G. gymnothorax* مستطیل‌های سیاه و قرمز به ترتیب نشان‌دهنده افراد متعلق به رودخانه‌های کرخه و دز هستند. دوایر سفید و سیاه به ترتیب نشان‌دهنده جایگاه افراد دارای بدن کشیده فاقد دیسک و دارای دیسک هستند.

Fig. 3. Neighbour-Joining phylogram reconstructed for a 558 bp 5' end of Cytochrome oxidase subunit I (COI).The values beside the branches are bootstrap supports calculated using 1000 bootstrap replicates. The white and gray rectangles denote *G. typhlops* and *G. lorestanensis* individuals, respectively; and the black and red rectangles denote *G. gymnothorax* individuals from Karkheh and Dez Rivers, respectively.

نمی‌توان شکل بدن غیردوکی را به ترکیب ژنتیکی نسبت داد و پیرو آنچه به آن اشاره شد احتمالا این شکل بدن در نتیجه زیست در اعماق و در شرایط محدودیت منابع غذایی ایجاد شده است. این مشاهده با گزارش‌های پیشین در رابطه با ارتباط دیسک دهانی و وضعیت رده‌بندی ماهیان کور مطابقت دارد (Hashemzadeh Segherloo et al., 2012a; Farashi et al., 2014).

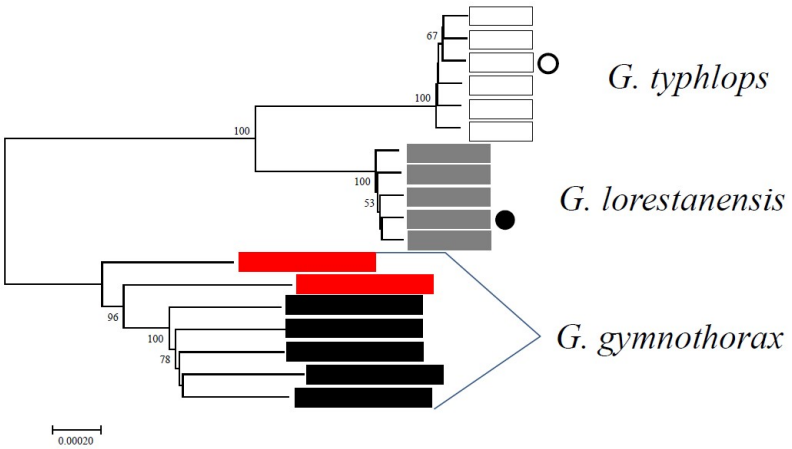
نتایج بررسی ترکیب ژنتیکی همچنین تفاوتی را در بین نمونه‌های *G. gymnothorax* رودخانه‌های کرخه و سزار نشان نمی‌دهد. علاوه بر یکسان بودن وضعیت شجره‌شناسی میتوکندریایی (شکل ۴) یکسان بودن ترکیب ژنومی این جمعیت‌ها نشان‌دهنده ارتباط جمعیتی نزدیک آن‌ها و یا منشأ مشترک آن‌ها در گذشته نزدیک است به طوری که شاید آن‌ها را بتوان محصول اشغال حوضه‌های یادشده توسط جد مشترک آن‌ها در گذشته نه چندان دور دانست. تایید این فرض نیازمند مطالعات بیش‌تر و تهیه نقشه دقیق‌تری از پراکنش جمعت‌های این گونه و روابط ژنتیکی آن‌ها است. برخلاف جمعیت‌های ماهی *G. gymnothorax*، ماهیان کور در یک زیستگاه و دارای دو ترکیب ژنتیکی متفاوت هستند (شکل ۴). این امر می‌تواند نشان‌دهنده جدایی جمعیت‌های این دو گونه در زیستگاه محدود زیرزمینی باشد، اما مکانیزم این جدایی چندان روشن نیست. با توجه به اینکه دو گونه یادشده در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]



شکل ۴- نمودار ترکیب ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی. محور عمودی نمودار نشان‌دهنده درصد ترکیب ژنتیکی افراد است.

Fig. 4. Admixture graph of the analyzed specimens. The vertical bars denote the percentage of ancestry of each individual.



شکل ۵– دارنگاره الحاق همسایگی ترسیم شده برای توالی ژنومی به طول ۵۶۳۸۴۰ جفت باز. اعداد موجود در کنار شاخه‌ها ضرایب بوتسترپ محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار هستند. مستطیل‌های سفید و خاکستری در مورد ماهیان کور به ترتیب نشان‌دهنده افراد متعلق به گونه‌های *G. typhlops* و *G. lorestanensis* بوده و در مورد گونه *G. gymnothorax* مستطیل‌های سیاه و قرمز به ترتیب نشان‌دهنده افراد متعلق به رودخانه‌های کرخه و دز هستند. دوایر سفید و سیاه به ترتیب نشان‌دهنده جایگاه افراد دارای بدن کشیده فاقد دیسک و دارای دیسک هستند.

Fig. 5. Neighbour-Joining phylogram reconstructed for a 563840 bp concatenated genomic sequence. The values beside the branches are bootstrap supports calculated using 1000 bootstrap replicates. The white and gray rectangles denote *G. typhlops* and *G. lorestanensis* individuals, respectively; and the black and red rectangles denote *G. gymnothorax* individuals from Karkheh and Dez Rivers, respectively.

زمان مشابه در زیستگاه و در نقطه یکسانی نمونه‌برداری شده‌اند می‌توان عنوان نمود که جدا بودن دو گونه ماهی کور دارای علتی مثل موانع فیزیکی در زیستگاه زیرزمینی نیست و شاید جدایی و تفاوت آن‌ها با تفاوت در نوع دیسک دهانی و در نتیجه آن تفاوت‌های بوم شناختی باشد. این قضاوت‌ها نیز با توجه به عدم دسترسی به زیستگاه زیرزمینی نیازمند تایید و شواهد بیش‌تری است. در مورد رابطه احتمالی ماهیان *G. gymnothorax* با ماهیان کور از طریق ساختارهای کارستی منطقه در نمودار ترکیبات ژنتیکی در مورد سه قطعه از ماهیان کور *G. typhlops* مشاهده می‌شود در حدود ۱/۸ تا ۳/۱ درصد از ترکیب آن‌ها متعلق به گونه *G. gymnothorax* است (شکل ۴). احتمالا این موضوع نشان‌دهنده نوعی ارتباط ژنتیکی محدود در بین جمعیت‌های رودخانه‌ای و زیستگاه زیرزمینی است. البته با توجه به درصد بسیار کم این ترکیبات نمی‌توان این حالت را اتفاقی قلمداد کرد که به طور معمول رخ می‌دهد. زیرا محدودیت‌های بسیاری برای ورود ماهیان از زیستگاه رودخانه‌ای به زیستگاه زیرزمینی وجود دارد. برای مثال در اولین گام ماهی باید پس از راه‌یابی به زیستگاه زیرزمینی توان سازگار شدن و بقا را در زیستگاه جدید و شرایط کاملا متفاوت آن داشته باشد و در صورت موفقیت باید با گونه‌های ساکن زیستگاه زیرزمینی دارای همپوشانی زمان تولیدمثل بوده و در نهایت بتواند با آن‌ها تولیدمثل کند (Proudlove, 2006). احتمالا این عوامل در کنار

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

بسیاری از عوامل دیگر رابطه ژنتیکی گونه‌های ماهیان کور و گونه‌های رودخانه‌ای را محدود کرده است تا گونه‌های یادشده علی‌رغم وجود ساختار کارستی در منطقه تمایز و سازگاری‌های ژنتیکی و بوم‌شناختی خود را حفظ کنند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از پژوهانه شماره 97GRN1M688 ارائه شده توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به ایرج هاشم زاده سقرلو و با حمایت سازمان حفاظت محیط زیست (معاونت محیط طبیعی) و اداره کل حفاظت محیط زیست استان لرستان و دانشگاه لاوال کبک (کانادا) انجام شده است. نگارندگان از زحمات مهندس امیرمحمد علمی و آقای عیدی حیدری محیط‌بان منطقه تنگه هفت استان لرستان سپاسگزاری می‌نمایند.

REFERENCES

Alexander, D.H. & Lange, K. 2011. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. BMC Bioinform. 12: 246.

Aljanabi, S.M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res. 25: 4692-4693.

Benestan, L., Gosselin, T., Perrier, C., Sainte-Marie, B., Rochette, R. & Bernatchez, L. 2015. RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American lobster (*Homarus americanus*). Mol. Ecol. 24: 3299-3315.

Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. & Cresko, W.A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. Mol. Ecol. 22: 3124-3140.

Coad, B. 2019. Freshwater Fishes of Iran. Available at: www.briancoad.com. Accessed on 14-12-2019.

Decker, J.E., McKay, S.D., Rolf, M.M., Kim, J., Alcalá, A.M., Sonstegard, T.S., Hanotte, O., Götherström, A., Seabury, C.M., Praharani, L. & Babar, M.E. 2014. Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle. PLOS Genet. 10: p.e1004254.

Dunham, R.A. 2011. Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. Cabi. Oxfordshire, UK, 494 pp.

Farashi, A., Kaboli, M., Rezaei, H.R., Naghavi, M.R., Rahimian, H. & Coad, B.W. 2014. Reassessment of the taxonomic position of *Iranocypris typhlops* Bruun & Kaiser, 1944 (Actinopterygii, Cyprinidae). ZooKeys 374: 69-77.

Hallerman, E.M. 2003. Population genetics: principles and practices for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, MD, 458 pp.

Hashemzadeh Segherloo, I., Abdoli, A., Eagderi, S., Esmaeili, H.R., Sayyadzadeh, G., Bernatchez, L., Hallerman, E., Geiger, M.F., Özulug, M., Laroche, J. & Freyhof, J. 2017. Dressing down: convergent reduction of the mental disc in *Garra* (Teleostei: Cyprinidae) in the Middle East. Hydrobiol. 785: 47-59.

Hashemzadeh Segherloo, I., Bernatchez, L., Golzarianpour, K., Abdoli, A., Primmer, C.R. & Bakhtiary, M. 2012a. Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. J. Fish Biol. 81: 1747-1753.

Hashemzadeh Segherloo, I., Farahmand, H., Abdoli, A., Bernatchez, L., Primmer, C.R., Swatdipong, A., Karami, M. & Khalili, B. 2012b. Phylogenetic status of brown trout *Salmo trutta* populations in five rivers from the southern Caspian Sea and two inland lake basins, Iran: a morphogenetic approach. J. Fish Biol. 81: 1479-1500.

Hashemzadeh Segherloo, I., Ghaedrahmati, N. & Freyhof, J. 2016. *Eidinemacheilus*, a new generic name for *Noemacheilus smithi* Greenwood (Teleostei; Nemacheilidae). Zootaxa 4147: 466-476.

Hashemzadeh Segherloo, I., Normandeau, E., Benestan, L., Rougeux, C., Coté, G., Moore, J.S., Ghaedrahmati, N., Abdoli, A. & Bernatchez, L. 2018. Genetic and morphological support for possible sympatric origin of fish from subterranean habitats. Sci. Rep. 8: 2909.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]

[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.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: p.e2490.

Mousavi-Sabet, H. & Eagderi, S. 2016. *Garra lorestanensis*, a new cave fish from the Tigris River drainage with remarks on the subterranean fishes in Iran (Teleostei: Cyprinidae). Fish Taxa 1: 45-54.

Proudlove, G.S. 2006. Subterranean fishes of the world: an account of the subterranean (hypogean) fishes described up to 2003 with a bibliography 1541-2004. International Society for Subterranean Biology, 300 pp.

Sargeran, P., Bakhtiyari, M., Abdoli, A., Coad, B.W., Sarvi, K., Lishi, M.R. & Hajimoradloo, A. 2008. The endemic Iranian Cave-fish, *Iranocypris typhlops*: two taxa or two forms based on the mental disc? Zool. Middle East 44: 67-74.

Wilkens, H. & Hüppop, K. 1986. Sympatric speciation in cave fishes? J. Zool. Syst. Evol. Res. 24: 223-230.

*****

How to cite this article:

Hashemzadeh Segherloo, I., Tabatabaei, S.N., Ghaed Rahmati, N., Amiri, M. & Bernatchez, L. 2020. Analysis of the relationships of Lorestan cave barbs (*Garra typhlops* and *Garra lorestanensis*) and *Garra gymnothorax* populations in Dez and Karkheh River drainages. Nova Bioloica Reperta 7: 1-8. (In Persian).

هاشم‌زاده سقرلو، ا.، طباطبایی، س.ن.، قائدرحمتی، ن.، امیری، م. و برناتچز، ل. ۱۳۹۹. بررسی ارتباط ماهیان کور غار لرستان (*Garra thyphlops* و *Garra lorestanensis*) و جمعیت‌های ماهی گلچراغ (*Garra gymnothorax*) در حوضه‌های دز و کرخه. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۸-۱.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.5.7]

[DOI: 10.29252/nbr.7.1.1]