

اولین بررسی ریخت‌شناسی و فیلوژنی سه گونه نادر از ماهیان خانواده Blenniidae در سواحل دریای مکران بر اساس توالی ژنی سیتوکروم اکسیداز 1

گیلان عطاران فریمان^{۱*}، ساناز استکانی^۱، جواد قاسم زاده^۱

*Gilan.attaran@gmail.com

۱- دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی روابط فیلوژنی سه گونه نادر از ماهیان خانواده Blenniidae در سواحل دریای عمان که متعلق به قبیله Parablenniini هستند انجام گرفت. بر اساس نوع زیستگاه این ماهیان نمونه برداری از سه ایستگاه در نواحی بین جزر و مدی با استفاده از ساچوک دستی در زمان حد اکثر جزر و از زیر جزر و مدی توسط غواصی (Scuba Diving) از اعماق ۳، ۶، ۹ و ۱۲ متری طی مهر تا اسفند ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد. در مجموع ۳۰ نمونه جهت شناسایی و انجام بررسی‌های دقیق‌تر به آزمایشگاه انتقال یافتند. بر اساس ویژگیهای مورفومتریک با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود، سه گونه ماهی بلنیده با اسامی *Parablennius cornutus*، *Parablennius pilicorn*، *Scartella emarginata* شناسایی گردیدند. پس از استخراج DNA از بافت باله پستی، با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، ناحیه‌ای به طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز از ژن سیتوکروم اکسیداز 1 (COI) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و سپس مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. پس از مقایسه توالی ژن COI گونه‌های بلنیده ایرانی با توالی ۲۵ گونه از بانک ژن (GenBank) مشخص شد که گونه‌های ایرانی در شاخه (کلاد) Parablenniini در زیر شاخه *Parablennius* و *Scartella* به صورت همسو نیا (پارافیلیتیک) قرار گرفتند. هدف از انتخاب این جنس‌ها بررسی ارتباط خواهری آنها با یکدیگر و دیگر جنس‌ها و شاخه‌ها است، چرا که ارتباط بین پارابلنیوس‌ها (*Parablennius*) و دیگر بلنی‌ها اغلب موضوع اکثر مطالعات فیلوژنتیکی می‌باشد. مطالعه حاضر اولین گزارش مورفولوژی و فیلوژنی دو جنس *Parablennius* و *Scartella* از ایران می‌باشد.

لغات کلیدی: Blenniidae همسو نیا، فیلوژنی، COI، زیر جزر و مدی و بین جزر و مدی، دریای عمان

*نویسنده مسئول

مقدمه

برخی از خانواده‌های متعلق به راسته سوف ماهی سانان (Perciformes) ساکن آبهای ساحلی دریاها بوده و غالباً در مناطق بین جزر و مدی و زیر جزر و مدی پراکنش دارند. از ویژگی‌های برجسته این ماهی‌ها اندازه کوچک بدن و کفزی بودن و تحرک بسیار آنها است (Hasting & Nelson, 2006; Springer, 2009). زیرراسته Blennioidei شامل شش خانواده، ۱۵۱ جنس و تقریباً ۸۸۳ گونه می‌باشد که پراکنش جهانی داشته و غالباً در آب‌های دریایی کم عمق و اجتماعات مرجانی مناطق حاره و نیمه معتدل زندگی می‌کنند و گاهی نیز وارد آب‌های شیرین می‌شوند (Springer, 1993). ماهیان این زیر راسته برای مطالعات اکولوژیک و رفتاری، ماهیان مناسبی می‌باشند (Nelson, 2006). بخصوص دو خانواده Blenniidae، Tripterygiidae دارای پراکنش جهانی‌اند که در آب‌های ایران نیز یافت می‌شوند. ماهیان خانواده Blenniidae به دلیل فراوانی و پراکنش گسترده و دسترسی آسان در مناطق صخره‌ای بین جزر و مدی و زیر جزر و مدی به عنوان مدل‌های مناسب و مهمی در مطالعات تکاملی و اکولوژیک و جغرافیای زیستی مورد توجه محققین هستند (Munday & Jones, 1998; Depczynski & Bellwood, 2003). خانواده Blenniidae دارای ۵۷ جنس و ۳۸۷ گونه است که بزرگترین خانواده زیر راسته Blennioidei می‌باشد (Nelson, 2006; Hasting & Springer, 2009). ماهیان این خانواده اگرچه از لحاظ ریخت شناسی متفاوت از دیگر خانواده‌های زیر راسته Blennioidei می‌باشند و شناسایی آنها آسان‌تر می‌باشد اما از نظر رده بندی تاریخچه‌ای بسیار پیچیده و طولانی دارند که بارها توسط دانشمندان مختلف بازنگری شده است (Hastings & Springer, 2009). براساس اطلاعات سیستماتیک و رده بندی خانواده Blenniidae دارای دو زیر خانواده Salariae، Blenniidae و شش قبیله (Tribe) می‌باشد (Lin & Hastings, 2013). از جمله دلایل مطالعات ژنتیکی و مولکولی این ماهی‌ها شباهت‌های ریختی و

ظاهری زیاد و دشواری مطالعه ویژگی‌های ریخت شناسی جنس‌ها و گونه‌ها، و درک ارتباطات فیلوژنتیک آنها می‌باشد (Lin, 2009). در سایر مناطق دریایی جهان مطالعات مورفولوژی و فیلوژنی زیادی توسط محققین صورت گرفته است. (Norman, 1943; Bath, Springer, 1968; Bock & Zander, 1986; Springer, 1993; Nelson, 2006; Bath, 2000; Randall, 1998; Lin & Hastings, 2009; Hasting & Springer, 2009; Hundt et al., 2014; 2013) اما در ایران تنها مطالعات ریخت شناسی بر روی ماهیان Blenniidae در خلیج فارس و دریای عمان صورت گرفته که می‌توان به مطالعه (Regan, 1905; Ghabarifardi & Malek, 2007) اشاره کرد.

شهرستان چابهار با مساحت ۲۴۷۲۹ کیلومتر مربع دارای سواحل با تنوع اکوسیستمی بالا می‌باشد. سواحل چابهار در قسمت‌های شمالی محدود به خلیج چابهار و قسمت‌های جنوبی در کرانه دریایی عمان و اقیانوس هند واقع شده است که دارای صخره‌های بزرگی است که در اثر پیشروی آب دریا و فرسایش سنگ‌های رسوبی بوجود آمده است. دو گونه *Scartella emarginata* و *Parablennius cornutus* در نواحی بین جزر و مدی درون حوضچه‌های صخره‌ای و آبسنگ‌های کم عمق و *Parabelennius pilicorn* در نواحی زیر جزر و مدی که دسترسی به آنها سخت به دلیل فراوانی کم آنها در منطقه زیر جزر و مدی و اغلب لای صخره‌ها یافت می‌شوند. هر سه گونه از جلبک‌های قرمز و سبز، هیدروزوا، صدف‌های چسبیده به صخره‌ها و سخت‌پوستان کوچک تغذیه می‌کنند (Randall, 1998).

با توجه به اینکه تاکنون از ایران هیچ گزارشی در زمینه شناسایی مورفولوژی و بررسی روابط فیلوژنی بین گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق ارائه نشده است، لذا، هدف این مطالعه شناسایی مورفولوژی این گونه‌ها برای اولین بار و بررسی ارتباط خوهری آنها با یکدیگر و سایر جنس‌ها و شاخه‌ها بر اساس توالی ژن *COI* و همچنین مقایسه آنالیزهای مولکولی شاخه *Parablenniini* در این پژوهش با سایر اطلاعات مشابه در سراسر دنیا می‌باشد.

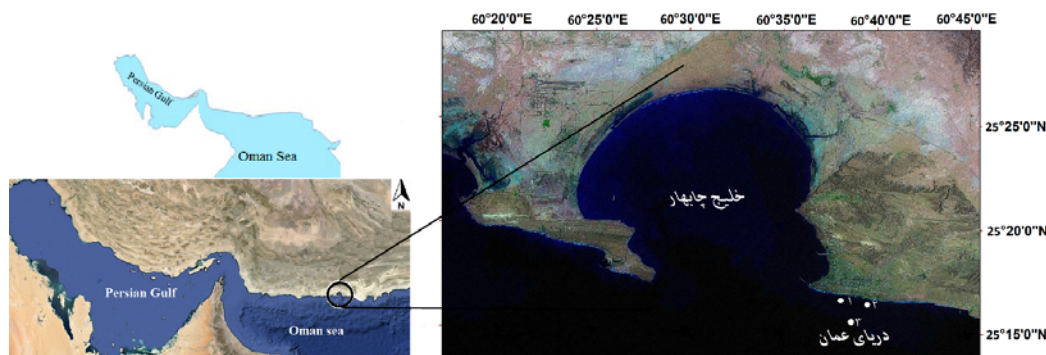
مواد و روش‌ها

پس از بررسی مناطق مختلف ساحلی چابهار سه ایستگاه با توجه به اکوسیستم محیط زندگی نمونه‌های مورد مطالعه انتخاب گردید (جدول ۱). از تعداد ۳۰ نمونه ماهی جمع آوری شده ۵ نمونه مربوط به هر گونه جدا و مورد آنالیز قرار گرفتند. از ۳ گونه شناسایی شده دو گونه *Parablennius* و *Scartella emarginata* و *cornutus* از ایستگاه شماره یک در زمان حداکثر جزر و *Parabelennius pilicorn* از ایستگاه شماره سه از اعماق ۳، ۶، ۹ و ۱۲ متری با غواصی (Scuba Diving) و

توسط تور دستی جمع آوری شدند (شکل ۱). ویژگی‌های هر یک از ایستگاه‌ها در جدول (۱) ارائه شده است، برخلاف شباهتی که دو ایستگاه یک و دو باهم داشتند هیچ یک از گونه‌های مطالعه شده در ایستگاه شماره دو یافت نگردید. سپس نمونه‌ها با نگهداری در یخ جهت عملیات آزمایشگاهی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در ابتدا شناسایی نمونه‌ها با استفاده از منابع علمی و کلیدهای شناسایی موجود انجام شد (Carpenter et al. 1997؛ Hasting & Springer, 2009). سپس به فریزر 20°C جهت انجام آنالیزهای مولکولی انتقال داده شدند.

جدول ۱- مشخصات سه ایستگاه نمونه برداری ماهیان Blenniidae در سواحل چابهار

نام ایستگاه	طول و عرض جغرافیایی	توصیف ایستگاه
پارک بین‌المللی بهاران	$25^{\circ}16'30.29\text{N}$ # $60^{\circ}40'17.00\text{E}$ #	ساحل غیر یکنواخت قله سنگی و پوشش جلبکی
ساحل رمین	$25^{\circ}16'02.74\text{N}$ # $60^{\circ}45'04.13\text{E}$	ساحل غیر یکنواخت قله سنگی و پوشش جلبکی
ریف آرتمیس	$25^{\circ}16'20.25\text{N}$ # $60^{\circ}40'24.47\text{E}$	صخره‌های بزرگ با پوشش مرجانی، شقایق‌ها و بادبزنی‌های دریایی



شکل ۱. موقعیت دریای عمان و سه ایستگاه نمونه‌برداری در ناحیه جزر و مدی و زیر جزر و مدی

استخراج DNA

قطعه DNA از بافت ماهیچه مجاور باله پشتی ماهی (بدون پوست) توسط ۵۰۰ میکرولیتر بافر ۲% CTAB (2% CTAB (1.4M NaCl, 0.1% β -mercaptoethanol) استخراج گردید (Thollesson, 2000). کیفیت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتدیوم بروماید بررسی گردید. کیفیت باندهای

حاصله نیز با استفاده از دستگاه ژل داک Viber حاصله از استخراج شده در فریزر 20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بسط و توسعه قسمتی از ژن میتوکندریایی COI، ۱۵ نانوگرم از DNA استخراج شده به عنوان الگو در حجم ۵۰ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. در این واکنش از آغازگرهای

و محصول PCR پس از Clean up توسط شرکت سینا کلون با ارسال به bioscience sequencing in Cambridge UK تعیین توالی گردید. داده‌های حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار BioEdit 5.0.9 Version (Hall, 1999) آنالیز شدند و میزان شباهت آن‌ها با سایر توالی‌های مشابه موجود در بانک جهانی ژن بررسی گردیدند. مترادف‌های بدست آمده از سه گونه مورد بررسی و ۲۵ گونه مشابه در NCBI (جدول ۲) با استفاده از برنامه Clustal X۲ (Thompson *et al.*, 2002) همتراز و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA version 5.0 انجام شدند (Tamura *et al.*, 2011). آنالیز مولکولی و ترسیم درخت به روش‌های مختلفی انجام شد که توپوگرافی‌های مشابهی را نشان می‌دادند. به منظور بررسی فیلوژنی گونه‌ها از روش Maximum Likelihood و بر اساس مدل-3 Tamura (Tamura, 1992) parameter برای رسم درخت فیلوژنی استفاده گردید (kumar *et al.* 2001). گونه‌های *Axoclinus storeyae*, *Crocodylichthys gracilis* به عنوان Out group از خانواده Tripetergidae در نظر گرفته شده است.

جدول ۲: گونه‌های مورد بررسی در آنالیز مولکولی مطالعه حاضر و شماره بانک ژن آن‌ها.

گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با علامت \blacklozenge مشخص شده‌اند.

نام گونه	شماره بانک ژن	نام گونه	شماره بانک ژن
<i>Entomacrodus striatus</i>	JQ349960	<i>Crocodylichthys gracilis</i>	HQ168532
<i>Scartella</i> sp.	JQ843032	\blacklozenge <i>Parablennius cornutus</i>	KJ411426
<i>Parablennius pilicornis</i>	GU805109	\blacklozenge <i>Parablennius pilicornis</i>	KJ411427
<i>Istiblennius edentulous</i>	JQ 350065	\blacklozenge <i>Scartella emarginata</i>	KJ 411428
<i>Ophioblennius atlanticus</i>	FJ 583754	<i>Scartella emarginata</i>	JF494437
<i>Plagiotremus tapeinosoma</i>	JQ 431998	<i>Parablennius marmoreus</i>	JQ842629
<i>Cirripectes variolosus</i>	JN 107906	<i>Parablennius rouxi</i>	AJ 872148
<i>Cirripectes fuscoguttatus</i>	JQ431645	<i>Cirripectes quagga</i>	JQ 431648
<i>Parablennius cornutus</i>	HQ 945840	<i>Cirripectes castaneus</i>	HQ 168552
<i>Axoclinus storeyae</i>	HQ168528	<i>Cirripectes stigmaticus</i>	JQ 349909
<i>Hypoleurochilus geminatus</i>	JQ841916	<i>Istiblennius bellus</i>	JQ350060
<i>Hypoleurochilus</i> sp.	GU224877	<i>Hypoleurochilus springeri</i>	JQ841233
<i>Ophioblennius macclurei</i>	JQ842259	<i>Entomacrodus epalzeocheilos</i>	JQ 349986

اختصاصی (Lin, 2005) Fish-F1 (TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC) (Fish- و R2ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA) جهت تکثیر قسمتی از ژن *COI* میتو کندریایی به طول ۷۰۰bp استفاده شد. واکنش PCR شامل ترکیبات ۱۰x PCR Buffer، ۳mM MgCl₂، ۱۰mM dNTPs و 10 پیکو مول از هر یک از آغازگرها و همچنین 1U DNA Taq polymerase و آب دی یونیزه بود (Tholleson, 2000). واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ependorf Model 5331 انجام شد. برنامه سیکل حرارتی داده شده به دستگاه شامل به ترتیب: مرحله اول واسرشته شدن (Denaturation) ۹۴°C به مدت یک دقیقه، مرحله دوم اتصال (Annealing) ۳۵ سیکل سه مرحله‌ای شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال ۵۲°C-۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و حرارت ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله سوم طویل سازی نهایی (Extention) ۷۲°C به مدت پنج دقیقه می‌باشد. کیفیت باندهای محصول PCR توسط ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید

نتایج

در این مطالعه از مجموع سه ایستگاه در ناحیه جزر و مدی و بین جزر ومدی سواحل مکران برای هر گونه ۵ نمونه مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. نتایج حاصل از شناسایی خصوصیات ریخت شناسی (مورفولوژیک) و شمارشی (مریستیک) نشان می‌دهد که هر سه گونه *Parablennius*, *Parablennius pilicorn* و *Scartella emarginata* برای اولین بار در ایران از سواحل دریای عمان شناسایی و معرفی می‌گردند که ویژگی‌های نام گذاری که توسط افراد مختلف در سال-های متوالی گزارش شده، ریخت شناسی و زیستگاه این ماهیان به شرح ذیل می‌باشد.

Scartella emarginata Gunther, 1861

Scartella emarginata: Gunther, 1861:224.

Blennius cristatus: penrith & Penrith, 1972:70.

Blennius steindachneri: Smith, 1959:230

؛1961:571. *Scartella emarginata*: Bath,

1977:211؛Randall: 1998: 323, fig. 918; Hundt

et al, 2014:70.

تعداد خارهای باله پشتی XI-XIII و تعداد شعاع‌های نرم

آن ۱۲-۱۶ عدد، تعداد خارهای باله مخرجی II و تعداد

شعاع‌های نرم آن ۱۴-۱۸ عدد می‌باشد. خط جانبی دارای

۱۳ تا ۱۸ جفت سوراخ در بخش جلویی است. در هر کدام

از آرواره‌های بالا و پایین حدود ۲۲-۲۳ دندان ریز و ثابت

وجود دارد. زائده رشته‌ای یا تتناکل فوق چشمی

(Supraorbital) (tentacle) نسبتاً کوتاه بوده و از یک

سری تاژک (Cirri) پوشیده است. در بخش میانی سر و

حد فاصل بین پوزه تا حاشیه عقبی چشم‌ها یک برآمدگی

گوشتی حامل یک ردیف تاژک وجود دارد. شش نوار تیره

و کمرنگ در بخش یک سوم بالایی بدن وجود دارد(شکل

۲). زیستگاه آن‌ها سواحل سنگی- صخره‌ای و قله سنگی

در مناطق بالای جزر و مدی می‌باشد.

Parablennius pilicornis (Cuvier, 1829)

Blennius pilicornis Cuvier, in Cuv. & val,

1829: 237. *Blennius fascigula* Barnard,

1927:834؛ Penrith & Penrith, 1972:72.

Blennius trifascigula: Fowler, 1936: 505.

Blennius vandervekeni: Poll, 1959:66, Fig. 24.

Parablennius pilicornis: Bath, 1977: 197

؛Randall, 1998: 321, Fig.910؛Hundt *et al*,

2014:70.

تعداد خارهای باله پشتی XII و تعداد شعاع‌های نرم آن

۱۷-۱۶ عدد، تعداد خارهای باله مخرجی II و تعداد

شعاع‌های نرم آن ۱۸-۱۹ عدد می‌باشد. خط جانبی ۱۷-۹

جفت سوراخ منشعب دارد که تا زیر خارهای VIII-IX

باله پشتی ادامه می‌یابد. ۳۵-۲۳ دندان در فک بالا، ۲۸-

۲۱ دندان در فک پایین وجود دارد، دندان نیش کاملاً در

فک پایین رشد یافته است. تاژک‌ها (Cirri) بلند بوده و

دارای یک پایه مشعب روی چشم هستند. بدن به رنگ

قهوه‌ای تیره با خطوط عمودی روشن می‌باشد، بر روی

باله‌ها نقاط قهوه‌ای رنگ و همچنین بر روی باله پشتی دو

نقطه یکی به رنگ تیره و دیگری به رنگ قرمز دیده می‌شود

(شکل ۳). زیستگاه آن‌ها در سواحل سنگی- صخره‌ای و

قلوه سنگی، مناطق زیر جزر و مدی بوده و بیشتر در عمق

۱۲-۳ متری مشاهده گردیدند.

Parablennius cornutus (Linnaeus, 1758)

Blennius cornutus, Linnaeus, 1758:256

؛Penrith & Penrith, 1972:67؛ Smith & Smith,

1966:112. *Blennius grandicornis* valenciennes,

in Cuv. & val, 1836: 258. *Blennius scullyi*

Gilchrist & Thompson, 1908: 103.

Parablennius cornutus Bath, 1977:202؛Hundt

et al., 2014:70.

تعداد خارهای باله پشتی XII, تعداد شعاع‌های نرم آن

۱۵-۱۴ عدد، تعداد خارهای باله مخرجی II و تعداد شعاع-

های نرم آن ۱۷-۱۶ عدد می‌باشد. خط جانبی ۱۷-۹

سوراخ منشعب دارد که تا انتهای هشتین و نهمین باله

پشتی امتداد می‌یابد. ۲۳-۳۵ دندان در فک بالا، ۲۸-۲۱

دندان در فک پایین وجود دارد. دندان نیش در فک پایین

کاملاً رشد یافته است. تاژک (Cirri) بلند بر روی سر و

یک خال تیره بر روی گونه در کنار چشم و خطوط عمودی تیره در زیر چشم دیده می‌شود. زیستگاه آن‌ها در سواحل سنگی - صخره‌ای و قله سنگی مناطق بالا جزر و مدی می‌باشد.

بالای چشم (Supraorbital) و بر روی یک پایه منشعب قرار دارد. بدن به رنگ قهوه‌ای با نقاط قرمز کوچک بر روی باله‌ها می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۲: *Scartella Emarginata* (عکس از: ساناز استکانی)



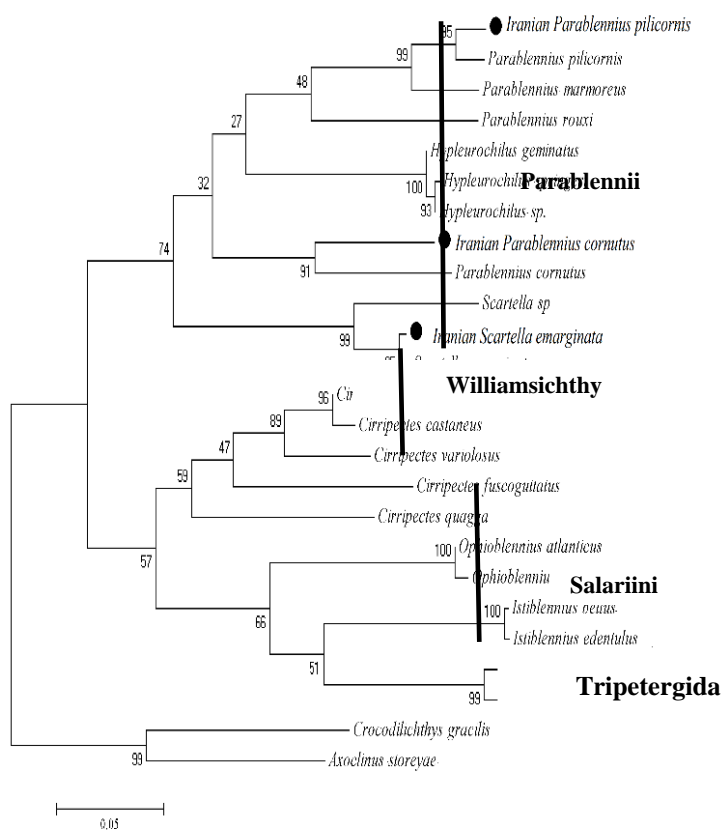
شکل ۳: *Parablennius pilicornis* (عکس از: ساناز استکانی)



شکل ۴: *Parablennius cornutus* (عکس از: ساناز استکانی)

خواهری داشته و همچنین ۹۹٪ با *marmoreus* و تک نیایی *Parablennius* رابطه خواهری داشته و تک نیایی *Parablennius cornutus* نیز با حمایت ۹۱٪ رابطه خواهری با *Parablennius cornutus* دارد. جنس *Scartella* با حمایت ۷۴٪ مونوفایلی بوده و نمونه ایرانی ۹۵٪ رابطه خواهری با *Scartella emarginata* داشته و در شاخه مشترک قرار دارند. برای اولین بار در ایران مطالعه مولکولی دو جنس *Parablennius* و *Scartella* صورت گرفته و گزارش شده است (شکل ۵).

پس از اطمینان از نتایج آنالیز مولکولی نمونه‌های مورد آزمایش به بانک جهانی ژن معرفی و به ترتیب با شماره-های بانک ژن اشاره شده در جدول ۲ برای اولین بار ثبت گردیدند. از دندروگرام حاصل از آنالیز ML به منظور تایید همسو نیا یا تک نیایی شاخه *Parablennii* استفاده شد. در این پژوهش مشخص شد که جنس *pilicornis* *Parablennius* ایرانی با حمایت ۹۵٪ با توالی *Parablennius pilicornis* موجود در بانک ژن رابطه



شکل ۵: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژنی قسمتی از ژن *COI* با روش آنالیز ML اعداد بوت استرپ 1000 Replication را نشان می‌دهد. گونه ایرانی با علامت ● نشان داده شده است.

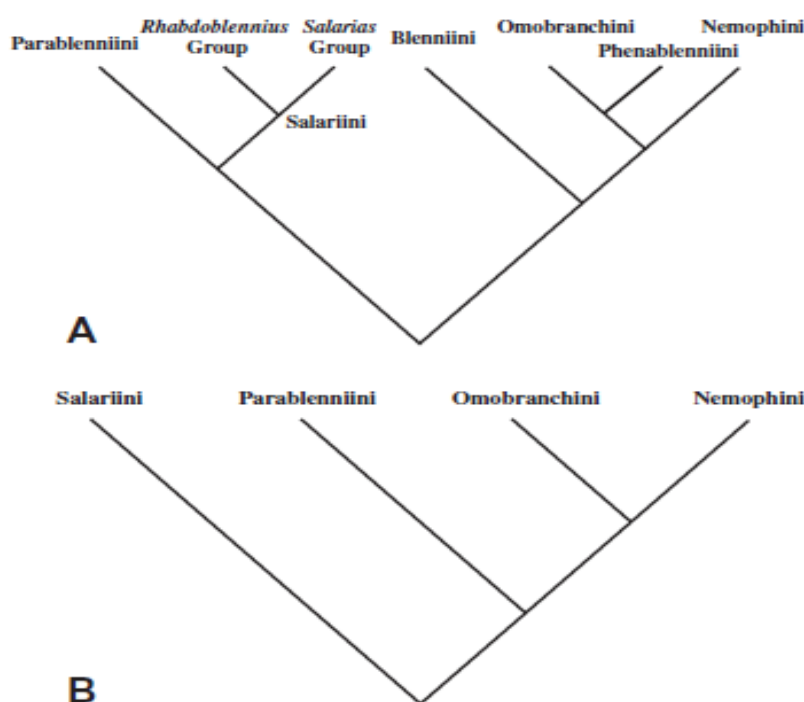
بحث

پیشنهادی ارتباطات گروهی که توسط Williams در سال ۱۹۹۰ ارائه شد (شکل ۶). بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک صفات نبوده بلکه جمع بندی اطلاعات حاصله از مطالعات قبلی بوده است (Hundt et al., 2014) و ارتباط بین گروه‌های اصلی بلنی‌ها در چهارچوب فیلوژنی هنوز به طور وسیع و همه جانبه بررسی و مطالعه نشده است. در مطالعه ای که توسط Stepien در سال 1997 در ارتباط با رابطه تکاملی ماهیان Blennioid بر اساس آنالیز DNA میتوکندریایی انجام شد، مشخص گردید این زیرراسته و چندین خانواده‌اش یک گروه منوفایلی را تشکیل می دهند (Nelson, 2006). جامع ترین آنالیز فیلوژنی انجام شده تا کنون بر روی ۴۸ گونه بلنی دندان شانه ای که نماینده چهار قبیله Nemophinii, Parablenniini, Salariaiini, Omobranchini بودند انجام شد در این مطالعه نشانگر میتوکندریایی (COI) و نشانگر هسته ای 18srDNA مورد استفاده قرار گرفت (Lin, 2009) و مشخص شد این چهار شاخه تک نیایی می‌باشند، (شکل ۶) و ارتباطات متفاوتی را در مقایسه با آنچه توسط (Williams, 1990) ارائه شده بود را کشف نمود. Lin یک شاخه یا آرایه ای را ارائه نمود که شامل گروه های Nemophinii, Parablenniini, Omobranchini بود و هیچ گونه شاهدهی برای تقسیم نمودن شاخه Salariaiini به دو گروه Rhabdoblennius و Salariaiini مشاهده نمود. (شکل ۶). در مطالعه حاضر دو شاخه Salariaiini و Parablenniini (شکل ۵) به صورت چند نیایی قرار گرفتند.

دو تا از گونه های مورد مطالعه در تحقیق حاضر در جنس *Parablennius* قرار دارند این جنس شامل ۲۶ گونه می‌باشد (Patzner et al., 2009). تمامی آن‌ها دریایی و کفزی می‌باشند. سیستماتیک این گونه‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژی آن‌ها، (به خصوص صفات مرستیک و استخوان شناسی) می‌باشد (Norman, 1943؛ Springer, 1968؛ Bath, 1977؛ Bock and Zander, 1986؛ Bath, 2000, 2001).

گرچه مطالعات انجام شده در مورد ماهیان Blenniidae در ایران بسیار کم است اما در سطح جهانی مطالعات بسیاری در مورد سیستماتیک و فیلوژنی ماهیان Blenniidae صورت گرفته است. در این تحقیق برای اولین بار مورفولوژی و فیلوژنی سه گونه نادر *Parablennius parablennius pilicorn*، *Scartella emarginata*، *cornutus* متعلق به گروه Parablenniini مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). در اولین مطالعه بازنگری و مرور جامع طبقه بندی بلنی‌ها این ماهیها به سه گروه: Ophioblenniinae, Blenniinae و Salariaiinae تقسیم شدند (Norman, 1943).

Springer در سال ۱۹۶۸ بنیاد طبقه بندی ماهیان بلنی‌کنونی را پایه گذاری کرد و به چهار گروه عمده بنامهای Omobranchini, Salariaiini, Nemophinii و Blenniini تقسیم نمود. در جدیدترین مرور تاکسونومیک و طبقه بندی که Williams در سال ۱۹۹۰ انجام داد شش گروه اصلی Blenniini, Nemophinii, Omobranchini, Phenablenniini, Parablenniini, Salariaiini and Salariaiini را معتبر دانست و گروه Salariaiini را به دو زیر گروه Rhabdoblennius و Salariaiini تقسیم نمود. بنابر پیشنهاد ایشان یک گروه که شامل Salariaiini و Parablenniini بود (شکل ۶ الف) با دو ویژگی مورفولوژیکی مربوط به استخوان های پیش آرواره (premaxilla) و قطعات متصل به استخوان های شانه (Scapula) و کتف (coracoids) حمایت می شد (Springer, 1968). گروه دوم که از چهار گروه باقی مانده یعنی Nemophinii, Blenniini, Phenablenniini, Omobranchini تشکیل می‌گردد (شکل ۶ الف) فقط توسط یک صفت همسان مورفولوژیکی یعنی اتصال بین دو استخوان آرواره پایینی (Dentaries) با هم متحد شده و یک گروه را تشکیل می‌دهند (Smith-Vaniz & Springer, 1971) که گونه های مورد مطالعه در تحقیق حاضر در گروه اول قرار می گیرد. به هر حال این فرضیه



شکل ۶: الف- فرضیه ارثه شده توسط Williams (1990) که Blenniid را بر اساس شواهد مورفولوژیکی به ۶ گروه تقسیم نمود. ب- تقسیم بندی فیلوژنتیک که توسط Lin (2009) انجام شد.

همکارانش (۲۰۰۵) با استفاده از DNA میتوکندریایی بلنی‌های شمال شرق آتلانتیک و مدیترانه هیچگونه شواهدی برای ارتباط بین *Aidablennius* و *Parablennius* پیدا نکردند و همچنین براساس اطلاعات مولکولی‌شان *Parablennius* را به عنوان شاخه همسو نیا معرفی کردند که این شاخه شامل جنس‌های *Scartella* و *Salaria* می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نیز همسو نیا بودن این شاخه را تایید می‌کند (شکل ۵). مطالعات گسترده‌ای که بر روی بلنی‌ها صورت گرفت تایید کرد که دو جنس *Scartella* و *Salaria* با *Hypoleurochilus* در یک شاخه قرار می‌گیرند. مطالعه Levy و همکاران (۲۰۱۳) شاخه *Parablennius* را همسو نیا شناخت همچنین شاخه تک نیایی *Scartella*، *Salaria* و *Parablennius* را گروه خواهری *Hypoleurochilus* معرفی کرد که همه جنس‌های *Scartella* و *Salaria* به

ارتباط بین پارابلنیوس‌ها *Parablennius* و دیگر بلنی‌ها اغلب موضوع اکثر مطالعات می‌باشد. زیرا در بررسی استخوان شناسی بلنی‌های اروپا Bock و Zander (1986) اظهار کردند که رابطه نزدیکی بین جنس‌های *Parablennius*، *Aidablennius* و *Scartella* براساس اجزاء عصبی‌شان وجود دارد و همچنین این جنس‌ها از دو جنس *Lipophrys*، *Coryphoblennius* براساس مورفولوژی کانال‌های حسی روی استخوان فرا گیجگاهی جدا می‌شوند. Bock و Zander (۱۹۸۶) دو جنس *Lipophrys*، *Coryphoblennius* را با دو جنس دیگر به نام‌های *Hypoblennius*، *Hypoleurochilus* به علت داشتن درپوش آبششی محدود و وجود دیواره جلویی آرواره بالایی مرتبط دانستند. اطلاعات مولکولی فرضیه‌های جدیدی را برای سیستماتیک *Parablennius* و ارتباط این جنس با سایر بلنی‌ها را پیش‌بینی کرد. Almada و

ساناز استکانی می‌باشد که تحت حمایت مالی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شده است. بدین وسیله از همکاری‌ها و مساعدت‌های آقایان مهندس حسن زادعباس (دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار) مهندس نبی اله خیرآبادی (دانشگاه تربیت مدرس)، مهندس نوید قاضی و همچنین از همکاری‌های صمیمانه سرکار خانم مهندس بهروزی (دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار) و آقای محمدرضا شاپوری قدردانی می‌گردد.

منابع

- Almada, F., Almada, V., Domingues, V., Brito, A. and Santos, R., 2005. Molecular validation of the specific status of *parablennius sanguinolentus* and *parablennius parvicornis* (Pisces: Blenniidae). *Scientia Marina*, 69: 519-523.
- Barnard, K.H., 1927. A monograph of the marine fishes of South Africa. *Ann. S. Afr. Mus.* 21: 1-1065.
- Bath, H., 1997. Revision der Blenniini (Pisces: Blenniidae). *Senckenbergiana biologica*, 57: 168-234.
- Bath, H., 2000. Untersuchung des Schultergürtels der Arten der Tribus Parablenniini unter Berücksichtigung von Arten weiterer Tribus der Familie Blenniidae (Pisces, Blenniidae). *Senckenbergiana Biologica*, 80: 189-203.
- Bath, H., 2001. Osteology and morphology of fishes of the subfamily Salariinae and its junior synonym Parablenniinae (Pisces: Blenniidae). *Stuttgarter Beitr*, A628: 1-42.
- همراه *Hypsoblennius* در مطالعات Hundt و همکاران (۲۰۱۴) در شاخه *Parablenniini* قرار گرفتند. طبق این مطالعه گونه‌های موجود: *gattorugine Parablennius* و *Hypsoblennius hentz* در شاخه *Parablenniini* دارای جد مشترک می‌باشند. در حالی که در تقسیم بندی‌های مورفولوژی که توسط افراد مختلف انجام شد نمونه *Scartella emarginata* درون شاخه *Salariini* قرار گرفته بود (Springer & Smith-Vaniz, 1972؛ Bath, 1997؛ Nelson, 2006) این شاخه در مطالعات Hundt و همکارانش نیز همسو نیا (پارافایلیتیک) معرفی شد، اما در مطالعات Lin (۲۰۰۹) جنس *Parablennius* همسو نیا شناخته نشد. در آنالیزهای مولکولی صورت گرفته در پژوهش حاضر شاخه *Parablenniini* شامل سه زیر شاخه *Hypleurochilus*، *Scartella* و *Parablennius* می‌باشد. هر سه زیر شاخه به صورت همسو نیا حمایت می‌شوند (شکل ۵). جنس *Parablennius* در آنالیزهای مولکولی تحقیق حاضر همسو نیا است.
- به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت بررسی مولکولی نقش مهمی در طبقه بندی دارد و می‌توان از آنالیزهای مولکولی جهت تاکسونومی گونه‌ها بهره برد و جایگاه فیلوژنتیکی آنها را مشخص نمود. در نهایت مقایسه گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق با سایر تحقیقات نشان می‌دهد که اکوسیستم خاص سواحل دریای مکران بستر مناسبی را برای ایجاد تنوع بالا و فراوانی گونه‌های مختلف خانواده‌های زیر راسته *Blennioidei* فراهم آورده است، طی غواصی‌های تحقیقاتی که انجام گرفت علاوه بر خانواده *Blenniidae* یکی دیگر از خانواده‌های زیر راسته *Blennioidei* با نام *Tripterygiidae* در نواحی زیر جزر و مدی یافت شد، که می‌تواند موضوع خوبی برای مطالعات بعدی باشد. همچنین گونه‌های زیادی از این خانواده‌ها در سواحل ایران حضور دارند که هنوز شناخته نشده و مورد مطالعه قرار نگرفته است.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم

- Bock, M. and Zander, C.D., 1986.** Osteological characters as tool for blenniid taxonomy a generic revision of European Blenniidae (Percomorpha; Pisces). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 24: 138-143.
- Carpenter, K.E., Krupp, F., Jones, D.A. and Uwe, Z., 1997.** Living marine resources of Kuwait, Eastern Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates. (Eds. Angelis, N., Carpenter, K.E. and Niem, V.). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, FAO. 1997. 293 p., 17 colour plates
- Cuvier, G., 1829.** Le Règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée (Nouvelle édition). 2: 122-406.
- Cuvier, G. and Valenciennes, A., 1836.** Histoire naturelle des poissons. Tome onzième. Livre treizième. De la famille des Mugiloides. Livre quatorzième. De la famille des Gobioides. Histoire naturelle des poissons v. 11: 506 pp + 2 pp., Pls. 307-343.
- Depczynski, M. and Bellwood, D.R., 2003.** The role of cryptobenthic reef fish in coral reef trophic dynamics. *Marine Ecology Progress Series*, 256: 183-191.
- Fowler, H.W., 1903.** Descriptions of several new fishes from Zanzibar Island, two of which are new. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 55: 161-176.
- Ghanbarifardi, M. and Malek, M., 2007.** Permanent intertidal fish from the Persian Gulf and Gulf of Oman, Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 3: 1-14.
- Gilchrist, J. D. F. and Thompson, W. W., 1908.** The Blenniidae of South Africa. *Annals of the South African Museum*, 6 (2):97-143.
- Giinther, A.C.L.G., 1861.** Catalogue of the acanthopterygian fishes in the collection of the British museum. 3: 586. London
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series Ser*, 41: 95-98 .
- Hasting, P.A. and Springer, V.G., 2009.** Systematics of the Blenniidae (Combtooth Blennies). (Eds. Patzner, R. A., Gonçalves, E. J., Hastings, P. A. and Kapoor, B. G.) Enfield: Science Publishers, pp. 69-91.
- Hundt, P.J., Iglésias, S.P., Hoey, A.S. and Simons, A.M., 2014.** A multilocus molecular phylogeny of combtooth blennies (Percomorpha:Blennioidei) Multiple invasions of intertidal habitat. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70: 47-56.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M., 2001.** MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, AZ.
- Levy, A., von der Heyden, S., Floeter, S.R., Bernardi, G. and Almada, V.C., 2013.** Phylogeny of *Parablennius* Miranda Ribeiro, 1915. Reveals a paraphyletic genus

- and recent Indo-Pacific diversification from an Atlantic ancestor. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67: 1-8
- Lin, H-Ch., 2009.** Evolution of the suborder Blennioidei : phylogeny and phylogeography of shallow water fish clade. UC San Diego Electronic Theses and Dissertations.
- Lin, H-Ch. and Hastings, P.A., 2013.** Phylogeny and biogeography of a shallow water fish clade (Teleostei: Blenniiformes). *BMC Evolutionary Biology*, 13: 210.
- Linnaeus, G., 1758.** *Systema Naturae per Regan Tria Naturae. Edition Decima, Reformata* 10:1-823. Stockholm.
- Munday, P.L. and Jones, G.P., 1998.** The ecological implication of small body size among coudal reef fish. *Annual Review of Oceanography and Marine Biology*, 36: 373-411
- Nelson, J.S., 2006.** *Fishes of the world.* Published by John Wiley & Sons New Jersey.
- Norman, J. R., 1943.** Notes on the blennioid fishes. I. A provisional synopsis of the genera of the family Blenniidae. *The Annals and Magazines of Natural History*, 10: 793-812.
- Patzner, R., Gonçalves, E., Hastings, P. and Kapoor, B., 2009.** *The biology of Blennies.* Enfield: Science Publishers.
- Penrith, M.J. and Penrith, M.L., 1972.** The Blenniidae of Western Southern Africa. *Cimbebasia series A*, 2(5): 65-90.
- Poll, M., 1959.** Poissons. V. Teleosteens Acanthopterygiens. *Result. Exped. Beige Atlantique Sud* 3: 1-417.
- Randall, E.J., 1998.** *Coastal fishes of Oman .* United States: Crawford House Publishing Pty Ltd, oman, 312-323.
- Regan, C.T., 1905.** On Fishes from the Persian Gulf, the Sea of Oman, and Karachi, Collected by Mr. F. W. Townsend.
- Smith, J.L.B., 1959.** Fishes of the families Blenniidae and Salariidae of the western Indian Ocean. Rhodes University, Department of Ichthyology, *Ichthyological Bulletin*, 14: 229-252
- Smith, J.L.B. and Smith, M.M., 1966.** Fishes of the Tsitsikamma Coastal National Park. Pretoria: National Parks Board of Trustees.
- Springer, V.G., 1968.** Osteology and classification of the fishes of the family Blenniidae. *Bull of the United States National Museum*, 284: 1-85.
- Springer, V.G. and Smith-vaniz, W.F., 1972.** A new tribe (Phenablenniini) and genus (*Phenablennius*) of blennioid fishes based on *Petroscirtes heyligeri* Bleeker. *Copeia*, 1972: 64-71.
- Springer, V.G., 1993.** Definition of the suborder Blennioidei and its included families (pisces: Perciformes). *Bulletin of Marine Science*, 52: 472-495.
- Stepien, C.A., Alison, D.K., Meriel, B.J., Brooks, K.L., and Hubers, A.N., 1997.** The Evolution of Blennioid Fishes Based on an Analysis of Mitochondrial 12S rDNA. (Eds. Kocher, T. D., andstepien, C.

- A., *Molecular Systematics of Fishes*, San Diego: Academic Press, 245-270.
- Tamura, K., 1992.** Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T. and Higgins D.G., 2002.** Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2(3): 1-2.
- Thollesson, M., 2000.** Increasing fidelity in parsimony analysis of dorid nudibranchs by differential weighting, or A tale of two genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16 (2): 161-172.
- Williams, J. T., 1990.** Phylogenetic relationships and revision of the blennioid fish genus *Scartichthys*. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 492, 1-30.

The first study of the phylogenetic relationships of three rare species of Blenniids (Fishes: Blenniidae) from Makoran Coast based on the gene sequencing of Cytochrome Oxidase 1

Attaran-Fariman G.^{1*}; Estekani S.¹; Ghasemzadeh J.¹

*Gilan.attaran@gmail.com

1- Faculty of Marine Science, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Abstract

In order to assess the phylogenetic relationships of three rare species belonging to tribe Parablenniini was carried out, along the Coast of Oman Sea. Based on the type of habitats the specimens of Blenniid were collected from three sampling sites in the intertidal zones by Scoop and hand net in low tide and in sub-tidal zones by scuba diving and hand from 3, 6, 9, and 12m depths in September to March 2013. Totally 30 fish samples collected and deposited to the lab for further investigation. Based on the available identification keys and morphometric characters three species of *Parablennius cornutus*, *Parabelennius pilicorn*, *Scartella emarginata* were identified. DNA was extracted from the basal tissue of the first dorsal fin, subsequently by using a specific fish primer 700 bp of Cytochrome Oxidase C subunit 1 (*COI*) was amplified in polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. After comparison of Iranian Blenniid species *COI* sequence with sequence of 25 species from GenBank, was concluded that Iranian species are paraphyletically in the clade Parablenniini and sub-clads of *Scartella* and *Parablennius*. Since the relationship of *Parablennius* with other blenniids is the subject of many studies to resolve the conflicts and ambiguities among them we selected these genera to investigate the sister group relationship among them as well as other genera and clads. This is the first time that morphologic and molecular study of the two genera *Parablennius* and *Scartella* have been carried out in Iran.

Keywords: Blenniidae; Paraphyletic; phylogeny; *COI*; intertidal and sub tidal zones; Oman Sea.

*Corresponding author