

## تبارشناسی و مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* De Filippi ۱۹۸۶) در پنج رودخانه از حوزه شمالی ایران

- فرزاد هوشیار: گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- حمیدرضا رضایی: گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- مهوش سیف‌علی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران
- سحر رضایی\*: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی: ۱۱۴۴

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

### چکیده

ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* (De Filippi ۱۸۶۳) جزء ماهیان با اندازه کوچک از کپورماهیان، بنتوپلاژیک، رودرو، ساکن آب شیرین و لب‌شور بوده و محدوده اسیدیته ۸-۷ را تحمل می‌کنند. عمدتاً در مناطق کم‌عمق و جریان‌دار نهرهای کوهستانی می‌باشد. این ماهیان بسترهای سنگی سخت، آب‌های تمیز و سرشار از اکسیژن را ترجیح می‌دهند. به دلیل اندازه کوچک از نظر صید ورزشی و شیلاتی ارزش چندانی ندارد. در این پژوهش به علت نبود مطالعات ملکولی منسجم این گونه، تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه در پنج رودخانه زرین‌گل، مادرسو، صفارود، کسلیان، زالکی در حوزه شمالی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۲۶ نمونه بافت از عضله ماهی خیاطه جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، DNA آن‌ها از بافت عضله گونه استخراج گردید. نتایج نشان داد که بین توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد مطالعه تنوع هاپلوتیپی قابل قبولی وجود دارد. در مجموع ۱۷ هاپلوتایپ شناسایی شد که نشان از تنوع ژنتیکی بالا این ماهی در این رودخانه‌ها دارد. هم‌چنین براساس تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی سه جمعیت از این ماهی در رودخانه‌های فوق شناسایی شد. نمونه‌های جمعیتی غربی (حوزه سفید رود) شامل رودخانه‌های صفارود و زالکی را می‌توان به صورت *A. eichwaldii* در نظر گرفت درحالی‌که می‌توان گفت جمعیت‌های رودخانه کسلیان یک نیایی مجزا می‌باشد (*Alburnoides* sp1). نمونه‌های جمعیتی شرقی (حوزه گرگانرود) شامل رودخانه‌های زرین‌گل و مادرسو کاملاً مجزا از نمونه‌های دیگر بوده و گونه‌های کاملاً متفاوتی را به وجود آورده‌اند (*Alburnoide* sp2).

**کلمات کلیدی:** ماهی خیاطه، تنوع ژنتیکی، هاپلوتیپ، PCR، توالی‌سنجی، درخت فیلوژن



## مقدمه

ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* De Filippi 1863) جزء ماهیان با اندازه کوچک از خانواده کپورماهیان، بنتوپلاژیک، رود رو، ساکن آب شیرین و لبشور بوده و محدوده اسیدیته ۸-۷ را تحمل می‌کند (Ried, ۲۰۰۴). عمدتاً در مناطق کم عمق و جریان‌دار نهرهای کوهستانی، ساکن شده است. این ماهیان بسترهای سنگی سخت و آب‌های تمیز و سرشار از اکسیژن را ترجیح می‌دهند (Penaz, ۱۹۹۵). اهمیت ماهی خیاطه در شیلات، معمولاً به‌عنوان طعمه برای صید و از لحاظ تفریحی نگهداری در آکواریوم می‌باشد (Bogutskaya, ۱۹۹۷). اندازه آن کوچک است، بنابراین ارزش صید ورزشی و اقتصادی (شیلاتی) ندارد، اما با توجه به رنگ‌های زیبای روی بدن دارای ارزش زیبایی‌شناسی می‌باشد. این گروه کوچک از ماهیان به‌طور گسترده در آب‌های شیرین اروپا، قفقاز، آسیای صغیر و آسیای مرکزی پراکنده شده‌اند (Kottelat, ۱۹۸۴؛ Berg, ۱۹۴۵). در بخشی از اروپا، اتحاد جماهیر شوروی سابق، در حوزه دریای سیاه و دریای کاسپین و همچنین شاخه رودخانه‌های جنوبی دریای بالتیک حضور دارند (Tsepkin, ۲۰۰۳؛ Bogutskaya, ۱۹۹۸؛ Sokolov و همکاران, ۱۹۹۲؛ Movchan و همکاران, ۱۹۸۹؛ Zhukov, ۱۹۸۸؛ Berg, ۱۹۴۹). بیش‌تر در قسمت مرکزی قاره اروپا از سواحل اطلس در فرانسه تا دریاچه کاسپین (بیش‌تر در قسمت‌های شرقی) گسترش یافته‌اند (Ladiges و همکاران, ۱۹۷۹). گزارش پراکندگی این ماهی در ایران رودخانه‌های حوزه دریای کاسپین، حوضه آبریز دریاچه ارومیه، رودخانه‌های کرج و جاجرود، زاینده رود و شور رود اصفهان، رود کر، حوضه دجله و فرات و حوضه آبریز قره قوم می‌باشد (Coad, ۲۰۰۵). ماهی خیاطه در هر دو نوع آب‌های جاری و راکد ساکن شده است. عمدتاً از موجودات پلانکتونی و بنتوزهای کوچک و همچنین حشراتی که از هوا در آب افتاده‌اند تغذیه می‌کند (Živković و همکاران, ۱۹۷۱). این ماهی به‌عنوان گونه‌ای که در آب‌های جاری در منطقه ماهیان قزل‌آلا و سس ماهیان زیست می‌کند، به تغییرات در تنوع ساختاری رودخانه حساس است (Breitenstein و همکاران, ۲۰۰۰). شرایط زندگی این ماهی در اروپا به‌علل مختلف نامناسب بوده و در بسیاری از آب‌های اروپا رو به انقراض است (Kirchofer, ۱۹۹۷). در جمهوری چک این ماهی به

صورت قانونی تحت حفاظت است (Lusk و همکاران, ۱۹۹۸). حساسیت بالای این ماهی نسبت به فعالیت‌های انسانی و تحمل کم نسبت به آب‌های آلوده و پساب صنعتی، کشاورزی یا شهری این ماهی را به یک شاخص زیستی مطلوب در رابطه با کیفیت محیط زیستی مبدل ساخته است (Coad, ۲۰۰۵). با توجه به پیشرفت چشمگیر علم ژنتیک در سال‌های اخیر و دقت بسیار بالای تکنیک‌های مولکولی، به خوبی می‌توان در مورد تنوع ژنتیکی در حیات‌وحش و مدیریت جمعیت آن‌ها نتیجه‌گیری نمود. در حال حاضر محققین، به‌خوبی از نشانگرهای مولکولی از قبیل ریزماهورها، RFLP، DNA میتوکندریایی و ... استفاده می‌نمایند. ویژگی‌های متفاوت DNA میتوکندریایی مانند اندازه کوچک و یکسان بودن ترتیب فرارگیری ژن‌ها، آن را به یک نشانگر کاربرد در مطالعه جمعیت‌ها تبدیل کرده است هم‌چنین این نشانگرهای در جانوران به‌دلیل نرخ بالای جهش، فقدان نوترکیبی، فراوانی آغازگرهای عمومی و تاثیر ناچیز اندازه جمعیت بر آن‌ها، از نشانگرهای بسیار متداول در بوم‌شناسی مولکولی است. بنابراین بدون بهره‌گیری از ابزاری مانند آزمون‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تست DNA امکان برآورد صحیح از شاخص‌های ژنتیک جمعیت وجود ندارد (نیکدل و همکاران, ۱۳۸۹).

هدف از انجام این تحقیق بررسی وضعیت تنوع ژنتیکی این گونه در ۵ رودخانه واقع در شمال ایران با استفاده از روش‌های مولکولی است تا بتوان چشم‌انداز درستی از تاثیر فعالیت‌های انسانی بر میزان تنوع ژنتیکی این گونه داشت. ماهی خیاطه داری پراکنش خوبی در ایران می‌باشد و یکی از گونه‌های آبریان بومی برخی از رودخانه‌های حوزه شمالی است که مطالعات ژنتیکی زیادی در خصوص آن تا به حال صورت نگرفته است و مطالعاتی که روی این گونه انجام شده است محدود به مطالعات مورفومتریک، دینامیسم جمعیت و غیره است. مطالعات مورفومتریک انجام شده تفاوت معنی‌داری را در جمعیت‌های مختلف این گونه نشان داده است بنابراین انجام مطالعات ژنتیکی به‌منظور شناسایی و مدیریت بهتر آن‌ها ضروری است.

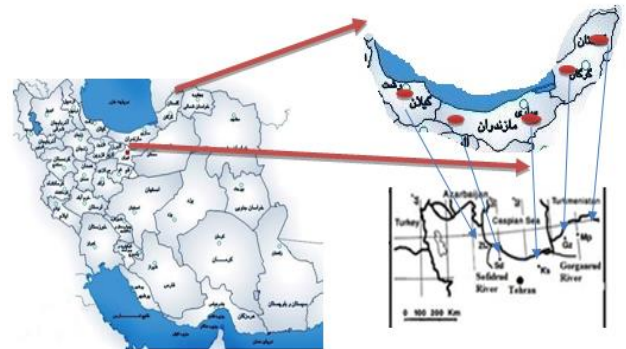


## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** در این پژوهش تعداد ۲۶ نمونه به صورت کاملاً تصادفی و با استفاده از دستگاه الکتروشوکر در پاییز ۹۲ از حوزه‌هایی که در جدول ۱ ذکر شده است، نمونه‌برداری و صید گردیدند سپس نمونه‌ها برای انجام آزمایش به آزمایشگاه ژنتیک حیات وحش گروه محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند (جدول ۱، شکل ۱).

جدول ۱: محل جمع‌آوری نمونه‌ها و تعداد نمونه

ردیف	استان نمونه‌برداری	محل نمونه‌برداری	تعداد نمونه
۱	گلستان	گرگان‌رود - زرین‌گل	۵
		گرگان‌رود - مادرسو	۶
۲	مازندران	صفا رود	۵
		کلیسیان	۶
۳	گیلان	سفیدرود - زالکی	۴



شکل ۱: نقشه جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری

**مطالعات ملکولی:** استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت (کیت شرکت بیونیر) انجام شد. در این تحقیق PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل ۲۷۲۰ صورت گرفت. حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر که با استفاده از کیت PCR محصول شرکت Bioneer صورت گرفت. در داخل هر تیوب PCR به مقدار ۳ میکرولیتر از DNA، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۵ میکرولیتر Taq-polymerase، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۵ میکرولیتر ۱۰X Buffer به همراه ۳۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار

تقطیر ریخته شد. هم‌چنین برای بررسی میزان کمی و کیفی DNA استخراج‌شده از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. بدین منظور DNA استخراج شده روی ژل آگارز (بر حسب اندازه DNA) الکتروفورز گردید. برای انجام PCR از یک جفت پرایمر ۷۷۴ جفت بازی با مشخصات (5' TGAAGTGAARAACCAAYCGTT 3', forward) و (3' GGAATTCACCTCTCC 5', reverse) استفاده شد. هم‌چنین برنامه حرارتی برای چرخه PCR شامل مراحل دناتوراسیون ۹۵° سانتی‌گراد (برای ۱ دقیقه)، گسترش یا طولیل شدن ۷۲° سانتی‌گراد (برای ۱ دقیقه)، انجام شد (Bancroft و همکاران، ۱۹۹۵). هم‌چنین برای گونه‌هایی که با روش ذکر شده تکثیر قطعه مورد نظر صورت نمی‌گرفت از روش touch down شامل مراحل دناتوراسیون ۹۵° سانتی‌گراد (برای ۴۵ ثانیه)، اتصال ۵۴° سانتی‌گراد تا ۴۵° چرخه اول تا چرخه دهم < ۴۴° چرخه ۱۱ تا ۴۴° (برای هر چرخه ۴۵ ثانیه) و گسترش یا طولیل شدن ۷۲° سانتی‌گراد (برای ۱ دقیقه) انجام گرفت.

**توالی‌یابی:** مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR خالص‌سازی شد و به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI ۳۷۳۰ با روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردیدند.

**تجزیه و تحلیل نتایج:** نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای Seqscape و MEGA۵ (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷) ویرایش شدند و در نرم‌افزار ARLEQUIN۳,۱ و NETWORK۴,۶ (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نمونه توالی‌های ثبت شده ماهی خیاطه از سایت NCBI به عنوان منبع در نرم‌افزار Seqscape، برای مرتب کردن توالی‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹). ردیف آرایی توالی‌ها در نرم‌افزار MEGA۵ صورت گرفت. در نهایت درخت فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور (Neighbor-joining) با استفاده از نرم‌افزار MEGA۵ براساس مدل تامورا نئی (Tamura و Nei، ۱۹۹۳) ترسیم گردید که در ترسیم درخت فیلوژنی از توالی ماهی خیاطه (*Alburnoides bipunctatus*) (*ohridanus*) ثبت شده در ژن بانک به عنوان برون گروه (Outgroup)



جدول ۳: تخمین الگو جانیشینی نوع اول و دوم از توالی‌های ماهی

خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*)

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
A	-	۵/۶	۵/۴۸	۱۴/۹۹
T/U	۵/۳۷	-	۱۱/۷۵	۳/۹۴
C	۵/۳۷	۱۲/۰۱	-	۳/۹۴
G	۲۰/۴۷	۵/۶۰	۵/۴۸	-

با استفاده از شبکه می‌توان توالی‌های اجدادی که هنوز وجود دارند را شناسایی کرد و ارتباط آن‌ها را با توالی‌های منشعب شده از آنان نشان داد. هم‌چنین می‌توان توالی‌های منقرض شده را مشخص نمود (فرداصفهان‌ی و اله‌یاری، ۱۳۸۶). گره‌هایی که در شبکه هاپلوتایپی وجود دارند همان توالی‌های منقرض شده یا توالی‌های ناشناخته در این مطالعات هستند، که در بیش تر شبکه‌های هاپلوتایپی وجود دارند. در این پژوهش تعداد هاپلوتایپ ۱۷ عدد و تنوع هاپلوتایپ ۰/۹۴۷ می‌باشد. در شبکه هاپلوتایپی اندازه دوایر در شبکه متناسب با فراوانی آن‌ها می‌باشد. خط‌های قرمز بین هاپلوتایپ‌ها در شبکه هاپلوتایپی نشان‌دهنده تعداد پلی‌مورفیسم‌های بین دو هاپلوتایپ است که هر چه تعداد این نقاط پلی‌مورفیسم بیشتر باشد تفاوت بین دو هاپلوتایپ افزایش می‌یابد. تعداد پلی‌مورفیسم بین حوزه کسلیان و توجی باهم و صفارود و ولمرود کم و در نزدیکی یکدیگر قرار گرفتند ولی تعداد پلی‌مورفیسم این حوزه‌ها نسبت به هم زیاد می‌باشد. با توجه به شکل ۲ توالی‌های حوزه زالکی (رنگ سبز) و صفارود (رنگ آبی) در مرکز شبکه هاپلوتایپی قرار دارند و دیگر جمعیت‌ها از آن‌ها جدا شده‌اند. جمعیت‌های زرین‌گل و خصوصاً مادرسو (رنگ زرد) با فاصله زیادی از دیگر حوزه‌ها قرار گرفته‌اند و گونه‌ای کامل جدا را تشکیل داده‌اند. هم‌چنین جمعیت کلیسیان (رنگ صورتی) با فاصله کمی از جمعیت حوزه زالکی و صفارود می‌باشد که این خود نشان از جدایی جمعیت با این دو حوزه دارد ولی به احتمال زیاد دارای نیای مشترک با آن‌ها می‌باشد. خط‌های قرمز بین هاپلوتایپ‌ها در شبکه هاپلوتایپی نشان‌دهنده تعداد پلی‌مورفیسم‌های بین دو هاپلوتایپ است که هر چه تعداد این نقاط پلی‌مورفیسم بیشتر باشد تفاوت بین دو هاپلوتایپ افزایش می‌یابد. هاپلوتایپ شماره ۶ و ۸ (حوزه مادرسو) دارای بیش‌ترین تعداد نقاط قرمز با نقطه مجاور است، پس بیش‌ترین پلی‌مورفیسم بین هاپلوتایپ‌ها را شامل می‌شود.

استفاده شد (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷). با استفاده از نرم‌افزار NETWORK ۴٫۶ شبکه هاپلوتایپی براساس روش اتصال میانه (Median joining) ترسیم گردید (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹). پارامترهایی چون فراوانی نوکلئوتیدی و تخمین الگوهای جانیشینی نوکلئوتیدی براساس حداکثر احتمال ترکیب (Maximum Composite Likelihood) در نرم‌افزار MEGA ۵ محاسبه گردید (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین پارامترهای تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتایپی، آماره Fst و نیز فراوانی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار ARLEQUIN ۳٫۱ محاسبه گردید (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶).

## نتایج

در این مطالعه در مجموع ۲۶ توالی جزئی سیتوکروم b از پنج رودخانه شمالی ایران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در میان ۷۷۴ جفت باز ژن سیتوکروم b میتوکندریایی، ۱۳۰ مکان جفت باز متغیر بوده و ۹۲ مکان جفت باز دارای اطلاعات فیلوژنتیکی مفید بودند. فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها در نرم‌افزار MEGA ۵ محاسبه و آورده شده است. باز یواسیل بیش‌ترین فراوانی و باز گوانین کم‌ترین فراوانی را داشتند (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷) (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی‌های ماهی خیاطه

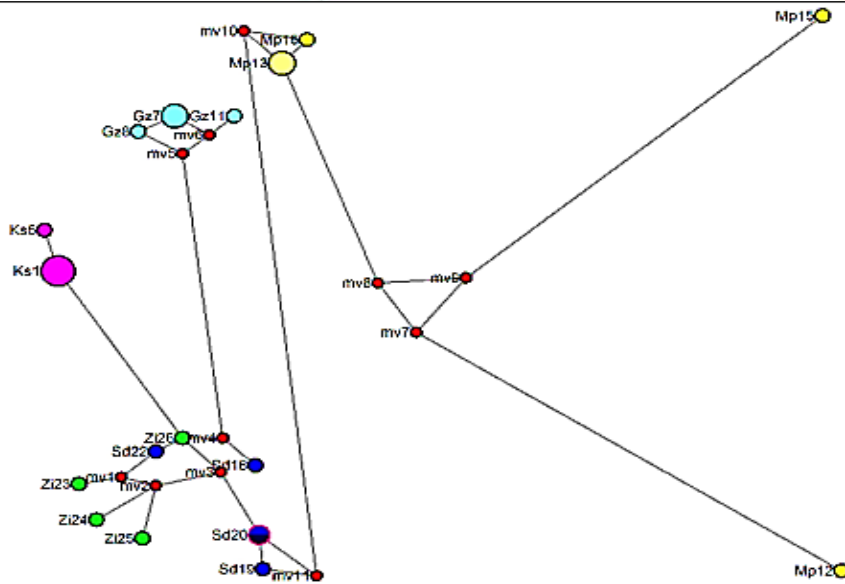
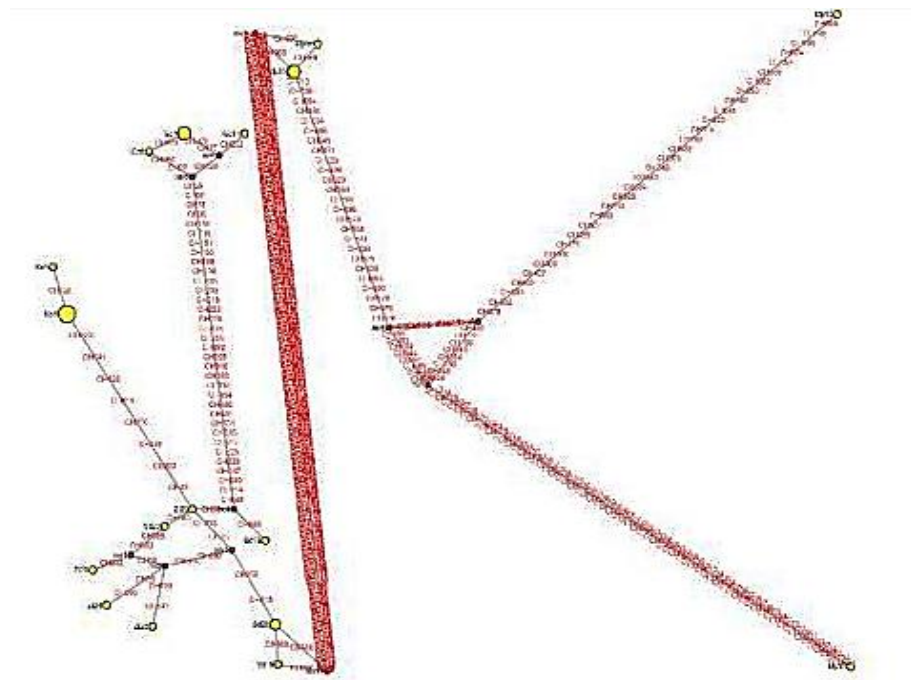
(*Alburnoides eichwaldi*)

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
فراوانی	۲۶/۳۶	۲۷/۴۷	۲۶/۸۷	۱۹/۳۰

میزان جانیشینی نوع اول (جانیشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانیشینی بازهای پیریمیدین T-C با یکدیگر) و جانیشینی نوع دوم بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) برآورد شد (Tamura و همکاران، ۲۰۰۷). تخمین الگو جانیشینی نوع اول و دوم که به صورت پرننگ نشان داده شده‌اند، نرخ جانیشینی نوع اول را بیان می‌کنند و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانیشینی نوع دوم هستند. الگوهای جانیشینی و نرخ‌ها براساس مدل تامورا نئی در نرم‌افزار مگا برآورد شده است (Tamura و Nei، ۱۹۹۳) (جدول ۳).

**شبکه هاپلوتایپی:** شبکه هاپلوتایپی ارتباطات تکاملی بین هاپلوتایپ‌ها را به صورت گرافیکی نشان می‌دهد (ملکیان، ۱۳۸۹).





شکل ۲: شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مورد مطالعه



(صفارود و زالکی) نشان از تفاوت و تنوع ژنتیکی بالا بین دو قسمت غربی و شرقی و جدا شدن جمعیت این دو مناطق می باشد (جدول ۴).  
**درخت فیلوژنتیکی:** نتایج حاصل از آزمون فیلوژنتیکی براساس تشابه حداکثر (Maximum likelihood) با بوت استرپ ۱۰۰۰ مرتبه براساس TN93+G رسم گردید (شکل ۳). هرچه فاصله گروه‌ها در درخت فیلوژنی از یکدیگر بیشتر باشد، شباهت‌ها کم‌تر و بالعکس هرچه فاصله‌ها کم‌تر، شباهت‌ها بیشتر است. فاصله افقی نشان‌دهنده زمان انشقاق گونه‌ها از یکدیگر است که هرچه این فاصله بین دو گونه بیشتر باشد نشان این است که این دو گونه در فاصله دورتری از یکدیگر جدا شده‌اند.

لازم به ذکر است هاپلوتاایپ شماره ۱ (حوزه کسلیان) کم‌ترین تعداد خط قرمز با نقطه مجاور است، پس کم‌ترین پلی مورفیسم بین هاپلوتاایپ‌ها را شامل می‌شود.

#### فراوانی هاپلوتاایپ‌ها و تفسیر نتایج شبکه هاپلوتاایپ: محاسبه

فراوانی نسبی هاپلوتاایپ‌های ۵ منطقه مورد مطالعه، در مجموع ۱۷ هاپلوتاایپ مشخص شد که کم‌ترین هاپلوتاایپ‌ها مربوط به حوزه کسلیان می‌باشد که این مساله تا حدی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی پایین این منطقه نسبت به سایر مناطق می‌باشد. هم‌چنین پراکنش وسیع سایر هاپلوتاایپ‌ها نشان از تنوع ژنتیکی زیاد بین این مناطق می‌باشد. وجود ۷ هاپلوتاایپ در مناطق شرقی (زرین گل و مادرسو) و ۸ هاپلوتاایپ در مناطق غربی

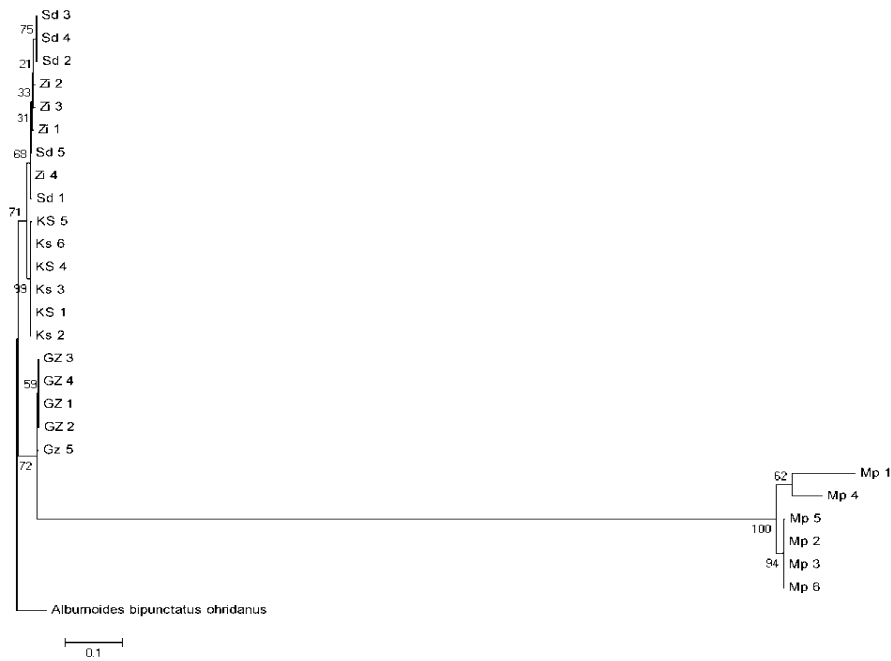
جدول ۴: فراوانی نسبی هاپلوتاایپ‌ها در مناطق مختلف نمونه برداری

منطقه	تعداد هاپلوتاایپ	فراوانی هاپلوتاایپ	کد هاپلوتاایپ
کسلیان	۲	۰/۲	Hap 1
		۰/۲	Ks_2
		۰/۲	Ks_3
		۰/۲	KS_4
		۰/۲	Ks_6
		۰/۲	KS_5
زرین گل	۳	۱	Hap 2
		۰/۳۳	GZ_1
		۰/۳۳	Hap 3
		۰/۳۳	GZ_3
		۰/۳۳	GZ_4
مادرسو	۴	۱	Hap 4
		۱	Gz_2
		۱	Hap 5
		۱	Gz_5
		۱	Mp_1
		۰/۳۳	Mp_2
		۰/۳۳	Hap 7
صفارود	۴	۰/۳۳	Mp_3
		۰/۳۳	Mp_6
		۱	Mp_4
		۱	Hap 8
		۱	Hap 9
زالکی	۴	۱	Sd_1
		۱	Hap 10
		۱	Sd_2
		۱	Hap 11
		۰/۵	Sd_3
		۰/۵	Hap 12
		۱	Sd_4
زالکی	۴	۱	Hap 13
		۱	Zi_1
		۱	Hap 14
		۱	Zi_2
زالکی	۴	۱	Hap 15
		۱	Zi_3
		۱	Hap 16
زالکی	۴	۱	Hap 17
زالکی	۴	۱	Zi_4





شکل ۳: درخت فیلوژنی براساس روش تشابه حداکثر (Maximum likelihood)



شکل ۴: درخت فیلوژنی براساس روش نزدیک ترین همسایه (Neighbor-Joining)



به دو و با استفاده از مدل حداکثر درست‌نمایی ترکیبی (Tamura و همکاران، ۲۰۰۴) به دست آمده است. از آن‌جا که اعداد حاصله نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی می‌باشند، فاصله ژنتیکی بین دو گونه مرتبط با همبستگی فیلوژنتیکی بین آن گونه‌ها خواهد بود. در نتیجه از این شاخص می‌توان برای مشخص کردن دوری یا نزدیکی گونه‌ها از هم استفاده نمود (Hall، ۱۹۹۹) (جدول ۵ و ۶).

نتایج حاصل از آزمون فیلوژنتیکی براساس نزدیک‌ترین همسایه (Neighbor-Joining) با ارزش بوت استرپ ۱۰۰۰ برای ماهی‌های خیاطه به صورت درخت رسم شد که مشابه با نتایج روش تشابه حداکثر (Maximum likelihood) می‌باشد و آن را تایید می‌کند (شکل ۴).  
تفسیر نتایج حاصل از محاسبه  $F_{st}$  - ماتریس فواصل ژنتیکی هر یک از نقاط نمونه‌برداری: ماتریس فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها براساس مقایسه توالی‌های هر گروه با بقیه گروه‌ها به صورت دو

جدول ۵: ماتریس فواصل ژنتیکی هر یک از هابلوتایپ‌ها

Hap17	Hap16	Hap15	Hap14	Hap13	Hap12	Hap11	Hap10	Hap9	Hap 8	Hap 7	Hap 6	Hap 5	Hap 4	Hap 3	Hap 2	Hap 1	
۲/۸۰۴	۳/۶۸۶	۳/۶۸۶	۳/۴۲۰	۲/۹۷۱	۳/۴۲۰	۳/۵۵۶	۳/۱۲۹	۶/۹۲۲	۶/۵۱۱	۶/۹۲۲	۶/۶۳۳	۵/۹۱۵	۵/۹۱۵	۵/۹۸۵	۰/۹۹۹	Hap1	
۲/۹۷۱	۳/۸۱۲	۳/۸۱۰	۳/۵۵۶	۳/۱۲۹	۳/۵۵۶	۳/۶۸۶	۳/۲۷۸	۶/۹۷۸	۵/۲۲/۶	۹/۷۸/۶	۶/۹۲/۶	۵/۸۴۳	۵/۹۸۵	۵/۹۱۵	۱/۰۰۰	Hap2	
۵/۹۱۵	۶/۰۵۵	۶/۳۲۱	۶/۱۹۰	۵/۹۸۵	۶/۱۹۰	۶/۳۵۶	۵/۹۱۵	۷/۲۴۵	۶/۸۶۸	۷/۲۴۵	۶/۸۶۶	۱/۷۲۶	۰/۹۹۹		۳۸/۰۰۰	۳۹/۰۰۰	Hap3
۵/۸۴۳	۵/۹۸۵	۶/۲۵۶	۶/۱۲۳	۵/۹۱۵	۶/۱۲۳	۶/۱۹۰	۵/۸۴۳	۷/۱۹۳	۶/۸۰۹	۷/۱۹۳	۶/۸۰۹	۱/۹۹۱		۱/۰۰۰	۳۹/۰۰۰	۳۸/۰۰۰	Hap4
۵/۸۴۳	۵/۹۸۵	۶/۲۵۶	۶/۱۲۳	۵/۹۱۵	۶/۱۲۳	۶/۱۹۰	۵/۸۴۳	۷/۲۴۵	۶/۶۸۸	۷/۲۴۵	۶/۸۶۶		۴/۰۰۰	۳/۰۰۰	۳۷/۰۰۰	۳۸/۰۰۰	Hap5
۶/۹۷۸	۶/۹۹۲	۷/۰۸۷	۶/۹۷۸	۶/۹۷۸	۷/۰۸۷	۷/۰۷۸	۶/۹۹۲	۸/۸۹۷	۹/۰۵۷	۸/۸۶۴		۴۲۷/۰۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۷/۰۰	۴۲۰/۰۰	۴۳۱/۰۰	Hap6
۷/۲۴۵	۷/۱۴۰	۷/۲۹۷	۷/۱۹۳	۷/۱۹۳	۷/۲۳۴	۷/۳۴۷	۷/۱۹۳	-۰/۹۹۹	۷/۴۴۷		۹۹/۰۰۰	۴۲/۰۰	۴۲۱/۰۰	۴۲/۰۰	۴۲۵/۰۰	۴۲۶/۰۰	Hap7
۶/۸۰۹	۶/۸۰۹	۹/۹۹۲	۶/۸۰۹	۶/۸۰۹	۶/۹۹۲	۶/۹۹۲	۶/۸۰۹	۷/۴۹۶		۶/۴۰۰	۱۰/۵۰۰	۴۲۷/۰۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۷/۰۰	۴۲۲/۰۰	۴۳۲/۰۰	Hap8
۷/۲۴۵	۷/۱۴۰	۷/۲۹۷	۷/۱۹۳	۷/۱۹۳	۷/۳۴۷	۷/۳۴۷	۷/۱۹۳		۶۵/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱۰/۰۰	۴۲/۰۰	۴۲۱/۰۰	۴۲/۰۰	۴۲۵/۰۰	۴۲۶/۰۰	Hap9
۱/۴۱۱	۲/۴۳۴	۲/۴۳۴	۲/۴۳۴	۱/۷۲۶	۲/۴۳۴	۲/۴۳۴		۱/۰۰	۱۱/۰۰۰	۳۸/۰۰۰	۳۷/۰۰	۳۷/۰۰۰	۴۲۶/۰۰	۴۲۱/۰۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۱/۰۰	Hap10
۲/۲۲۴	۲/۶۲۶	۲/۲۲۴	۲/۶۲۶	۲/۴۳۴	۰/۹۹۹		۵/۰۰۰	۴۱۸/۰	۴۲۶/۰۰	۴۱۸/۰۰	۴۲۳/۰۰	۴۲/۰۰۰	۴۲/۰۰۰	۴۲/۰۰۰	۴۲/۰۰۰	۱۴/۰۰۰	Hap11
۱/۹۹۱	۲/۴۳۴	۲/۴۳۴	۲/۴۳۴			۴۲۶/۰	۴۲۳/۰	۶/۰۰۰	۴۱۸/۰۰	۴۱۸/۰۰	۴۲۳/۰۰	۴۱/۰۰۰	۴۱/۰۰۰	۴۲/۰۰۰	۱۲/۰۰۰	۱۲/۰۰۰	Hap12
۱/۷۲۶	۲/۲۲۴	۲/۲۲۴	-۰/۹۹۹		۵/۰۰۰	۶/۰۰۰	۳/۰۰۰	۴۲۱/۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۱/۰۰	۴۲۵/۰۰	۳۸/۰۰۰	۳۸/۰۰۰	۳۹/۰۰۰	۱۰/۰۰۰	۹/۰۰۰	Hap13
۱/۹۹۱	۱/۹۹۱	۱/۹۹۱		۳/۰۰۰	۶/۰۰۰	۷/۰۰۰	۶/۰۰۰	۴۲۱/۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۱/۰۰	۴۲۵/۰۰	۴۱/۰۰۰	۴۱/۰۰۰	۴۲/۰۰۰	۱۲/۰۰۰	۱۲/۰۰۰	Hap14
۲/۴۳۴	۱/۹۹۱		۴/۰۰۰	۵/۰۰۰	۶/۰۰۰	۵/۰۰۰	۶/۰۰۰	۴۱۹/۰	۴۲۶/۰۰	۴۱۹/۰۰	۴۲۳/۰۰	۴۳/۰۰۰	۴۳/۰۰۰	۴۴/۰۰۰	۱۵/۰۰۰	۱۴/۰۰۰	Hap15
۲/۴۳۴		۱۴/۰۰	۱۵/۰۰	۴۰/۰۰	۳۹/۰۰	۳۹/۰۰	۴۲۶/۰	۴۲۳/۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۳/۰۰	۶/۰۰۰	۷/۰۰۰	۶/۰۰۰	۵/۰۰۰	۲/۰۰۰	۴/۰۰۰	Hap16
	۶/۰۰۰	۶/۰۰۰	۴/۰۰۰	۱/۰۰۰	۴/۰۰۰	۵/۰۰۰	۲/۰۰۰	۴۲۰/۰	۴۲۸/۰۰	۴۲۰/۰۰	۴۲۵/۰۰	۳۷/۰۰۰	۳۷/۰۰۰	۳۸/۰۰۰	۹/۰۰۰	۸/۰۰۰	Hap17

شاخص مخصوص  $F_{st}$  جمعیت‌ها: اگر دو جمعیت دارای فراوانی آللی یکسانی باشند، تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها وجود نداشته و  $F_{st}$  برابر صفر است. حال اگر دو جمعیت دارای آلل‌های کاملاً متفاوت در هر لوکوس باشند، مقدار  $F_{st}$  برابر با یک است. اگر مقادیر  $F_{st}$  بین ۰-۰/۰۵ باشد، معمولاً آن‌را به عنوان تفاوت ژنتیکی اندک، مقادیر ۰/۲۵-۰/۰۵ به عنوان تفاوت ژنتیکی متوسط و مقادیر بیش از ۰/۲۵ را تحت عنوان تفاوت ژنتیکی بارز قلمداد می‌کنند.

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی تعداد ۲۶ نمونه از ۵ منطقه محاسبه شد (جدول ۷). در تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی ماهی خیاطه براساس جفت‌باز (Pairwise difference) شاخص تثبیت  $F_{st}$  برابر ۰/۹۳۱۷۱ برآورد شد (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶) که نشان از تنوع ژنتیکی بالا این ماهی در حوزه‌های نمونه‌برداری دارد (جدول ۷).





جدول ۶: ماتریس فواصل ژنتیکی هر یک از نقاط نمونه برداری

A, b	Zi4	Zi3	Zi2	Zi1	Sd5	Sd4	Sd3	Sd2	Sd1	Mp5	Mp4	Mp3	Mp2	Mp1	GZ7	GZ6	GZ5	GZ4	GZ3	GZ2	GZ1	Ks6	Ks5	Ks4	Ks3	Ks2	Ks1	
																											KS1	
																												KS2
																												KS3
																												KS4
																												KS5
																												Ks6
																												GZ1
																												GZ2
																												GZ3
																												GZ4
																												GZ5
																												Mp1
																												Mp2
																												Mp3
																												Mp4
																												Mp5
																												Sd1
																												Sd2
																												Sd3
																												Sd4
																												Sd5
																												Zi1
																												Zi2
																												Zi3
																												Zi4
																												A, b

جدول ۷: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نرم افزار ARLEQUIN

(۳,۱ Schneider و همکاران، ۲۰۰۶)

درجه آزادی (DF)	مجموع مربعات (SS)	واریانس ترکیبی (VC)	درصد تغییرات (PV)
۴	۱۹۸/۶۷۴	۹۴/۶۲۱۳۸	۹۳/۱۷
۲۱	۱۴۵/۶۳۳	۶/۹۳۴۹۲	۶/۸۳
۲۵	۲۱۳۱/۳۰۸	۱۰۱/۵۵۶۳۰	

شاخص تثبیت یا Fst: ۰/۹۳۱۷۱

جدول ۸: شاخص مخصوص Fst جمعیت‌های نمونه برداری

جمعیت	اسم	Fst
۱	KS	۰/۹۴۴۵۹
۲	GZ	۰/۹۴۳۴۱
۳	MP	۰/۸۹۵۰۳
۴	SD	۰/۹۴۱۳۳
۵	ZI	۰/۹۴۰۷۹

### بحث

DNA میتوکندریایی دارای محدودیت‌های خاصی می‌باشد (Fank و همکاران، ۲۰۰۳) که باید مورد توجه قرار گیرد. امروز برای شناسایی گونه‌ها روشی تحت عنوان بار کدگذاری DNA در حال گسترش می‌باشد (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳). بار کدگذاری DNA روشی نوین را برای شناسایی گونه‌ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA، به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می‌کند (Kras و همکاران، ۲۰۰۵). ژن سیتوکروم b یکی از ژن‌های موجود در میتوکندری می‌باشد که به عنوان نشانگری مناسب برای شناسایی موجودات در سطح جنس و گونه به کار می‌رود (Kras و همکاران، ۲۰۰۵). تغییرات بین گونه‌های ماهی خیاطه استان‌های حوزه شمالی کشور نشان از جدایی جمعیتی در بین گونه‌های این جنس در پنج حوزه مطالعاتی دارد.

برطبق نظر متخصصان ماهی خیاطه در ایران، به نام *A. bipunctatus* شناخته می‌شد. اما هدف از این مطالعه مرور و نگاهی کلی در خصوص



جمعیت‌های ایرانی کاملاً مجزا از سایر گونه‌های می‌باشد و گونه‌های *A. kubanicus* و *A. fasciatus* نسبت به سایر گونه‌های جنس *Alburnoides* نزدیکی بیش‌تری به گونه‌های ایران دارد (شکل ۵).

ماتریس فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت نوکلئوتیدی موجود در بین دو توالی است. میزان واگرایی ژنتیکی بین گونه‌های متفاوت به‌مراتب از واگرایی ژنتیکی درون گونه‌ای بیش‌تر است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۸). نمونه‌های حوزه مادر سو فاصله ژنتیکی زیادی با سایر گونه‌ها این پژوهش و *A. bipunctatus* دارد. این فاصله را می‌توان از روی درخت فیلوژنتیکی و هم رسم شبکه هاپلوتایپی و هم چنین جدول تجزیه و تحلیل واریانس ملکولی مشاهده کرد. رسم هاپلوتایپی، توالی نمونه‌های این پژوهش با توالی‌های موجود در GenBank و NCBI و مطالعه Seifali و همکاران (۲۰۱۲)، صحت درخت فیلوژنتیکی این پژوهش را تایید می‌کند (شکل ۶).

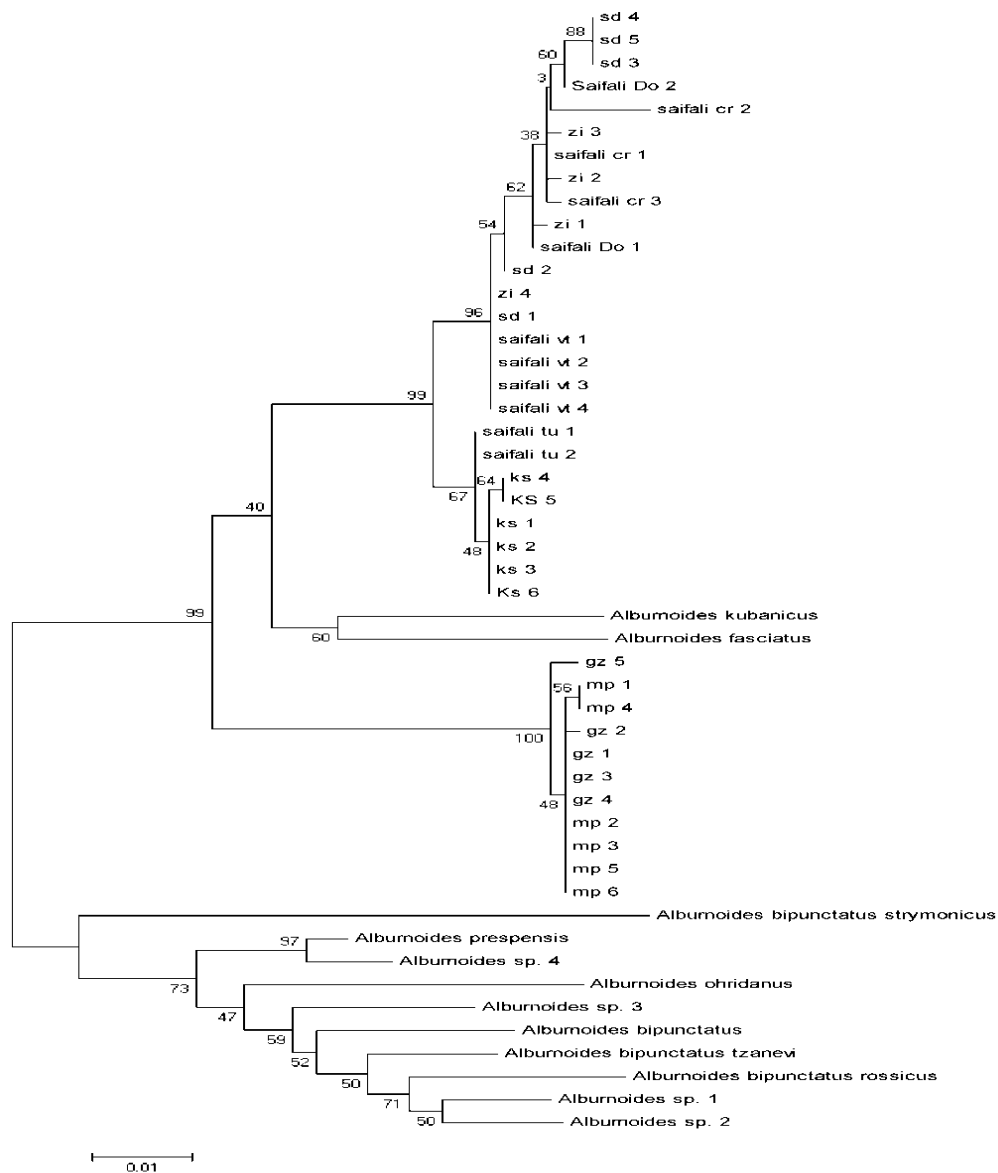
هم‌چنین نتایج به‌دست آمده در این پژوهش موید فرضیه Zardoya و Doadrio (۱۹۹۹)، Zehzad و همکاران (۱۹۹۹) در خصوص توزیع جغرافیایی زیستی جمعیت‌هاست به‌طوری‌که قطعه قطعه شدن زمین احتمالاً عامل اصلی تمایز مولکولی مشاهده شده در حوزه‌های جغرافیایی زیستگاه‌های ماهی بوده و توجیحات احتمالی برای اشتقاق در جمعیت‌های ماهی می‌توانند مکانیسم‌های رفتاری و موانع جریان و رانش ژنی باشند. بر طبق گفته Mendel و همکاران (۲۰۰۸)، تجزیه تحلیل ژن میتوکندریایی سیتوکروم b نشان داده شده است که *A. bipunctatus* یک گروه پیچیده است که از فرانسه تا افغانستان مشاهده شده و ۵ گروه تک‌نمایی به نام‌های ۱ (*A. bipunctatus*)، ۲ (فرانسه، جمهوری چک، اسلواکی)، ۳ (*Alburnoide ssp*)، ۴ (یونان، *A. bipunctatus* و *ohridanus*)، از پایگاه داده بانک ژنی، یونان، ۵ (*Aburnoides spp*) روسیه) شامل می‌شود. براساس این شواهد، *Alburnoides* و جمعیت‌های آن در حوزه‌های کوهستانی زاگرس و البرز و فلات ایران تشکیل یک گروه تک‌نمایی داده است. در نهایت هدف این مطالعه مرور و نگاهی کلی در خصوص رابطه بین جمعیت‌های *Alburnoides* (Bloch, 1782) در چهار حوزه شمالی ایران بود. نتایج داده‌های مولکولی، اطلاعات مفیدی را برای اصلاح موقعیت

رابطه بین جمعیت‌های جنس *Alburnoides* (Bloch, 1782) در پنج رودخانه حوزه شمالی کشور بود. آنالیزهای مولکولی داده‌های توالی نوکلئوتیدی سیتوکروم b از جمعیت‌های جنس *Alburnoides* نشان می‌دهد که *A. bipunctatus* یک نام معتبر برای جمعیت‌های ایرانی نیست، زیرا برون گروه‌های این مطالعه (*A. bipunctatus ohridanus*) از گونه‌های جنس *Alburnoides* ایران جدا افتاد. توصیف تاکسون‌های جدید *Alburnoides* از جمله *A. namaki* در حوزه نمک، *A. qanati* در حوزه کر، *A. petrubanarescui* در ارومیه، *A. nicolausi* در دجله و فرات و *A. idignensis* در دجله و فرات که قبلاً به‌صورت گروه ترکیبی *A. bipunctatus* در نظر گرفته می‌شد و تاریخچه‌های ژئومورفولوژی مجزایی را از این حوزه‌ها نشان می‌دهد. در تجزیه و تحلیل واریانس ملکولی بالا بودن واریانس ترکیبی و ضریب تغییرات بین جمعیت نشان از جزایان ژنی کم بین جمعیت و جدا شدن آن‌ها می‌باشد. هم‌چنین بالا بودن Fst نشان از تنوع ژنتیکی بالا این ماهی در حوزه‌های نمونه‌برداری حکایت می‌کند و این فاکتور تحت تأثیر جنبه‌های مختلفی از بوم‌شناسی و تاریخچه دموگرافی گونه است و تبادل ژنی یک عامل کلیدی در جمعیت‌ها است و می‌تواند بر متغیرهای مختلف جمعیت نظیر اندازه جمعیت، تنوع ژنتیکی، سازگاری محلی و در نهایت گونه‌زایی موثر باشد. نتایج درخت فیلوژنی بیانگر وجود سه جمعیت و تفاوت جمعیتی غرب و شرق حوزه شمالی می‌باشد. نمونه‌های جمعیتی غربی (حوزه سفیدرود) شامل رودخانه‌های صفارود و زالکی را می‌توان به‌صورت *A. eichwaldii* در نظر گرفت در حالی که می‌توان جمعیت‌های رودخانه کسلیان را نیایی مجزا نامید (*Alburnoides ssp1*). نمونه‌های جمعیتی شرقی (حوزه گرگانرود) کاملاً مجزا از نمونه‌های دیگر بوده و گونه‌های کاملاً متفاوتی را به‌وجود آورده‌اند (*Alburnoide ssp2*). نتایج این پژوهش با نتایج Seifali و همکاران (۲۰۱۲) که نشان دادند *A. bipunctatus* یک نام معتبر برای جمعیت‌های ایرانی ماهی خیاطه نیست و ماهی خیاطه حوزه سفیدرود شمال ایران را باید گونه‌ای با نام علمی *A. eichwaldii* نامید، هم‌خوانی دارد. رسم درخت فیلوژنی براساس تشابه حداکثر (Maximum likelihood) جهت مقایسه جمعیت‌های ایرانی *Alburnoides* با توالی‌های موجود در GenBank و NCBI نشان داد که



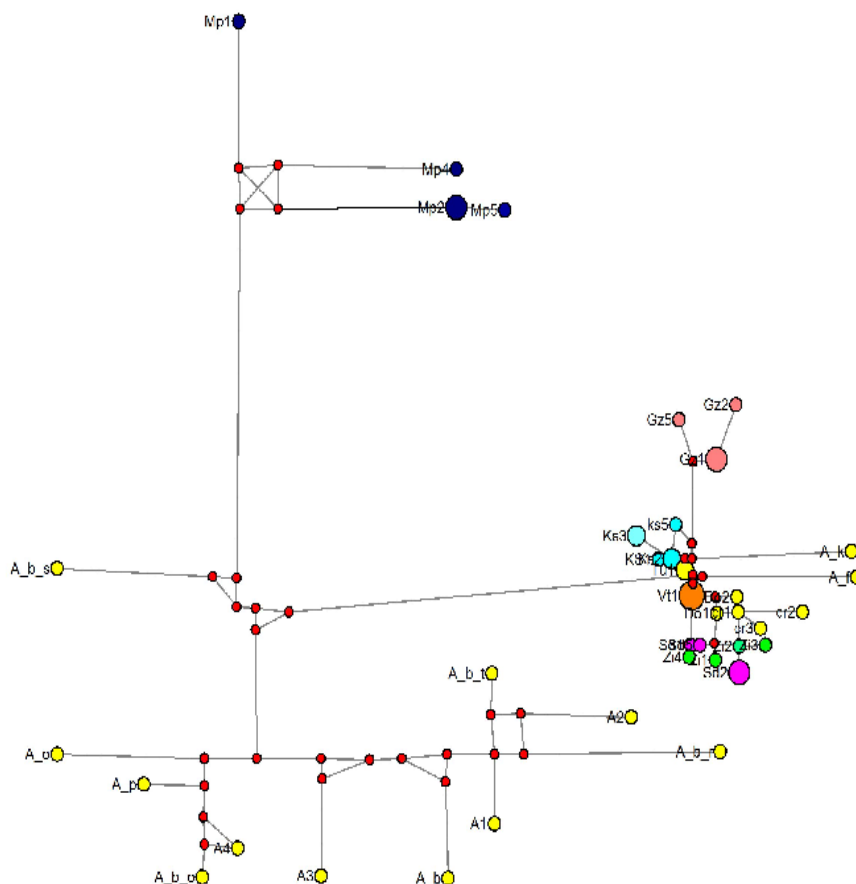
*bipunctatus* در جنوب دریای خزر ایران وجود ندارد و جمعیت‌های غربی و شرقی تاکسون‌های مجزایی می‌باشند.

سیستماتیک جمعیت‌های *Albumoides* در جنوب دریای خزر در اختیار می‌گذارد. این شواهد مولکولی موید این فرضیه است که A.



شکل ۵: درخت فیلوژنی ماهی خیاطه با مطالعه Seifali و همکاران (۲۰۱۲)، NCBI و GenBank





شکل ۶. شبکه هاپلوتايبها ۲۶ نمونه ماهی خیاطه با مطالعه Seifali و همکاران (۲۰۱۲)، NCBI و GenBank

## منابع

۱. احمدی، ا.؛ وثوقی، ع.؛ وطن دوست، ص.؛ قلیچی، ا. و صیدانلو، ز.، ۱۳۹۰. خصوصیات ساختار جمعیتی ماهی خیاطه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آذرشهر. سال ۵، شماره ۲، صفحات ۶۵ تا ۸۰.
۲. پاتیمار، ر. و دولتی، ف.، ۱۳۸۶. بررسی سن و رشد و تولیدمثل گونه خیاطه در رودخانه زرین گل (البرز شرقی). مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آذرشهر. سال ۱، شماره ۲، صفحات ۵۵ تا ۶۲.
۳. جعفری، ع.، ۱۳۸۴. گیتاشناسی ایران. رودها و رودخانه‌های ایران. انتشارات هامون. ۵۴۴ صفحه.
۴. عباسی، ف.، ۱۳۹۰. مطالعه پویایی جمعیت ماهی خیاطه *Alburnoides bipunctatus* در رودخانه‌های تیل آباد، کیودوال و شیرآباد استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۷۸ صفحه.
۵. فرداصفهانی، پ. و الهیاری، م.، ۱۳۸۶. ترجمه ژنوم ۳، براون، ت.ا.، (مؤلف). انتشارات خسروی. ۷۷۲ صفحه.
۶. قره یاضی، ب.، ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات ایران، مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان.



۲۲. **Kirchhofer, A. and Heffi, D., 2008.** Conservation of endangered freshwater fish in Europe. Birkhauser Verlag, Basel, Boston & Berlin. pp: 249-258.
۲۳. **Kirchofer, A., 1997.** The assessment of fish vulnerability in Switzerland based on distribution data. Biological Conservation. Vol. 80, No. 1, pp: 1-8.
۲۴. **Kottelat, M., 1984.** Revision of the Indonesian and Malaysian loaches of the subfamily Noemacheilinae. Japanese Journal of Ichthyology. Vol. 31, No. 3, pp: 225-260.
۲۵. **Ladiges, W. and Vogt, D., 1979.** Suswasser fische Europas. Paul Parey, Hamburg and Berlin. 299 p.
۲۶. **Lusk, S.; Luskova, V.; Halaska, K. and Slechta, V., 1998.** Treda and production of fish communities of the barbell zone in a stream of the Czech Republic. Folia zool.
۲۷. **Mendel, J.; Lusk, S.; Halačka, K., 2008.** Genetic diversity of spiralin, *Alburnoides bipunctatus*, with notes on its occurrence. Biodiverzita ichtyofauny CR (VII). pp: 25-37.
۲۸. **Movchan, Y.V. and Smirnov, A. I., 1983.** Fauna of the Ukraine: Fishes, Issue Cyprinids, Part 2. Shemaya, Verkhovodka, Bistryanka, Ploskirka, Abramis, Ribets', Chekhonya, Girchak, Karas', Korop, Gipofal'mikhtis, Aristikhtis. Vol. 8.
۲۹. **Penaz, M., 1995.** *Alburnoides bipunctatus*. In: Baruš, V. and Oliva, O. (eds), Fauna ČR a SR/Mihulovci a ryby. Vol. 2, pp: 151-154.
۳۰. **Ried, K., 2004.** Global register of migratory species from global regional scales. Final report of the R and D project 808 05 081. Federal Agency for Natural conservation, Bonn, Germany. 289 p.
۳۱. **Schneider, S.; Roessli, M. and Excoffier, L., 2004.** ARLEQUIN3.1: A software for population genetics data analysis (ARLEQUIN) software version 3.1. Molecular Biology and Evolution. Vol. 24, pp: 1596-1599.
۳۲. **Schneider, S.; Roessli, M. and Excoffier, L., 2004.** NETWORK4.6: A software for population genetics data analysis (ARLEQUIN) software version 3.1. Molecular Biology and Evolution. Vol. 24, pp: 1596-1599.
۳۳. **Seifali M.; Arshad A.; Nurul Amin, S.M.; Hasanzadeh Kiabi, B.; Esmaeili, H.R. and Yazdani Moghaddam, F., 2012.** Population dynamics of Caspian spiralin (*Actinopterygii: Cyprinidae*) in the Kesselian Stream, Iran. African Journal of Biotechnology. Vol. 11, No. 38, pp: 9214-9222.
۳۴. **Sokolov, L.I.; Tsepkin, E.A.; Lapin, V.I. and Mikulin, A.E., 1986.** Fishes of the Basin of the Moskva River (Mosk. Gos. Univ., Moscow, [in Russian].
۳۵. **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 24, pp: 1596-1599.
۳۶. **Tamura, K. and Nei, M., 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of
۷. **ملکیان، م.، ۱۳۸۹.** ترجمه بوم‌شناسی مولکولی، فریلند، ج. (مؤلف). جهاد دانشگاهی مشهد، ۳۰۴ صفحه.
۸. **نیکدل، ک.؛ یوسفی سیاه‌کلرودی، س. و عسگری جعفرآبادی، ق.، ۱۳۸۹.** مطالعه فیلوژنتیک جمعیت گوسفند وحشی *orientalis Ovis* در منطقه تنگ صیاد و کرابی. محیط زیست جانوری. سال ۲، شماره ۲، صفحات ۶۷ تا ۷۲.
۹. **Bancroft, D.R.; Pemberton, J.M. and King, P., 1995.** Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic ungulate population. Heredity. Vol. 74, pp: 326-336.
۱۰. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Rouhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies: Molecular networks for inferring intraspecific phylogenies, Molecular Biological. Evolutionary. Vol. 16, pp: 37-48.
۱۱. **Beaumont, A. and Hore, K., 2003.** Biotechnologist and Genetics in Fisheries and aquaculter. Wiley-Blackwell. 50 p.
۱۲. **Berg, L.S., 1949.** Presnovodnye ryby Irana i sopredel'nykh stran [Freshwater fishes of Iran and adjacent countries. Trudy Zoologicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR. Vol. 8, pp: 783-858.
۱۳. **Bless, R., 1996.** Reproduction and habitat preference of the threatened spiralin (*Alburnoides bipunctatus* Bloch) and soufie (*Leuciscus souffia* Risso) under laboratory conditions (Teleostei: Cyprinidae).
۱۴. **Bless, R., 2001.** Spawning and niche shift of some threatened riverine fishes of Europe. Large Rivers. Vol. 12, No. 2-4, pp: 293-305.
۱۵. **Bogutskaya, N.G., 1997.** Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 2. An annotated checklist of leuciscine fishes (Leuciscinae, Cyprinidae) of Turkey with descriptions of a new species and two new subspecies. Mitteilungen Hamburgisches Zoologisches Museum und Institut. Vol. 94, pp: 161-186.
۱۶. **Breitenstein, M.E. and Kirchhofer, A., 2000.** Growth, age structure and species association of the cyprinid *Alburnoides bipunctatus* in the River Aare, Switzerland. Folia Zool. Vol. 49, No. 1, pp: 59-68.
۱۷. **Cihar, J., 1999.** A field guide in colour to fresh water fish. Blitz edition. Leicester.
۱۸. **Coad, B., 2005.** Iranian freshwater fishes. <http://www.briancoad.com>
۱۹. **Goldaspilk, C.R., 1979.** The population density, Growth rate and production of roach *Rutilus rutilus* in Tjeukemeer. Fish Biology. Vol. 15, pp: 473-498.
۲۰. **Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor & analysis program for Windows 95/98/NT, In: Nucleic Acids Symposium Series. Vol. 41, pp: 95-98.
۲۱. **Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemlak, T.S.C. and Francis, M., 2004.** Identification of Birds through DNA Barcodes. Plos Biology. Vol. 2, pp: 1657-1663.



- mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 10, pp: 512-526.
۳۷. **Treer, T.; Habecovic, D.; Anicic, I. and Safner, R., 2000.** Growth of Five Spirlin (*Alburnoides bipunctatus*) Population from the Croatian River. *Agr. Consp. Scientificus*. Vol. 65, pp: 175-180.
۳۸. **Tsepkin, E.A., 2003.** *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) Riffle Minnow, in *Atlas of Freshwater Fishes of Russia* (Nauka, Moscow). Vol. 1, pp: 200-202.
۳۹. **Yildirim, A.; Erdogan, O.; Turkmen, M. and Demir, B., 1999.** The investigation of some Reproduction characteristics of the *Alburnoides bipunctatus faciatiss* (Nordman, 1840) living in Oltu stream. Coruh Basin. *Journal of veterinary and Animal sciences*. Vol. 23, pp: 679-686.
۴۰. **Zardoya, R. and Doadrio, I., 1999.** Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J. Mol Evol*. Vol. 49, pp: 227-237.
۴۱. **Zehzad, B.; Hasanzadeh Kiabi, B. and Madjnoonian, H., 2002.** The natural areas and landscape of Iran: an overview. *Zoology in the Middle East*. Vol. 26, pp: 7-10.
۴۲. **Zhukov, P.I., 1988.** *Guide on the Ecology of Freshwater Fish* (Nauka i Tekhnika, Minsk.) [in Russian].
۴۳. **Živković, D. and Jovanović, B., ۲۰۱۱.** Spatial morphometric plasticity of spiralin *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, ۱۷۸۲) phenotype from the Nišava River, Serbia, Danube.

