

تبارشناسی و مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* De Filippi 1986) براساس ژن سیتوکروم b، 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: 49175-487
- **حمیدرضا رضایی:** گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
- **مهوش سیف‌علی:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران
- **سحر رضایی*:** گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی: 1144

تاریخ دریافت: مرداد 1395 تاریخ پذیرش: آبان 1395

چکیده

ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* (De Filippi 1863) جزء ماهیان با اندازه کوچک از کپورماهیان، بنتوپلاژیک، رودرو، ساکن آب شیرین و لبشور بوده و محدوده اسیدیته 7-8 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. به‌دلیل اندازه کوچک از نظر صید ورزشی و شیلاتی ارزش چندانی ندارد. در این پژوهش به‌علت نبود مطالعات ملکولی منسجم این گونه، تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه در پنج رودخانه زرین‌گل، مادرسو، صفارود، کسپلیان، زالکی در حوزه شمالی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد 26 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 17 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 به‌صورت *A. eichwaldii* در نظر گرفت درحالی‌که می‌توان گفت جمعیت‌های رودخانه کسپلیان 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 به‌وجود آورده‌اند (*Alburnoides* sp2).

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

مقدمه

مرکزی پراکنده شده‌اند (Kottelat، 1984؛ Berg، 1945). در بخشی از اروپا، اتحاد جماهیر شوروی سابق، در حوزه دریای سیاه و دریای کاسپین و همچنین شاخه‌رودخانه‌های جنوبی دریای بالتیک حضور دارند (Tsepkin، 2003؛ Bogutskaya، 1998؛ Sokolov و همکاران، 1992؛ Movchan و همکاران، 1989؛ Zhukov، 1988؛ Berg، 1949). بیش‌تر در قسمت مرکزی قاره اروپا از سواحل اطلس در فرانسه تا دریاچه کاسپین (بیش‌تر در قسمت‌های شرقی) گسترش یافته‌اند (Ladiges و همکاران، 1979).

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، 2005). ماهی خیاطه در هر دو نوع آب‌های جاری و راکد ساکن شده

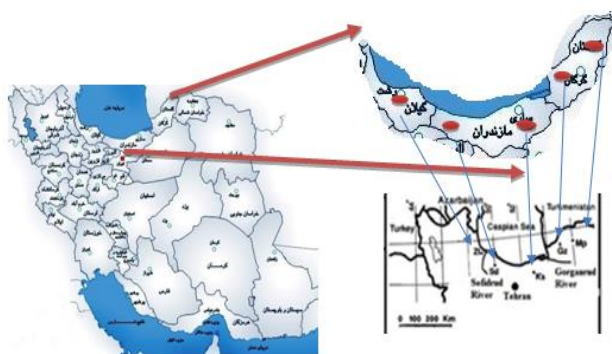
ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* (De Filippi 1863) جزء ماهیان با اندازه کوچک از خانواده کپورماهیان، بنتوپلاژیک، رودرو، ساکن آب شیرین و لبشور بوده و محدوده اسیدیته 7-8 را تحمل می‌کند (Ried، 2004). عمدتاً در مناطق کم عمق و جریان‌دار نهرهای کوهستانی، ساکن شده است. این ماهیان بسترهای سنگی سخت و آب‌های تمیز و سرشار از اکسیژن را ترجیح می‌دهند (Penaz، 1995). اهمیت ماهی خیاطه در شیلات، معمولاً به‌عنوان طعمه برای صید و از لحاظ تفریحی نگهداری در آکواریوم می‌باشد (Bogutskaya، 1997). 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 آسیا



مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این پژوهش تعداد 26 نمونه به‌صورت کاملاً تصادفی و با استفاده از دستگاه الکتروشوکر در پاییز 92 از حوزه‌هایی که در جدول 1 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 1، شکل 1).

ردیف	استان نمونه‌برداری	محل جمع‌آوری نمونه‌ها و تعداد نمونه	تعداد نمونه
1	گلستان	گرگان‌رود - زرین‌گل	5
		گرگان‌رود - مادرسو	6
2	مازندران	صفا رود	5
		کلیسیان	6
3	گیلان	سفیدرود - زالکی	4



شکل 1: نقشه جابجایی مناطق نمونه‌برداری

مطالعات مولکولی: 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 2720 صورت گرفت. حجم واکنش 50 میکرولیتر که با استفاده از کیت PCR محصول شرکت Bioneer صورت گرفت. در داخل هر تیوب PCR به مقدار 3 میکرولیتر از DNA، 1 میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، 0/5 میکرولیتر Taq-polymerase، 1 میکرولیتر dNTPs، 5 میکرولیتر 10X Buffer به‌همراه 38/5 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر ریخته شد. همچنین برای بررسی میزان کمی و کیفی DNA استخراج‌شده از ژل آگارز 2% استفاده شد. بدین منظور DNA استخراج شده روی ژل آگارز (بر حسب اندازه DNA) الکتروفورز گردید.

است. عمدتاً از موجودات پلانکتونی و بنتوزهای کوچک و هم-چنین حشراتی که از هوا در آب افتاده‌اند تغذیه می‌کند (Živković و همکاران، 1971). 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، 2000). شرایط زندگی این ماهی در اروپا به‌علل مختلف نامناسب بوده و در بسیاری از آب‌های اروپا رو به انقراض است (Kirchofer، 1997). در جمهوری چک این ماهی به صورت قانونی تحت حفاظت است (Lusk و همکاران، 1998). 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، 2005). 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 می-نمایند. ویژگی‌های متفاوت DNA میتوکندریایی مانند اندازه کوچک و یکسان بودن ترتیب قرارگیری ژن‌ها، آن را به یک نشانگر پرکاربرد 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 آز-مون-های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تست DNA امکان برآورد صحیح از شاخص‌های ژنتیک جمعیت وجود ندارد (نیکدل و همکاران، 1389).

هدف از انجام این تحقیق بررسی وضعیت تنوع ژنتیکی این گونه در 5 رودخانه واقع در شمال ایران با استفاده از روش-های 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 آبزیان 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.

نتایج

در این مطالعه در مجموع 26 توالی جزئی سیتوکروم b از پنج رودخانه شمالی ایران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در میان 774 جفت باز ژن سیتوکروم b میتوکندریایی، 130 مکان جفت باز متغیر بوده و 92 مکان جفت باز دارای اطلاعات فیلوژنتیکی مفید بودند. فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها در نرم افزار MEGA5 محاسبه و آورده شده است. باز یواسیل بیشترین فراوانی و باز گوانین کمترین فراوانی را داشتند (Tamura و همکاران، 2007) (جدول 2).

جدول 2: فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*)

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
فراوانی	26/36	27/47	26/87	19/30

میزان جانشینی نوع اول (جانشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و جانشینی نوع دوم بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) برآورد شد (Tamura و همکاران، 2007). تخمین الگو جانشینی نوع اول و دوم که به صورت پررنگ نشان داده شده‌اند، نرخ جانشینی نوع اول را بیان می‌کنند و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانشینی نوع دوم هستند. الگوهای جانشینی و نرخ‌ها براساس مدل تامورا نئی در نرم‌افزار مگا برآورد شده است (Tamura و Nei، 1993) (جدول 3).

شبکه هاپلوتایپی: شبکه هاپلوتیپی ارتباطات تکاملی بین هاپلوتیپ‌ها را به صورت گرافیکی نشان می‌دهد (ملکیان، 1389).

جدول 3: تخمین الگو جانشینی نوع اول و دوم از توالی‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi*)

نوکلئوتید	A	T/U	C	G
A	-	5/6	5/48	14/99
T/U	5/37	-	11/75	3/94
C	5/37	12/01	-	3/94
G	20/47	5/60	5/48	-

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، 1386). گره‌هایی که در شبکه هاپلوتایپی وجود دارند همان توالی‌های منقرض شده یا توالی‌های ناشناخته در این مطالعات هستند، که در بیش‌تر شبکه‌های هاپلوتایپی وجود دارند. در این پژوهش تعداد هاپلوتایپ 17 عدد و تنوع هاپلوتایپ 0/947 می‌باشد. در شبکه

برای انجام PCR از یک جفت پرایمر 774 جفت بازی با مشخصات (5' TGACTTGAARAACCAAYCGTT 3', forward) و GluDG.L cb6b.H (5' GGAATTCACCTCTCC 3', reverse) استفاده شد. همچنین برنامه حرارتی برای چرخه PCR شامل مراحل دناتوراسیون 95° سانتی‌گراد (برای 1 دقیقه)، اتصال 47° سانتی‌گراد (برای 1 دقیقه)، گسترش یا طولیل شدن 72° سانتی‌گراد (برای 1 دقیقه)، انجام شد (Bancroft و همکاران، 1995). همچنین برای گونه‌هایی که با روش ذکر شده تکثیر قطعه مورد نظر صورت نمی‌گرفت از روش touch down شامل مراحل دناتوراسیون 95° سانتی‌گراد (برای 45 ثانیه)، اتصال 54° سانتی‌گراد تا 45° چرخه اول تا چرخه دهم <44° چرخه 11 تا 44° (برای هر چرخه 45 ثانیه) و گسترش یا طولیل شدن 72° سانتی‌گراد (برای 1 دقیقه) انجام گرفت.

توالی‌یابی: مقدار 20 میکرولیتر از محصولات

PCR خالص‌سازی شد و به همراه 100 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 10 پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3730 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردیدند.

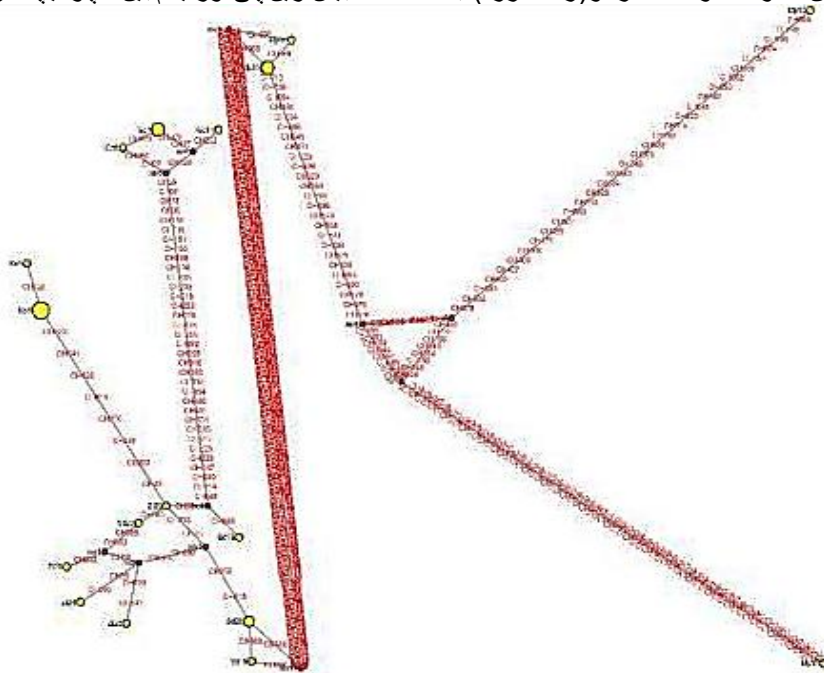
تجزیه و تحلیل نتایج: نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده

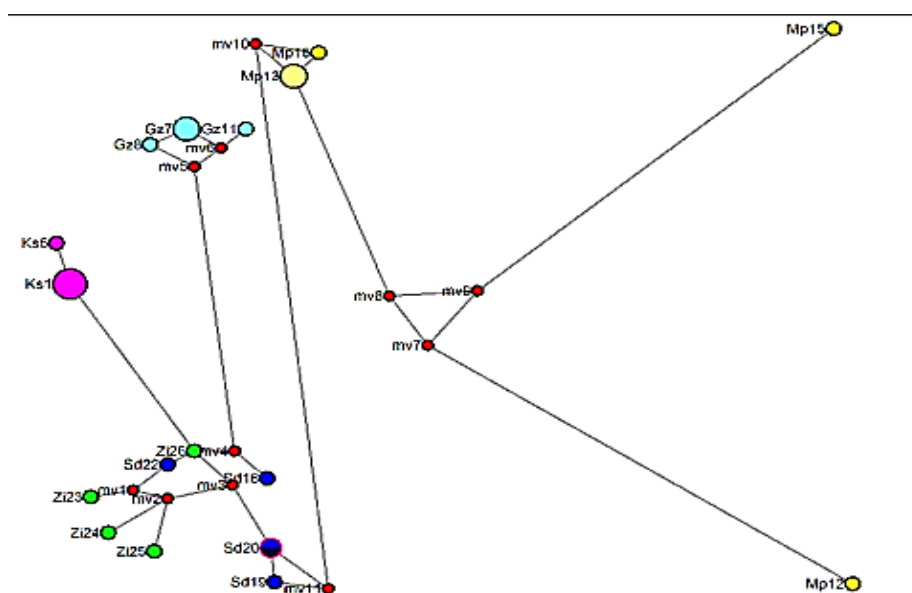
از نرم‌افزارهای Seqscape و MEGA5 (Tamura و همکاران، 2007) ویرایش شدند و در نرم‌افزار ARLEQUIN3.1 و NETWORK4.6 (Schneider و همکاران، 2006) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نمونه توالی‌های ثبت شده ماهی خیاطه از سایت NCBI به عنوان منبع در نرم‌افزار Seqscape، برای مرتب کردن توالی‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Bandelt و همکاران، 1999). ردیف آرای توالی‌ها در نرم‌افزار MEGA5 صورت گرفت. در نهایت درخت فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور (Neighbor-joining) با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 براساس مدل تامورا نئی (Tamura و Nei، 1993) ترسیم گردید که در ترسیم درخت فیلوژنی از توالی ماهی خیاطه (*Alburnoides bipunctatus ohridanus*) ثبت شده در ژن بانک به عنوان برون گروه (Outgroup) استفاده شد (Tamura و همکاران، 2007). با استفاده از نرم‌افزار NETWORK4.6 شبکه هاپلوتیپی براساس روش اتصال میانه (Median joining) ترسیم گردید (Bandelt و همکاران، 1999). پارامترهایی چون فراوانی نوکلئوتیدی و تخمین الگوهای جانشینی نوکلئوتیدی براساس حداکثر احتمال ترکیب (Maximum Composite Likelihood) در نرم‌افزار MEGA5 محاسبه گردید (Tamura و همکاران، 2007). همچنین پارامترهای تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی، آماره Fst و نیز فراوانی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار ARLEQUIN3.1 محاسبه گردید (Schneider و همکاران، 2006).



فاصله زیادی از دیگر حوزه‌ها قرار گرفته‌اند و گونه‌ای کامل جدا را تشکیل داده‌اند. همچنین جمعیت کلیسیان (رنگ‌صورتی) 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 6 و 8 (حوزه مادرسو) دارای بیش‌ترین تعداد نقاط قرمز با نقطه مجاور است، پس بیش‌ترین پلی‌مورفیسم بین هاپلوتایپ‌ها را شامل می‌شود.

هاپلوتایپی اندازه دایر 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 2 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





شکل 2: شبکه هاپلوتایپی نمونه‌های مورد مطالعه

و تنوع ژنتیکی بالا بین دو قسمت غربی و شرقی و جدا شدن جمعیت این دو مناطق می‌باشد (جدول 4).

درخت فیلوژنتیکی: نتایج حاصل از آزمون فیلوژنتیکی براساس تشابه حداکثر (Maximum likelihood) با بوت استرپ 1000 مرتبه براساس TN93+G رسم گردید (شکل 3). 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 هاپلوتایپ شماره 1 (حوزه کسلیان) کمترین تعداد خط قرمز با نقطه مجاور است، پس کمترین پلی مورفیسم بین هاپلوتایپ‌ها را شامل می‌شود.

فراوانی هاپلوتایپ‌ها و تفسیر نتایج شبکه هاپلوتایپ: محاسبه فراوانی نسبی هاپلوتایپ‌های 5 منطقه مورد مطالعه، در مجموع 17 هاپلوتایپ مشخص شد که کمترین هاپلوتایپ‌ها 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 هاپلوتایپ‌ها نشان از تنوع ژنتیکی زیاد بین این مناطق می‌باشد. وجود 7 هاپلوتایپ در مناطق شرقی (زرین گل و مادرسو) و 8 هاپلوتایپ در مناطق غربی (صفارود و زالکی) نشان از تفاوت

جدول 4: فراوانی نسبی هاپلوتایپ‌ها در مناطق مختلف نمونه برداری

منطقه	تعداد هاپلوتایپ	فراوانی هاپلوتایپ	کد هاپلوتایپ
کسلیان	2	0/2	Ks_1 Hap 1
		0/2	Ks_2
		0/2	Ks_3
		0/2	Ks_4
		0/2	Ks_6
		1	Ks_5 Hap 2
زرین گل	3	0/33	GZ_1 Hap 3
		0/33	GZ_3

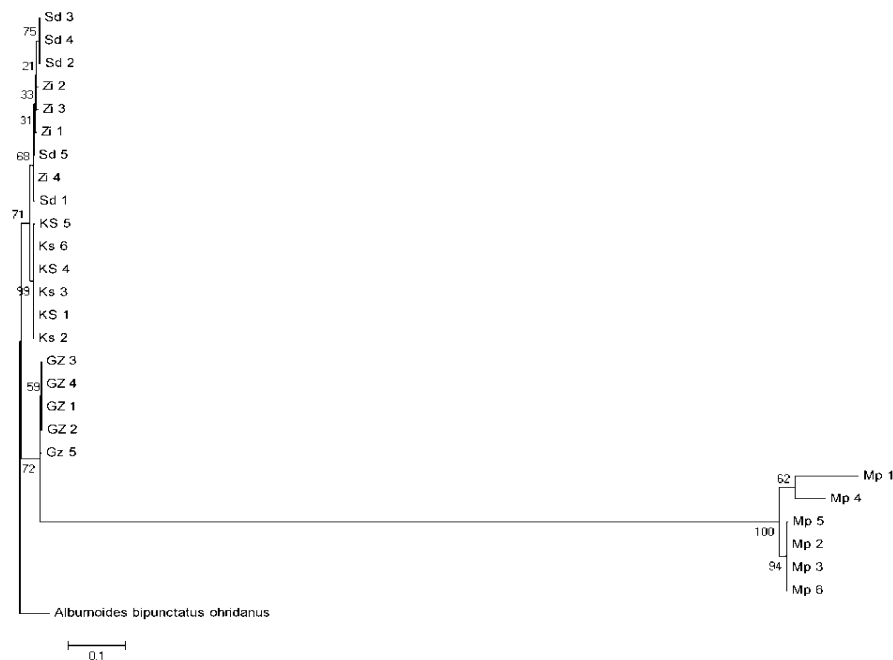


GZ_4		0/33			
GZ_2	Hap 4	1	1		
Gz_5	Hap 5	1	1		
Mp_1	Hap 6	1	1		
Mp_2		0/33			
Mp_3	Hap 7	0/33	1		
Mp_6		0/33		4	مادرسو
Mp_4	Hap 8	1	1		
Mp_5	Hap 9	1	1		
Sd_1	Hap 10	1	1		
Sd_2	Hap 11	1	1		
Sd_3	Hap 12	0/5	1	4	صفارود
Sd_4		0/5			
Sd_5	Hap 13	1	1		
Zi_1	Hap 14	1	1		
Zi_2	Hap 15	1	1		
Zi_3	Hap 16	1	1	4	زالکی
Zi_4	Hap 17	1	1		



شکل 3: درخت فیلوژنی براساس روش تشابه حداکثر (Maximum likelihood)





شکل 4: درخت فیلوژنی براساس روش نزدیکترین همسایه (Neighbor-Joining)

دو به دو و با استفاده از مدل حداکثر درست‌نمایی ترکیبی (Tamura و همکاران، 2004) 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، 1999) (جدول 5 و 6).

نتایج حاصل از آزمون فیلوژنتیکی براساس نزدیکترین همسایه (Neighbor-Joining) با ارزش بوت استرپ 1000 برای ماهی‌های خیاطه به صورت درخت رسم شد که مشابه با نتایج روش تشابه حداکثر (Maximum likelihood) می‌باشد و آن را تایید می‌کند (شکل 4).

تفسیر نتایج حاصل از محاسبه F_{st} - ماتریس فواصل ژنتیکی
 هر یک از نقاط نمونه برداری: ماتریس فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها براساس مقایسه توالی‌های هر گروه با بقیه گروه‌ها به صورت

جدول 5: ماتریس فواصل ژنتیکی هر یک از هاپلوتایپ‌ها

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
2/804	3/686	3/686	3/420	2/971	3/420	3/556	3/129	6/922	6/511	6/922	6/633	5/915	5/915	5/985	0/999	Hap1
2/971	3/812	3/810	3.556	3/129	3/556	3/686	3/278	6/978	572/6	978/6	692/6	5/843	5/985	5/915		1/000 Hap2
5/915	6/055	6/321	6.190	5/985	6/190	6/256	5/915	7/245	6/868	7/245	6/866	1/726	0.999		38/000	39/000 Hap3
5/843	5/985	6/256	6.123	5/915	6/123	6/190	5/843	7/193	6/809	7/193	6/809	1.991		1/0000	39/000	38/000 Hap4
5/843	5/985	6/256	6.123	5/915	6/123	6/190	5/843	7/245	6/688	7/245	6.866		4/0000	3/000	37/000	38/000 Hap5
6.978	6/992	7/087	6.978	6/978	7/087	7/078	6/992	8/897	9/057	8/864		427/00	428/00	427/00	430/00	431/00 Hap6
7/245	7/140	7/297	7/193	7/193	7/734	7/347	7/193	0/999	7.447		99/000	420/00	421/00	420/00	425/00	426/00 Hap7
6/809	6/809	9/992	6/809	6/809	6/992	6/992	6/809	7/496		64/000	105/00	427/00	428/00	427/00	432/00	433/00 Hap8
7/245	7/140	7/297	7/193	7/193	7/347	7/347	7/193		65/000	1/0000	100/00	420/00	421/00	420/00	425/00	426/00 Hap9



1/411	2/434	2/434	2/434	1/726	2/434	2/424		10/00	11/000	38/000	37/00	37/000	426/00	421/00	428/00	421/00	Hap10
2/224	2/626	2/224	2/626	2.434	0.999		5/000	418/0	426/00	418/00	423/00	42/000	42/000	43/000	14/000	13/000	Hap11
1/991	2/434	2/434	2/434	2/434		426/0	423/0	6/000	418/00	418/00	423/00	41/000	41/000	42/000	13/000	12/000	Hap12
1/726	2/224	2/224	0/999		5/000	6/000	3/000	421/0	428/00	421/00	425/00	38/000	38/000	39/000	10/000	9/000	Hap13
1/991	1/991	1/991		3/000	6/000	7/000	6/000	421/0	428/00	421/00	425/00	41/000	41/000	42/000	13/000	12/000	Hap14
2/434	1/991		4/000	5/000	6/000	5/000	6/000	419/0	426/00	419/00	423/00	43/000	43/000	44/000	15/000	14/000	Hap15
2/434		14/00	15/00	40.00	39.00	39/00	426/0	422/0	428/00	422/00	6/000	7/000	6/000	5/000	2/000	4/000	Hap16
	6/000	6/000	4/000	1/000	4/000	5/000	2/000	420/0	428/00	420/00	425/00	37/000	37/000	38/000	9/000	8/000	Hap17

و Fst برابر صفر است. حال اگر دو جمعیت دارای آلل‌های کاملاً متفاوت در هر لوکوس باشند، مقدار Fst برابر با یک است. اگر مقادیر Fst بین 0/05-0 باشد، معمولاً آن‌را به‌عنوان تفاوت ژنتیکی اندک، مقادیر 0/05-0/25 به‌عنوان تفاوت ژنتیکی متوسط و مقادیر بیش از 0/25 را تحت عنوان تفاوت ژنتیکی بارز قلمداد می‌کنند.

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی تعداد 26 نمونه از 5 منطقه محاسبه شد (جدول 7). در تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی ماهی خیاطه براساس جفت‌باز (Pairwise difference) شاخص تثبیت F_{ST} برابر 0/93171 برآورد شد (Schneider و همکاران، 2006) که نشان از تنوع ژنتیکی بالا این ماهی در حوزه‌های نمونه‌برداری دارد (جدول 7).

شاخص مخصوص F_{ST} جمعیت‌ها: اگر دو جمعیت دارای فراوانی آللی یکسانی باشند، تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها وجود نداشته

جدول 6: ماتریس فواصل ژنتیکی، هر یک از نقاط نمونه برداری

[illegible]

جدول 7: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نرم افزار ARLEQUIN 3.1 (Schneider و همکاران، 2006)

درجه آزادی (DF)	مجموع مربعات (SS)	واریانس ترکیبی (VC)	درصد تغییرات (PV)
4	198/674	94/62138	93/17
21	145/633	6/93492	6/83
25	2131/308	101/55630	

شاخص تثبیت یا F_{ST} : 0/93171

جدول 8: شاخص مخصوص F_{ST} جمعیت های نمونه برداری

جمعیت	اسم	F_{ST}
1	KS	0/94459
2	GZ	0/94341
3	MP	0/89503
4	SD	0/94133
5	ZI	0/94079

بحث

DNA میتوکندریایی دارای محدودیت های خاصی می باشد (Fank و همکاران، 2003) که باید مورد توجه قرار گیرد. امروز برای شناسایی گونه ها روشی تحت عنوان بارکدگذاری DNA در حال گسترش می باشد (Hebert و همکاران، 2003). بارکدگذاری DNA روشی نوین را برای شناسایی گونه ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA، به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می کند (Kras و همکاران، 2005). ژن سیتوکروم b یکی از ژن های موجود در میتوکندری می باشد که به عنوان نشانگری مناسب برای شناسایی موجودات در سطح جنس و گونه به کار می رود (Kras و همکاران، 2005). تغییرات بین گونه های ماهی خیاطه استان های حوزه شمالی کشور نشان از جدایی جمعیتی در بین گونه های این جنس در پنج حوزه مطالعاتی دارد.

برطبق نظر متخصصان ماهی خیاطه در ایران، به نام *A. bipunctatus* شناخته می شد. اما هدف از این مطالعه مرور و نگاهی کلی در خصوص رابطه بین جمعیت های جنس (*A. bipunctatus* Bloch, 1782) در پنج رودخانه حوضه شمالی کشور بود. آنالیزهای مولکولی داده های توالی نوکلئوتیدی سیتوکروم b از جمعیت های جنس *Alburnoides* نشان می دهد که *A. bipunctatus* یک نام معتبر برای جمعیت های ایرانی نیست، زیرا برون گروه های این مطالعه (*A. bipunctatus ohridanus*) از گونه های جنس *Alburnoides* ایران جدا افتاد. توصیف تاکسون های 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 به صورت گروه ترکیبی *A. bipunctatus* در نظر گرفته می شد و تاریخچه های ژئومورفولوژی مجزایی را از این حوزه ها نشان می دهد. در

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی بالا بودن واریانس ترکیبی و ضریب تغییرات بین جمعیت نشان از جزیان ژنی کم بین جمعیت و جدا شدن آن ها می باشد. همچنین بالا بودن F_{ST} نشان از تنوع ژنتیکی بالا این ماهی در حوزه های نمونه برداری حکایت می کند و این فاکتور تحت تأثیر جنبه های مختلفی از بوم شناسی و تاریخچه دموگرافی گونه است و تبادل ژنی یک عامل کلیدی در جمعیت ها است و می تواند بر متغیرهای مختلف جمعیت نظیر اندازه جمعیت، تنوع ژنتیکی، سازگاری محلی و در نهایت گونه زایی موثر باشد. نتایج درخت فیلوژنی بیانگر وجود سه جمعیت و تفاوت جمعیتی غرب و شرق حوزه شمالی می باشد. نمونه های جمعیتی غربی (حوزه سفیدرود) شامل رودخانه های صفارود و زالکی را می توان به صورت *A. eichwaldii* در نظر گرفت در حالی که می توان جمعیت های رودخانه کسلیان را نیایی مجزا نامید (*Alburnoides ssp1*). نمونه های جمعیتی شرقی (حوزه گرگانرود) کاملاً مجزا از نمونه های دیگر بوده و گونه های کاملاً متفاوتی را به وجود آورده اند (*Alburnoides ssp2*). نتایج این پژوهش با نتایج Seifali و همکاران (2012) که نشان دادند *A. bipunctatus* یک نام معتبر برای جمعیت های ایرانی ماهی خیاطه نیست و ماهی خیاطه حوزه سفیدرود شمال ایران را باید گونه ای بانام علمی *A. eichwaldii* نامید، همخوانی دارد. رسم درخت فیلوژنی بر اساس تشابه حداکثر (Maximum likelihood) جهت مقایسه جمعیت های ایرانی *Alburnoides* با توالی های موجود در GenBank و NCBI نشان داد که جمعیت های ایرانی کاملاً مجزا از سایر گونه های می باشد و گونه های *A. fasciatus* و *A. kubanicus* نسبت به سایر گونه های جنس *Alburnoides* نزدیکی بیشتری به گونه های ایران دارد (شکل 5).

ماتریس فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت نوکلئوتیدی موجود در بین دو توالی است. میزان واگرایی ژنتیکی بین گونه های متفاوت به مراتب از واگرایی ژنتیکی درون گونه ای بیش تر است (Hebert و همکاران، 2008). نمونه های حوزه مادر سو فاصله ژنتیکی زیادی با سایر گونه ها این پژوهش و *A. bipunctatus* دارد. این فاصله را می توان از روی درخت فیلوژنتیکی و هم رسم شبکه هاپلوتایپی و همچنین جدول تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی مشاهده کرد. رسم هاپلوتایپی، توالی نمونه های این پژوهش با توالی های موجود در GenBank و NCBI و مطالعه Seifali و همکاران (2012)، صحت درخت فیلوژنتیکی این پژوهش را تایید می کند (شکل 6).

همچنین نتایج به دست آمده در این پژوهش موید فرضیه Zardoya و Doadrio (1999)، Zehzad و همکاران (1999) در خصوص توزیع جغرافیایی زیستی جمعیت هاست به طوری که قطعه قطعه شدن زمین احتمالاً عامل اصلی تمایز مولکولی مشاهده شده در حوزه های جغرافیایی زیستگاه های ماهی بوده و

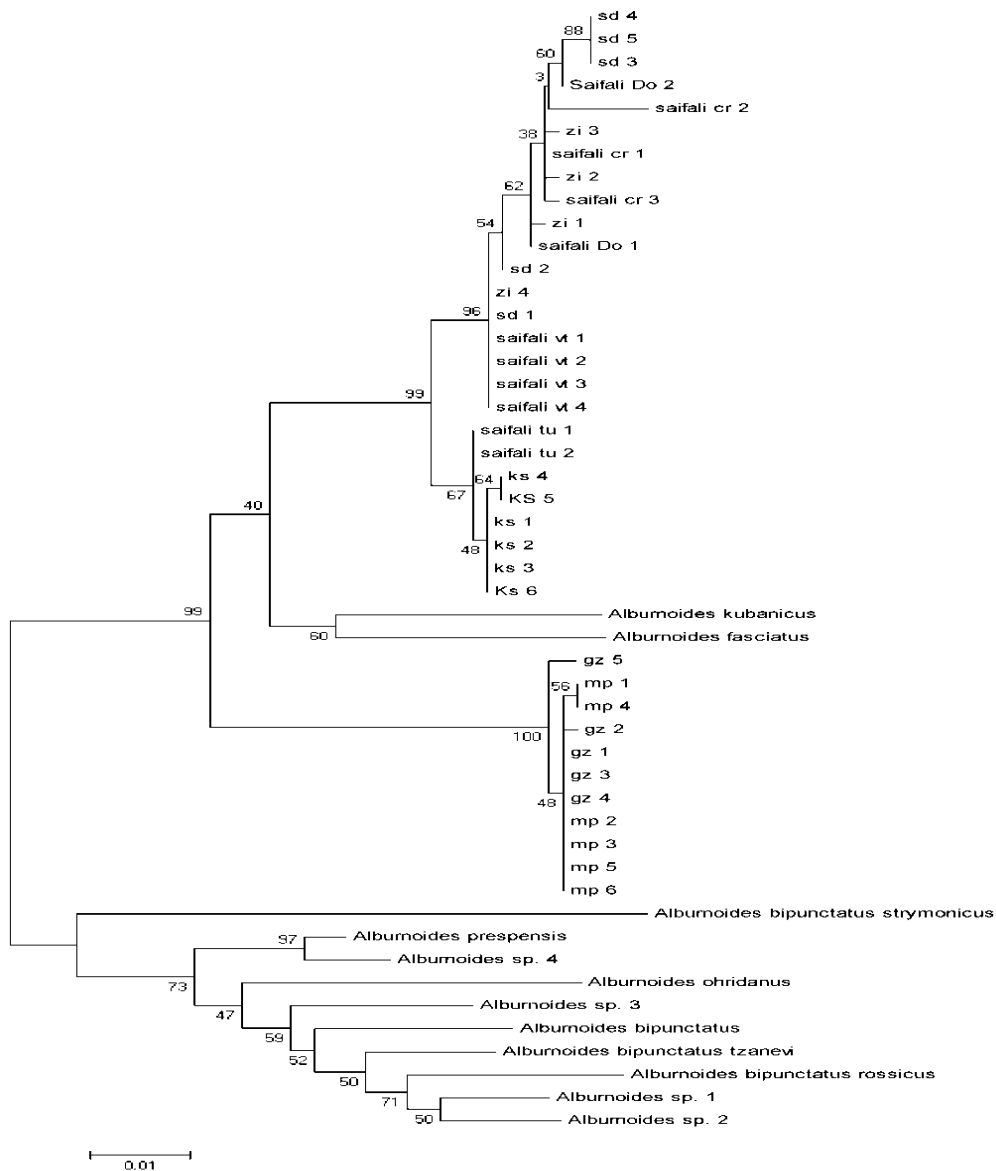


براساس این شواهد، *Alburnoides* و جمعیت‌های آن در حوزه‌های کوهستانی زاگرس و البرز و فلات ایران تشکیل یک گروه تک نیایی داده است.

در نهایت هدف این مطالعه مرور و نگاهی کلی درخصوص رابطه بین جمعیت‌های *Alburnoides* (Bloch, 1782) در چهار حوضه شمالی ایران بود. نتایج داده‌های مولکولی، اطلاعات مفیدی را برای اصلاح موقعیت سیستماتیک جمعیت‌های *Alburnoides* در جنوب دریای خزر در اختیار می‌گذارد. این شواهد مولکولی موید این فرضیه است که *A. bipunctatus* در جنوب دریای خزر ایران وجود ندارد و جمعیت‌های غربی و شرقی تاکسون‌های مجزایی می‌باشند.

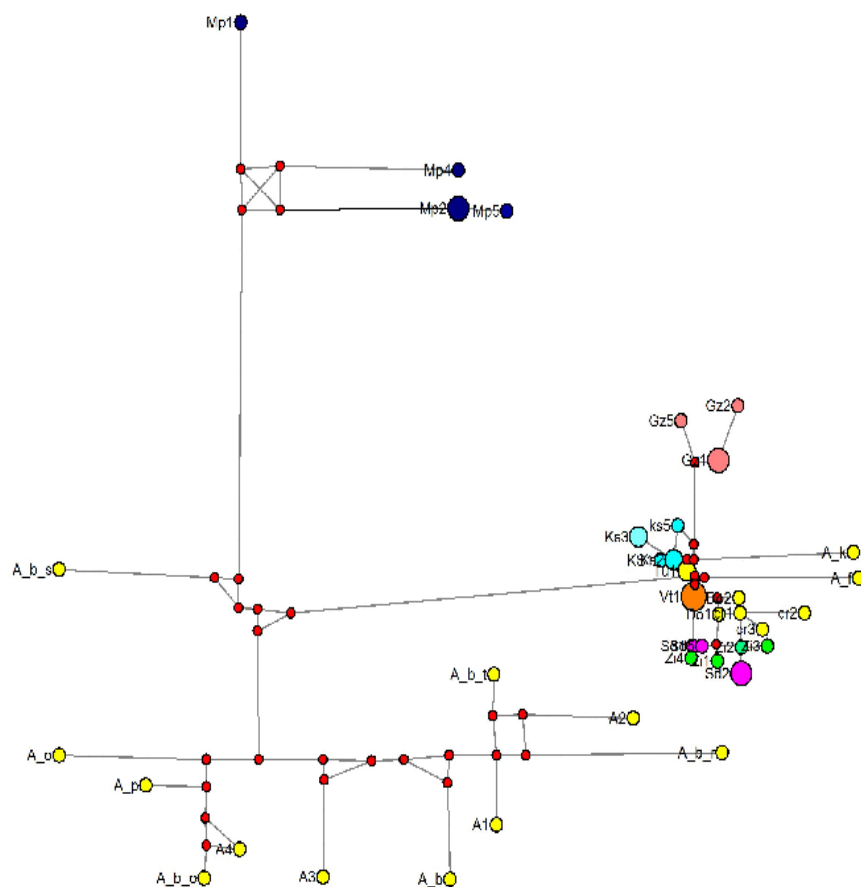
توجیهات احتمالی برای اشتقاق در جمعیت‌های ماهی می‌توانند مکانیسم‌های رفتاری و موانع جریان و رانش ژنی باشند. بر طبق گفته Mendel و همکاران (2008)، تجزیه تحلیل ژن میتوکندریایی سیتوکروم b نشان داده شده است که *A. bipunctatus* یک گروه پیچیده است که از فرانسه تا افغانستان مشاهده شده و 5 گروه تک نیایی به نام‌های 1) *A. bipunctatus*، فرانسه، جمهوری چک، اسلواکی، 2) *Alburnoides* ssp کرواسی، 3) *A. ohridanus* و *bipunctatus*، از پایگاه داده بانک ژنی، یونان، 4) *A. bipunctatus strymonicus* نام زیرگونه‌ای از پایگاه داده بانک ژنی یونان، 5) *Aburnoides* spp (روسیه) شامل می‌شود.





شکل 5: درخت فیلوژنی ماهی خیاطه با مطالعه Seifali و همکاران (2012)، NCBI و GenBank





شکل 6. شبکه هاپلوتاایپها 26 نمونه ماهی خیاظه با مطالعه Seifali و همکاران (2012)، NCBI و GenBank

منابع

1. احمدی، ا.؛ وثوقی، ع.؛ وطن‌دوست، ص.؛ قلیچی، ا. و صیدانلو، ز.، 1390. خصوصیات ساختار جمعیتی ماهی خیاظه در سرشاخه‌های اصلی رودخانه تالار استان مازندران. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آذرشهر. سال 5، شماره 2، صفحات 65 تا 80.
2. پاتیمار، ر. و دولتی، ف.، 1386. بررسی سن و رشد و تولیدمثل گونه‌خیاظه در رودخانه زرین‌گل (البرز شرقی). مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آذرشهر. سال 1، شماره 2، صفحات 55 تا 62.
3. جعفری، ع.، 1384. گیتاشناسی ایران. رودها و رودخانه‌های ایران. انتشارات هامون. 544 صفحه.
4. عباسی، ف.، 1390. مطالعه پویایی جمعیت ماهی خیاظه *Alburnoides bipunctatus* در رودخانه‌های تیل‌آباد، کبودال و
5. فرداصفهانی، پ. و الهیاری، م.، 1386. ترجمه ژنوم 3، براون، ت.ا.، (مؤلف). انتشارات خسروی. 772 صفحه.
6. قره‌یاضی، ب.، 1375. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات ایران، مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان.
7. ملکیان، م.، 1389. ترجمه بوم‌شناسی مولکولی، فریلند، ج. (مؤلف). جهاد دانشگاهی مشهد، 304 صفحه.
8. نیکدل، ک.؛ یوسفی‌سیاه‌کلودی، س. و عسگری‌جعفرآبادی، ق.، 1389. مطالعه فیلوژنتیک جمعیت گوسفند وحشی *Ovis orientalis* در منطقه تنگ صیاد و کراپی. محیط زیست جانوری. سال 2، شماره 2، صفحات 67 تا 72.



26. Lusk, S.; Luskova, V.; Halaska, K. and Slechta, V., 1998. Treda and prodaction of fish communities of the barbell zone in a stream of the Czech Republic. *Folia zool.*
27. Mendel, J.; Lusk, S.; Halačka, K., 2008. Genetic diversity of spirlin, *Alburnoides bipunctatus*, with notes on its occurrence. *Biodiverzita ichtyofauny CR (VII)*. pp: 25-37.
28. 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, Gipoftal'mikhtis, Aristikhtis. Vol. 8.
29. Penaz, M., 1995. *Alburnoides bipunctatus*. In: Baruš, V. and Oliva, O. (eds), Fauna ČR a SR/Mihulovci a ryby. Vol. 2, pp: 151-154.
30. Ried, K., 2004. Global register of migrotary 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.
31. 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.
32. 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.
33. Seifali M.; Arshad A.; Nurul Amin, S.M.; Hasanzadeh Kiabi, B.; Esmaeili, H.R. and Yazdani Moghaddam, F., 2012. Population dynamics of Caspian spirlin (*Actinopterygii: Cyprinidae*) in the Kesselian Stream, Iran. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11, No. 38, pp: 9214-9222.
34. 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].
35. 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.
36. Tamura, K. and Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 10, pp: 512-526.
37. 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.
38. Tsepkin, E.A., 2003. *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) Riffle Minnow, in Atlas of Freshwater Fishes of Russia (Nauka, Moscow). Vol. 1, pp: 200-202.
39. Yildirim, A.; Erdogan, O.; Turkmen, M. and Demir, B., 1999. The investigation of some Reproduction characteristics of the *Alburnoides bipunctatus faciat*s (Nordman, 1840) living in Oltu stream. Coruh Basin. *Journal of veterinary and Animal sciences*. Vol. 23, pp: 679-686.
9. 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.
10. 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.
11. Beaumont, A. and Hore, K., 2003. *Biotechnologist and Genetics in Fisheries and aquaculter*. Wiley-Blackwell. 50 p.
12. 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.
13. Bless, R., 1996. Reproduction and habitat preference of the threatened spirlin (*Alburnoides bipunctatus* Bloch) and soufie (*Leuciscus souffia* Risso) under laboratory conditions (Teleostei: Cyprinidae).
14. Bless, R., 2001. Spawning and niche shift of some threatened riverine fishes of Europe. *Large Rivers*. Vol. 12, No. 2-4, pp: 293-305.
15. 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.
16. 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.
17. Cihar, J., 1999. A field guaude in colour to fresh water fish. Blitz edition. Leicester.
18. Coad, B., 2005. Iranian freshwater fishes. <http://www.briancoad.com>
19. Goldaspilk, C.R., 1979. The population density, Growth rate and production of roach *Rutilus rutilus* in Tjeukemeer. *Fish Biology*. Vol. 15, pp: 473-498.
20. 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.
21. 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.
22. Kirchhofer, A. and Heffi, D., 2008. Conservation of endangered freshwater fish in Europe. *Birkhauser Verlag*, Basel, Boston & Berlin. pp: 249-258.
23. Kirchofer, A., 1997. The assessment of fish vulnerability in Switzerland based on distribution data. *Biological Conservation*. Vol. 80, No. 1, pp: 1-8.
24. 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.
25. Ladiges, W. and Vogt, D., 1979. *Suswasser fische Europas*. Paul Parey, Hamburge and Berlin. 299 p.



40. **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.
41. **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.
42. **Zhukov, P.I., 1988.** Guide on the Ecology of Freshwater Fish (Nauka i Tekhnika, Minsk,) [in Russian].
43. **Živković, D. and Jovanović, B., 2011.** Spatial morphometric plasticity of spirin *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) phenotype from the Nišava River, Serbia, Danube.

