ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحه ۱۱۰ - ۱۰۱

بررسی جایگاه آرایه‌شناسی گونه *Alburnoides parhami* با استفاده از داده‌های ریختی و مولکولی

A re-evaluation of taxonomic status of *Alburnoides parhami* using morphological and genetic data

آرش جولاده رودبار*[۱]، سهیل ایگدری[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Jouladeh-Roudbar A*[1], Eagderi S[1]

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arash.aarshaan@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور بررسی روابط تبارشناختی و اعتبارسنجی گونه *Alburnoides parhami* با استفاده از نشانگر مولکولی ژن COI و ویژگی‌های ریخت‌شناختی به اجرا درآمد. برای این منظور طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۵ از ۱۰ گونه جنس *Alburnoides* در محل تیپ آن‌ها نمونه‌برداری شد. جهت بررسی ریخت‌شناختی، ۲۹ ویژگی ریخت سنجی و هشت ویژگی شمارشی سنجش و شمارش شد. به‌منظور بررسی اختلاف ریختی بین این گونه و نزدیک‌ترین خویشاوند آن یعنی *A. holciki* از روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی و آنالیز واریانس چند متغیره استفاده شد. برای بررسی روابط تبارشناختی مولکولی اعضای این جنس نیز از توالی ژن *COI* و تحلیل‌های Maximum likelihood و Bayesian استفاده شد. براساس نتایج دو گونه *A. holciki* و *A. parhami* از لحاظ ویژگی‌های ریختی از یکدیگر قابل تفکیک نبودند. بر اساس نتایج تحلیل ژن *COI*، واگرایی اندکی در توالی ژن *COI* این دو گونه مشاهد شد به‌عبارت دیگر براساس چندشکلی پارسیمونی نوکلئوتیدها تنها در یک جایگاه بین این دو گونه چندشکلی وجود داشت. بنابراین پیشنهاد شد گونه *A. parhami* به‌عنوان مترادف *A. holciki* در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی

ایران
آرایه‌شناسی
توالی‌یابی
دارنگاره
ماهی‌خیاطه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

مقدمه

فون غالب ماهیان آب‌های داخلی ایران را کپورماهیان (Cyprinidae) با بیش از ۱۱۰ گونه در ٤٤ جنس تشکیل می‌دهند (Jouladeh-Roudbar et al. 2015). از جمله مهم‌ترین جنس‌های این خانواده، *Alburnoides* است که تاکنون حداقل هشت گونه بومزاد از آن در کشور ایران گزارش شده (Jouladeh-Roudbar et al. 2015) که بر اساس آخرین فهرست ماهیان آب‌های داخلی ایران، این جنس دارای ۱۱ گونه معتبر شامل *A. eichwaldii* (شمال‌غرب حوضه آبریز کاسپین)، *A. damghani* (حوضه آبریز دشت کویر)، *A. holciki* (حوضه آبریز هریرود)، *A. idignensis* (حوضه آبریز تیگریس)، *A. namaki* (حوضه آبریز دریاچه نمک)، *A. nicolausi* (حوضه آبریز تیگریس)، *A. parhami* (شرق حوضه آبریز کاسپین)، *A. petrubanarescui* (حوضه آبریز ارومیه)، *A. qanati* (حوضه آبریز کر و سیرجان)، *A. samiii* (قسمت مرکزی و جنوب غربی حوضه آبریز کاسپین) و *A. tabarestanensis* (قسمت مرکزی و جنوب شرقی حوضه آبریز کاسپین) می‌باشد (Jouladeh-Roudbar et al. 2015). لازم به ذکر است که گونه *A. coadi* که از رودخانه نمرود حوضه آبریز دشت کویر توصیف شده بود، به‌دلیل همپوشانی ویژگی‌های ریختی و ژنتیکی (ژن *COI*) مترادف *A. namaki* در نظر گرفته شده‌است (Jouladeh-Roudbar and Eagderi 2017).

ماهیان جنس *Alburnoides* داری جثه‌ای کوچک بوده و از لحاظ ظاهری بسیار شبیه به یکدیگر هستند و این مساله شناسایی آن‌ها را مشکل می‌نماید. از طرفی دیگر تغییرات فنوتیپی وابسته به زیستگاه نیز در اعضای این جنس به‌وفور مشاهده می‌شود (Eagderi et al. 2013). موارد فوق به‌همراه عدم وجود کلید شناسایی معتبر تفکیک کننده اعضای این جنس در ایران، باعث شده که شناسایی آنها به آسانی میسر نباشد (Stierandová 2016; Jouladeh-Roudbar et al. 2016).

مطالعات مولکولی مختلفی بر روی گونه‌های ماهیان جنس *Alburnoides* در ایران و سایر نقاط دنیا صورت گرفته و غالب این مطالعات بر پایه نشانگرهای آلوزایم، 16s rDNA، Cytchrome *b*، ناحیه کنترل میتوکندری و ژن *COI* صورت بوده است (Seifali et al. 2012; Jouladeh-Roudbar et al. 2016; Levin et al. 2016; Stierandová 2016). مطالعات مولکولی سال‌های اخیر نتایج متفاوت و بعضاً تکمیلی بر روی ماهیان آب‌های داخلی ایران را ارائه داده است که تصحیح و تکمیل وضعیت آرایه‌شناسی گونه‌های مختلف ماهیان آب‌های داخلی را سبب شده‌است (Ghanavi et al. 2016; Eagderi et al. 2017; Jouladeh-Roudbar et al. 2017). از این‌رو توسعه کاربرد تکنیک‌های مولکولی در کنار مطالعات ریختی می‌تواند به حل وضعیت آرایه‌شناسی گونه‌های مختلف ماهیان کمک نماید. گونه *A. parhami* یکی از سه گونه جنس *Alburnoides* در حوضه آبریز کاسپین است که اخیراً براساس ویژگی‌های ریختی توصیف و به‌عنوان گونه‌ای جدید از این حوضه معرفی شده‌است (Mousavi-Sabet et al. 2015). براساس نمونه‌برداری‌های انجام شده از محل تیپ این گونه توسط نگارندگان، بررسی‌های ریختی امکان تشخیص این گونه را میسر نساخت، بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور بررسی روابط تبارشناختی این گونه و اعتبارسنجی آن با استفاده از نشانگر مولکولی ژن *COI* و ویژگی‌های ریخت‌شناختی به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای انجام این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۳–۱۳۹۵ از ۱۰ ایستگاه مختلف واقع در شش حوضه آبریز داخلی ایران با استفاده از دستگاه الکتروشوکر نمونه‌برداری انجام شد (جدول ۱، شکل ۱)، نمونه‌های صید شده جهت انجام مطالعات مولکولی در اتانول ۹٦ درصد و برای مطالعات ریختی در فرمالین بافری ده درصد تثبیت و به آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند.

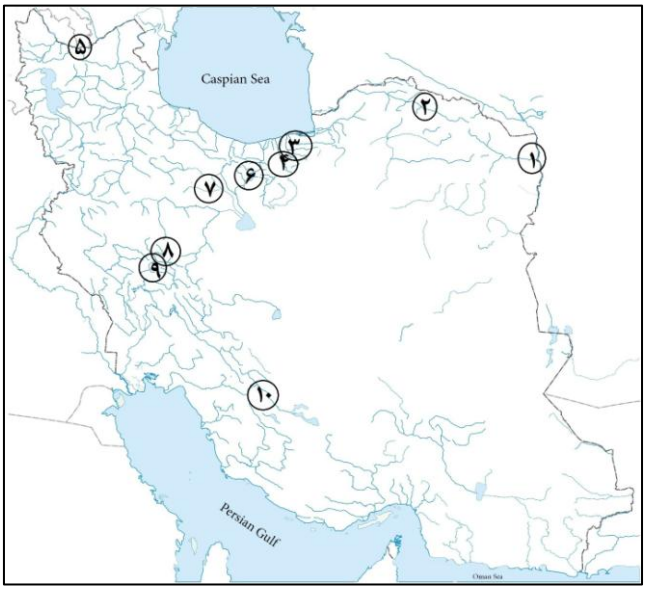
مطالعه ریخت‌شناسی: جهت بررسی ویژگی‌های ریخت‌سنجی و شمارشی نمونه‌های مورد مطالعه حداقل تعداد ۱۵ نمونه ماهی از محل تیپ هرگونه بررسی شد. به‌دلیل این‌که هدف اصلی این مطالعه بررسی جایگاه آرایه‌شناسی گونه *A. parhami* بود، تمرکز اصلی مطالعات ریختی برروی این گونه و نزدیک‌ترین خویشاوند آن، براساس نتایج مولکولی یعنی *A. holciki* صورت گرفت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

جدول ۱- اطلاعات و مختصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ردیف	گونه	شناسه	ایستگاه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	حوضه آبریز
۱	*A. hociki*	Har۱-۳	هریرود	۳۵° ۵۷′	۶۱° ۰۵′	هریرود
۲	*A. hociki*	Bab۱-۳	بابا امان	۳۷° ۲۹′	۵۷° ۲۶′	کاسپین
۳	*A. tabarestanensis*	Taj۱-۲	تجن	۳۶° ۱۱′	۵۳° ۱۹′	کاسپین
٤	*A. tabarestanensis*	Sia۱	سیاهرود	۳۶° ۲۹′	۵۲° ۵۳′	کاسپین
۵	*A. eichwaldii*	Ars۱-۳	ارس	۳۸° ۵۷	٤۵° ۳۵′	کاسپین
٦	*A. namaki*	Nam۱-۲	نمرود	۳۵° ٤۲′	۵۳° ۳۹′	دشت کویر
۷	*A. namaki*	Qar۱-٤	قره چای	۳٤° ۵۳′	۵۰° ۰۲′	نمک
۸	*A. idignesis*	Bid۱-۳	بیدسرخ	۳۶° ۲٤′	٤۷° ٤۵′	تیگریس
۹	*A. nicolausi*	Nor۱-۳	نورآباد	۳٤° ۰۳′	٤۷° ۵۸′	تیگریس
۱۰	*A. qanati*	Kor۱-٤	کر	۳۰° ۰۲′	۵٤° ٤۱′	کر



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری در این مطالعه

از این‌رو ۲۹ ویژگی ریخت‌سنجی با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Coad and Bogutskaya 2009a) و سپس ۲۸ ویژگی ریخت‌سنجی نسبی با تقسیم صفات ریخت‌سنجی مطلق بر طول استاندارد و طول سر (ویژگی‌های موجود در سر ماهی نسبت به طول سر و ویژگی های موجود در بدن ماهی نسبت به طول استاندارد) محاسبه شد.

همچنین هشت ویژگی شمارشی نیز با استفاده از استریومیکروسکوپ (Leica) شمارش شد. جهت بررسی تفاوت ریختی بین گونه‌های مورد بررسی از تحلیل تجزیه به مولفه‌های اصلی (Principal component analysis) و آنالیز واریانس چند متغیره (MANOVA) استفاده شد. تحلیل‌های آماری با نرم‌افزارهای PAST Ver. 2.17c و Excel 2013 انجام شد.

برای بررسی وضعیت ستون مهره‌ها و شعاع باله‌ها، تعداد پنج نمونه از هر گونه، تثبیت شده در فرمالین بافری، با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز و آلسیان آبی بر اساس روش Taylorو Van Dyke(1985) شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی شدند. سپس نمای جانبی چپ بدن نمونه‌های شفاف شده با استفاده از اسکنر (Epson 600) اسکن شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی از باله و عضله نمونه‌ها صورت گرفت (Miller et al. 1988). در این روش بافت‌ها پس از هموژن سازی در بافر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

استاندارد STE (Salt, Trist, EDTA) به‌همراه پروتئیناز K به مدت ۱۶ ساعت هضم، با استفاده از محلول استات آمونیوم تغلیظ و سپس با استفاده از استات سدیم رسوب داده شدند. پس از رسوب DNA حاصله با الکل شستشو شد و سپس در آب مقطر حل شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی ژل آگارز ۰/۵ درصد انجام شد.

برای تکثیر ژن *COI* نمونه ها از یک جفت آغازگر با توالی‌های رفت (5′-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3′) FishF1-5′-) و برگشت FishR1- (TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3′ استفاده شد (Ward et al. 2005). واکنش PCR در حجم ۳۵ میکرولیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش شامل شش میکرولیتر بافر ۱۰X، سه میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۰ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر آغازگر رفت و دو میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (سه واحد/ میکرولیتر)، دو میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰نانوگرم) و هجده میکرولیتر آب مقطر بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، به دنبال آن سی و چهار چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) شد و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد، سپس در معرض تابش نور U.V قرار داده شد و باندهای حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر توسط چرخه PCR مشاهده شد.

توالی‌یابی: به‌منظور توالی یابی قطعه مورد نظر ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص سازی جین جت (GeneJET Genomic DNA Purification Kit) خالص شد و در نهایت جهت توالی یابی به شرکت کیاژن در آلمان (QIAGEN Genomic Services, Germany) ارسال شد. قطعه تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس به‌همراه تکرار، توالی‌یابی شد.

آنالیز داده‌ها: توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W و Geneious (Geneious v. 8.0.3; Biomatters, http://www.geneious.com) ویرایش شدند. با استفاده از نرم‌افزار jModelTest 2.1.4 بهترین مدل تکاملی انتخاب شد (Darriba et al. 2012). نرخ انشقاق درون و برون گونه‌ای با استفاده از مدل Uncorrected-*p* pairwise distances و نرم‌افزار MEGA 6 محاسبه شد (Tamura et al. 2013). بر اساس نتایج نرم‌افزار jModelTest مدل تکاملی K2+G+I بر اساس بیش‌ترین میزان BIC (Bayesian Information Criterion) انتخاب شد. برای بررسی تبارشناسی نمونه‌های مورد بررسی از روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزارMrBayes v3.2.2 و تکرار 10^8 نسل (Ronquist et al. 2012) و از روش Maximum likelihood با استفاده از نرم‌افزار raxmlGUI 1.3 و 10^6 نسل استفاده شد (Silvestro and Michalak 2012). همگرایی‌های حاصله با استفاده از نرم افزار Tracer 1.6 بررسی شدند (Rambaut and Drummond 2013)، سپس ۱۰٪ نسل اولیه سوزانده شد. هم‌چنین برای ترسیم دارنگاره‌های ایجاد شده نیز از نرم‌افزار FigTree v1.4.2 استفاده شد (Rambaut 2009).

نتایج

بر اساس نتایج تمامی ویژگی‌های ریخت‌سنجی دو گونه *A. holciki* و *A. parhami* دارای همپوشانی بوده و هیچ یک از ویژگی‌ها قادر به تفکیک آن‌ها از یکدیگر نبود (جدول ۱). نتایج ویژگی‌های شمارشی نیز مشابه نتایج ویژگی‌های ریخت سنجی بود و هیچ‌یک از ویژگی‌های شمارشی نتوانست دو گونه را از یکدیگر تفکیک نماید (جدول ۲). به‌علاوه نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) این دو گونه همپوشانی بالایی را نشان داد (شکل ۲ و ۳) و تفاوت معنی‌داری یافت نشد ($P<0/05$).

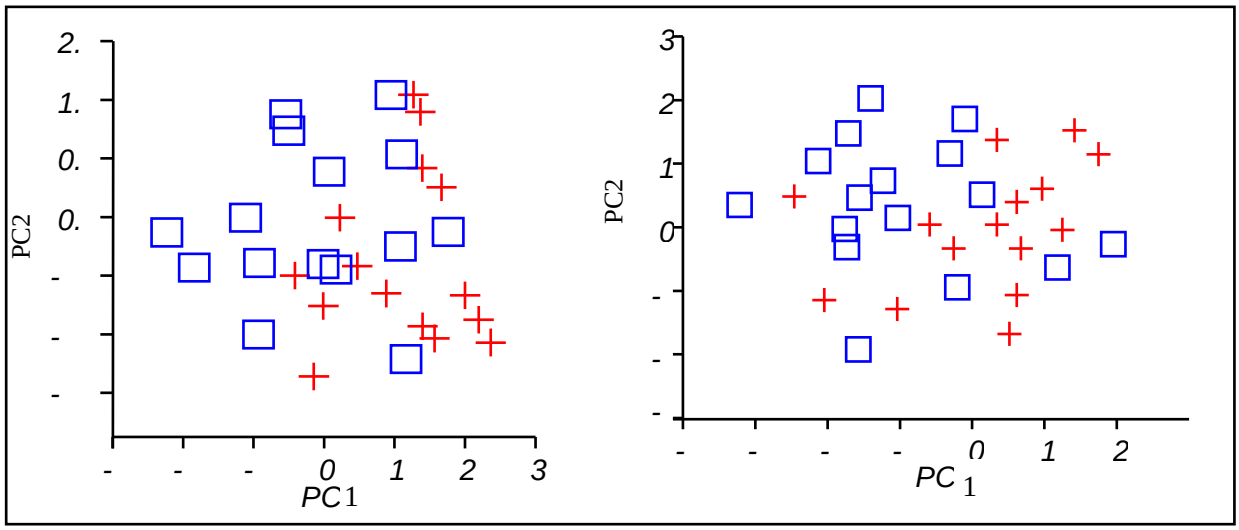
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

جدول ۲- دامنه، میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های ریخت‌سنجی نسبی گونه‌های *Alburnoides parhami* و *Alburnoides holciki*

	A. parhami (Mousavi-Sabet et al. 2015)			*A. parhami* بابا امان			*A. holciki* هریرود		
	دامنه	میانگین	SD	دامنه	میانگین	SD	دامنه	میانگین	SD
طول استاندارد (میلی‌متر)	۳۹/۹-۶۲/۰			۶۳/۲-۸۳/۹			۴۹/۶-۷۶/۳		
نسبت به طول کل (درصد)									
طول سر	۲۵/۱-۲۹/۹	۲۷/۲	۱/۵	۲۲/۹-۲۷/۶	۲۴/۹	۱/۷	۲۳/۱-۲۹/۹	۲۵/۳	۱/۶
ارتفاع بدن	۲۵/۱-۳۰/۴	۲۸/۱	۱/۸	۲۸/۱-۳۰/۷	۲۹/۱	۱/۰	۲۷/۵-۳۲/۷	۲۸/۹	۱/۲
حداکثر عرض بدن	۱۲/۰-۱۵/۲	۱۳/۷	۱/۲	۱۳/۰-۱۵/۹	۱۴/۳	۱/۵	۱۳/۳-۱۶/۲	۱۵/۳	۱/۱
طول قاعده باله پشتی	۱۳/۴-۱۶/۹	۱۴/۵	۱/۴	۱۱/۵-۱۳/۶	۱۲/۶	۰/۷	۱۲/۳-۱۷/۰	۱۳/۶	۱/۰
ارتفاع باله پشتی	۲۴/۴-۲۸/۰	۲۶/۴	۱/۱	۲۳/۱-۲۵/۹	۲۴/۳	۰/۹	۲۶/۱-۲۸/۲	۲۷/۳	۰/۸
طول قاعده باله مخرجی	۱۴/۹-۱۸/۳	۱۶/۸	۱/۰	۱۶/۲-۱۸/۸	۱۷/۳	۱/۰	۱۴/۱-۱۹/۹	۱۵/۹	۱/۲
ارتفاع باله مخرجی	۱۴/۱-۱۹/۰	۱۶/۶	۱/۷	۱۴/۶-۱۷/۷	۱۵/۷	۰/۸	۱۶/۸-۲۱/۹	۱۸/۲	۰/۹
طول باله سینه ای	۲۰/۱-۲۳/۲	۲۱/۸	۱/۱	۱۹/۵-۲۲/۵	۲۱/۱	۰/۹	۲۱/۹-۲۴/۷	۲۲/۴	۰/۷
طول باله شکمی	۱۶/۶-۱۸/۷	۱۷/۳	۰/۷	۱۵/۱-۱۷/۵	۱۶/۳	۰/۸	۱۶/۳-۲۱/۸	۱۷/۳	۱/۰
طول پیش پشتی	۴۸/۸-۵۳/۹	۵۲/۱	۱/۸	۵۰/۴-۵۳/۲	۵۲/۹	۰/۸	۴۸/۸-۵۴/۲	۴۹/۶	۰/۹
طول پیش مخرجی	۶۲/۶-۶۵/۴	۶۳/۹	۱/۱	۶۱/۹-۶۷/۴	۶۴/۸	۱/۹	۶۲/۲-۶۶/۷	۶۴/۸	۱/۶
طول پیش سینه ای	۲۵/۳-۳۲/۳	۲۷/۷	۲/۶	۲۴/۶-۲۶/۱	۲۵/۱	۱/۳	۲۶/۶-۲۹/۴	۲۸/۳	۱/۵
طول پیش شکمی	۴۵/۰-۴۹/۹	۴۷/۶	۱/۷	۴۶/۵-۵۰/۷	۴۸/۲	۱/۱	۴۴/۰-۴۹/۵	۴۶/۰	۱/۲
طول سینه ای شکمی	۲۲/۱-۲۵/۹	۲۳/۹	۱/۵	۲۰/۶-۲۵/۴	۲۳/۳	۱/۶	۲۰/۵-۲۵/۷	۲۴/۱	۱/۴
طول شکمی مخرجی	۱۷/۰-۲۰/۵	۱۸/۹	۱/۴	۱۵/۹-۲۰	۱۷/۸	۱/۳	۱۴/۸-۱۶/۹	۱۶/۳	۱/۵
طول ساقه دمی	۲۰/۲-۲۳/۵	۲۱/۴	۱/۲	۱۹/۳-۲۳/۵	۲۱/۳	۱/۱	۱۶/۶-۲۲/۶	۱۹/۹	۱/۳
ارتفاع ساقه دمی	۹/۳-۱۲/۵	۱۱/۰	۱/۰	۱۱/۱-۱۲/۳	۱۱/۸	۰/۴	۱۴/۱-۱۷/۰	۱۲/۴	۰/۸
عرض ساقه دمی	۴/۳-۶/۵	۵/۴	۰/۷	۵/۸-۶/۱	۶/۰	۰/۹	۴/۴-۶/۷	۵/۵	۰/۷
طول لوب بالایی باله دمی	۲۱/۹-۲۶/۰	۲۳/۹	۱/۸	۲۳/۶-۲۷/۸	۲۵/۷	۱/۲	۲۱/۲-۲۶/۲	۲۴/۱	۰/۹
طول لوب پایینی باله دمی	۲۴/۰-۲۸/۴	۲۶/۳	۲/۱	۲۳/۹-۲۹/۳	۲۶/۴	۱/۵	۲۴/۵-۱۹/۳	۲۵/۱	۱/۶
نسبت به طول سر (درصد)									
ارتفاع سر	۶۱/۳-۷۴/۹	۶۷/۹	۵/۰	۷۳/۴-۸۹/۹	۸۲/۷	۶/۱	۷۰/۹-۷۶/۷	۷۵/۳	۵/۶
عرض سر	۴۴/۰-۵۴/۵	۴۹/۰	۳/۴	۴۶/۳-۵۳/۱	۴۸/۳	۴/۰	۴۹/۹-۵۵/۸	۵۱/۶	۳/۱
فاصله میان چشمی	۲۸/۱-۳۵/۸	۳۲/۳	۳/۳	۲۷/۶-۳۸/۷	۳۳/۴	۳/۶	۳۱/۱-۳۵/۹	۳۲/۴	۲/۸
فاصله میان سوراخ های بینی	۱۷/۹-۲۴/۳	۲۰/۵	۲/۴	۱۶/۱-۲۶/۳	۲۴/۳	۲/۹	۱۹/۳-۲۲/۱	۲۱/۹	۳/۴
قطر چشم	۲۸/۱-۳۳/۳	۳۰/۹	۱/۸	۲۶/۴-۳۱/۹	۲۹/۱	۱/۸	۲۶/۴-۲۹/۳	۲۸/۰	۱/۲
قطر مردمک چشم	۱۴/۳-۱۷/۴	۱۵/۹	۱/۲	۱۳/۲-۱۸/۳	۱۶/۱	۱/۹	۵۳/۲-۵۸/۵	۵۵/۱	۲/۳
طول پیش چشمی	۲۱/۹-۳۲/۴	۲۸/۶	۳/۵	۱۴/۱-۲۱/۸	۱۷/۳	۲/۸	۱۷/۶-۲۱/۷	۱۹/۶	۳/۱
طول پس چشمی	۳۶/۷-۴۹/۷	۴۴/۰	۵/۰	۴۹/۱-۵۸/۸	۵۴/۳	۳/۱	۵۰/۱-۵۳/۲	۵۲/۳	۴/۶

در مجموع ۲۷ توالی از ژن سیتوکروم اکسیداز سی از ۸ گونه اسمی ماهیان خیاطه به‌طول ۶۲۰ جفت‌باز به‌دست آمد. از مجموع بازها، ۱۴۰ جایگاه Parsim informative و ۵۱۰ جایگاه نیز ثابت بودند. با توجه به نتایج، واگرایی بین گونه‌ای به میزان ۷/۹۱ درصد بین گونه‌های *A. holciki* و *A. qanati* به‌دست آمد. هم‌چنین کمترین میزان نیز بین گونه‌های *A. holciki* و *A. parhami* به‌میزان ۰/۳۲ درصد محاسبه شد. بر اساس نتایج میزان همگرایی درون گونه‌ای نیز برای گونه *A. qanati* به‌میزان ۰/۴۵ به‌دست آمد. لازم به ذکر است در گونه‌های *A. holciki*، *A. parhami* و *A. eichwaldii* واگرایی درون گونه‌ای مشاهده نشد. براساس نتایج چندشکلی پارسیمونی نوکلئوتیدها (جدول ۲)، بین گونه‌های *A. holciki* و *A. parhami* تنها در جایگاه شماره ۶۱۲۰ چند شکلی وجود داشت (A↔G) و بین گونه‌های *A. nicolausi* و *A. idignensis* نیز چند شکلی پارسیمونی مشاهده نشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]



شکل ۲- پراکنش افراد براساس مقادیر فاکتورهای ۱ و ۲ ویژگی‌های ریخت‌سنجی بر اساس تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

شکل ۳- پراکنش افراد براساس مقادیر فاکتورهای ۱ و ۲ ویژگی‌های شمارشی بر اساس تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

جدول ۳- دامنه، میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های شمارشی گونه‌های *Alburnoides parhami* و *Alburnoides holciki*

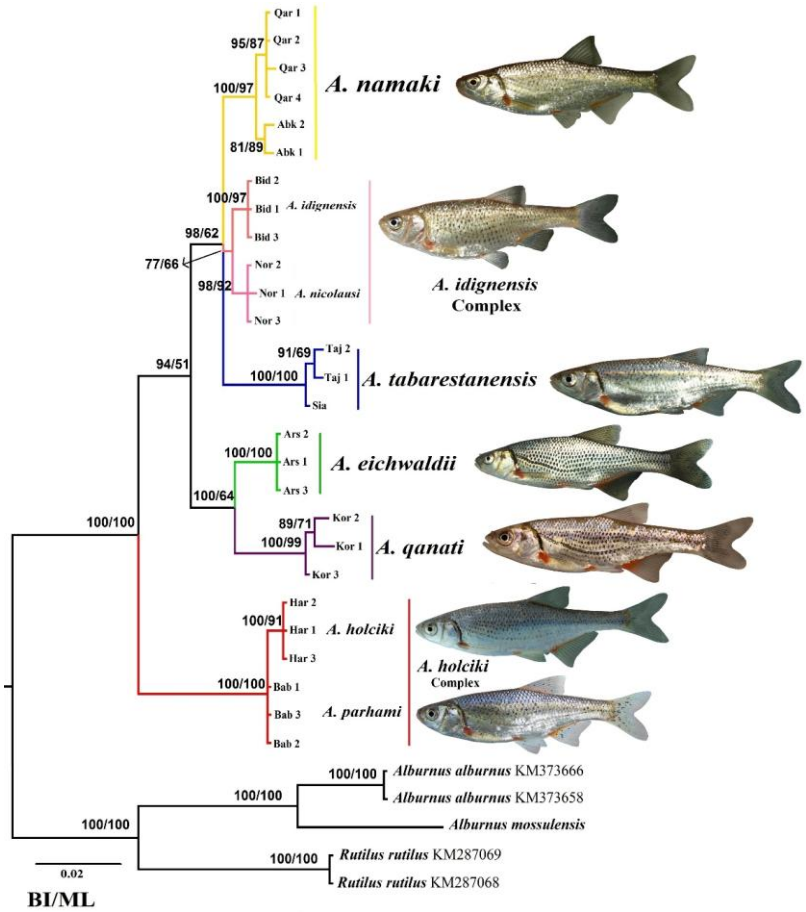
ویژگی	*A. parhami* (Mousavi-Sabet et al. 2015)			*A. parhami* بابا امان			*A. holciki* هریرود		
	دامنه	میانگین	SD	دامنه	میانگین	SD	دامنه	میانگین	SD
اشعه نرم باله پشتی	۹-۷	۷/۹	۰/۲	۹-۷	۷/۵	۰/۳	۹-۸	۸/۷	۰/٤
اشعه نرم باله مخرجی	۱٤-۱۱	۱۲/۳	۰/۷	۱٤-۱۲	۱۲/۰	۰/٦	۱٦-۱۱	۱٤/۱	۱/۳
اشعه باله سینه‌ای	۱٤-۱۱	۱۱/۸	۰/۷	۱٥-۱۱	۱۲/۸	۰/۸	۱٥-۱۳	۱۳/۹	۰/٦
اشعه باله شکمی	٦-۷	٦/۸	۰/۳	٦-۸	۷/۲	۰/٤	۸-۷	۷/۱	۰/٦
تعداد فلس روی خط جانبی	٤٦-٥۲	٤۸/٦	۱/۲	٤٥-٥٥	٤۹/۳	۲/۱	٤٦-٥٥	٤۷/۸	۲/٥
تعداد فلس بالای خط جانبی	۸-۱۱	۹/۸	۰/٥	۷-۱۱	۸/۳	۰/۸	۹-۱۱	۱۰/۹	۰/٥
تعداد فلس زیر خط جانبی	۳-٥	۳/۹	۰/۳	٤-٥	٤/٦	۰/٥	٤-٦	٤/۹	۰/٦
تعداد مهره	۳۹-٤۱	٤۰/۲	۰/٥	۳۹-٤۱	٤۰/۹	۰/٦	٤۰-٤۲	٤۱/۳	۰/٥

همچنین دارنگاره‌های ترسیم شده با استفاده از روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference دارای توپولوژی مشابهی بودند، به‌همین دلیل تنها از دارنگاره Bayesian استفاده شد و اعداد بوت استرپ و احتمال پسین حاصله از هر آزمون بر روی گره‌ها درج شد.

بحث

اخیراً وضعیت گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران مورد مطالعه قرار گرفته و سه گونه جدید از جمله *A. parhami* براساس صفات ریختی از شرق حوضه آبریز کاسپین توصیف شد (Mousavi-Sabet et al. 2015). کلید شناسایی این گونه شامل ویژگی‌های ریختی از جمله کیل شکمی بدون فلس، پوزه بلند، نوک دهان انتهایی که شکاف آن به زیر مردمک چشم می‌رسد، فقدان لکه‌های تیره در فلس‌های خط جانبی، چشم‌های درشت، ٤٦-٥١ فلس روی خط جانبی، ۸ شعاع در باله پشتی و ۱۲-۱۳ شعاع در باله مخرجی، ۱۰ ردیف فلس بالای خط جانبی و ۳۹-٤۱ فلس روی خط جانبی بیان شده‌است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]



شکل ٤- دارنگاره حاصل از روش Bayesian برای گونه‌های جنس *Alburnoides* مورد مطالعه، بر روی گره‌ها اعداد بوت استرپ (۱۰۰x) و میزان احتمال پسین درج شده‌است. اعداد ذکر شده در انتهای خوشه‌ها نیز شماره دسترسی توالی‌ها در بانک جهانی NCBI است.

جدول ٤- نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدهای تشخیصی (Parsim-Informative site) توالی‌های به‌دست آمده از این پژوهش و بانک ژن (NCBI).

جایگاه‌ها نسبت شماره‌های جایگاه‌های توالی کامل ژنوم میتوکندریایی گونه *Oryzias latipes* (AP004421) سنجیده شده‌است

٥٩٢٩	٥٩١٣	٥٩١٠	٥٨٦٢	٥٨٦٥	٥٨٤٤	٥٨٢٩	٥٨٢٠	٥٨١٧	٥٨٠٨	٥٧٨٨	٥٧٨٥	٥٧٦٧	٥٧٦٤	٥٧٣٠	٥٧٣٠	٥٧٢١	٥٥٦٨	٥٣٣٢	
T	A	A	C	A	A	A	C	A	T	C	C	C	C	C	A	A	A	C	*A. eichwaldii*
T	G	G	T	T	G	G	T	C	T	T	T	T	T	C	G	C	G	T	*A. holciki*
T	G	G	T	T	G	G	T	C	T	T	T	T	T	C	G	C	G	T	*A. parhami*
C	A	A	C	A	G	A	C	A	C	C	C	T	C	T	A	A	A	C	*A. idignensis*
T	A	C	C	A	G	A	C	A	C	C	C	T	C	T	A	A	A	C	*A. namaki*
C	A	A	C	A	G	A	C	A	C	C	C	T	C	T	A	A	A	C	*A. nicolausi*
T	A	A	C	A	A	A	C	G	T	C	C	C	C	C	A	A	A	C	*A. qanati*,
T	A	A	C	A	G	A	C	A	C	C	C	T	C	T	A	A	A	C	*A. tabarestanensis*

٦١٥٣	٦١٤٧	٦١٢٠	٦١١٧	٦٠١٥	٦٠٤٩	٦٠٤٥	٦٠٣٦	٦٠١٨	٦٠٠٣	٦٠٠٠	٥٩٩٧	٥٩٩١	٥٩٧٩	٥٩٧٦	٥٩٦٧	٥٩٦٤	٥٩٣٤	
C	T	A	C	C	T	A	G	G	C	C	A	T	C	A	A	T	C	*A. eichwaldii*
C	C	**G**	C	T	C	G	T	A	A	G	G	C	T	A	G	C	T	*A. holciki*
C	C	**A**	C	T	C	G	T	A	A	G	G	C	T	A	G	C	T	*A. parhami*
T	T	A	T	C	T	A	T	G	C	C	A	T	T	G	A	T	C	*A. idignensis*
T	T	A	T	C	T	A	T	G	C	T	A	T	T	G	G	T	C	*A. namaki*
T	T	A	T	C	T	A	T	G	C	T	A	T	T	G	A	T	C	*A. nicolausi*
C	T	A	C	C	T	A	G	G	C	C	A	T	C	A	A	T	T	*A. qanati*,
T	T	G	C	C	T	A	T	G	C	T	G	T	T	G	A	T	C	*A. tabarestanensis*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

جدول ۵- میزان واگرایی محاسبه شده (درصد) بین گونه‌ای برای گونه‌های جنس *Alburnoides* مورد مطالعه در ایران.

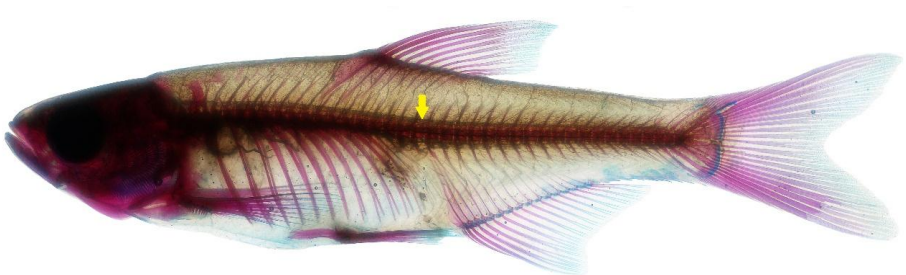
گونه	ردیف	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
A. eichwaldii	۱							
A. holciki	۲	۷/۱٤						
A. parhami	۳	٦/۷٤	۰/۳۲					
A. idignensis	٤	۳/۲٦	٦/۲٥	٥/۸٦				
A. namaki	٥	٤/۱۹	٦/٥٤	٦/۱٤	۱/٦۲			
A. nicolausi	٦	۳/٥٦	٦/۳۹	٥/۹۹	۰/۷۰	۱/٥٦		
A. qanati	۷	۳/٤٥	۷/۹۱	۷/٥۰	٤/٦۲	٥/٥٦	٤/۹۳	
A. tabarestanensis	۸	٥/۲۸	۷/٦٤	۷/٦٤	۳/۱٥	۳/۷۱	۳/۰۹	٦/۷٤

جدول ٦- میزان واگرایی محاسبه شده (درصد) درون گونه‌ای برای گونه‌های جنس *Alburnoides* مورد مطالعه در ایران

ردیف	گونه	واگرایی (درصد)	ردیف	گونه	واگرایی (درصد)
۱	*A. eichwaldii*	۰/۰۰	٥	*A. namaki*	۰/۳۳
۲	*A. holciki*	۰/۰۰	٦	*A. nicolausi*	۰/۰۰
۳	*A. parhami*	۰/۰۰	۷	*A. qanati*	۰/٤٥
٤	*A. idignensis*	۰/۱۱	۸	*A. tabarestanensis*	۰/۳۲



شکل ٥- نمای جانبی گونه *Alburnoides holciki* (بالا) و *Alburnoides parhami* (پایین)



شکل ٦- نمای جانبی نمونه شفاف و رنگ‌آمیزی شده گونه *Alburnoides parhami*. نوک پیکان محل شروع اولین مهره شکمی را نشان می‌دهد.

در توصیف این گونه ذکر شده که هیچ صفت شاخصی برای متمایز ساختن آن از دیگر گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران وجود ندارد به‌عبارت دیگر این گونه تنها براساس مجموعه‌ای از صفات ریخت‌سنجی از سایر گونه‌های این جنس قابل تفکیک است. Mayr (1974, 1982a, 1982b) معتقد است، بزرگی جثه و در نتیجه نسبت‌ها بیش از سایر صفات دارای تغییرات جغرافیایی بوده و تقریباً در همه گونه‌های جانوری از جمله ماهی‌ها وجود دارد. در اکثر گونه‌های جانوری نسبت‌ها، به‌ویژه نسبت‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

مربوط به ضمائم مانند نسبت تنه به سر و باله‌ها تغییرات زیادی می‌کند.

همچنین Karakousis (1991) معتقد است وجود تغییرات بین جمعیت‌ها تا ۸۰ درصد و یا بیش‌تر تحت تاثیر اندازه‌های نمونه‌های مورد مطالعه باشد، حال آنکه ممکن است تغییر معنی‌داری در سطح جمعیت وجود نداشته باشد. علاوه بر این اندازه‌گیری صفات ریختی اغلب به‌دلیل خطاهای انسانی دارای دقت بالایی نیست و این امر می‌تواند باعث خطا در جداسازی جمعیت‌ها و گونه‌ها شود. بنابراین دو عامل خطای انسانی و وجود تفاوت‌های طولی در نمونه‌های مورد مطالعه، همواره باعث می‌شوند که در مطالعات آرایه‌شناسی به‌ویژه در گونه‌هایی با تغییرات ریختی بالا بالا صرفاً نتوان به داده‌های ریخت شناختی اکتفا نمود. مصداق این امر مطالعه جولاده و همکاران (۱۳۹٤) است که با بررسی نمونه‌های تیپوتایپ گونه‌های مختلف جنس *Alburnoides* در ایران نتایج کاملاً متفاوتی را علی‌رغم شباهت روش بررسی نسبت به توصیف کنندگان به‌دست آوردند.

به‌علاوه شیب تغییرات صفات (Cline) نیز در اغلب مواقع باعث نتیجه‌گیری توام با خطا می‌شود. اصطلاح Cline مربوط به صفتی خاص از جمله طول بدن، طول سر، طول باله‌ها است که در سطح جمعیت برای تطبیق با شرایط موضعی دارای تنوع است، هر جمعیت می‌تواند به اندازه صفات متغییرش Cline داشته باشد، استقلال بالقوه شیب‌ها سبب می‌شود، تا نتوان Cline را به‌عنوان صفت تاکسونومیکی مورد استفاده قرار داد. Mayr (1974, 1982a, 1982b) معتقد است صفات دارای Cline از لحاظ تاکسونومیکی فاقد صلاحیت جداسازی جمعیت‌ها است. در اغلب مواقع وقتی به‌تدریج به حاشیه دامنه توزیع یک گونه نزدیک می‌شویم از هماهنگی بین فنوتیپ، رفتار و فیزیولوژی بین افراد هر گونه کاسته می‌شود، بنابراین تغییرات جمعیت افراد حاشیه‌ای با مرکزی به حداکثر می‌رسد، این امر همواره به‌عنوان عاملی گمراه کننده برای ریخت‌شناسان برای توصیف یک جمعیت نسبتاً متمایز نسبت به جمعیت‌های مرکزی به‌عنوان گونه‌ای جدید است. Mayr (1974, 1982a, 1982b) اذعان می‌دارد هرگاه از آزمون‌های نسبتاً دقیق استفاده شود جمعیت‌ها از نظر ریختی و یا سایر ویژگی‌ها با هم تفاوت دارند، که درجه این تفاوت بین جمعیت‌ها ممکن است از تشابه کامل آغاز شده و تا مرحله تقریبی تمایز در سطح گونه پیش رود. با توجه به این مورد به‌نظر می‌رسد ویژگی های توصیفی و تفاوت‌های بر شمرده شده *A. parhami* سطح عادی تفاوت در سطح جمعیت (تغییرات درون گونه‌ای) و به نوعی Cline صفات باشد.

حتی در صورت مفروض بودن عدم وجود Cline در صفات توصیف *A. parhami* دارای ابهاماتی دیگری نیز است به‌عنوان مثال می‌توان به فرمول ستون مهره توصیف این گونه اشاره نمود (Mousavi-Sabet et al. 2015) که بر اساس نتایج، ترکیب۲۰+۲۰ و ۲۱+۲۰ به‌عنوان کلید ستون مهره *A. parhami* ارائه شده‌است در حالی‌که در شکل ٦ نمونه شفاف شده از محل تیپ *A. parhami* فرمول ستون مهره ۲۱+۱۹ را نشان می‌دهد که از کلیدهای شناسایی اصلی برای شناسایی برای گونه *A. holciki* بوده و در تناقض توصیف *A. parhami* است (شکل ٦). با توجه به مطالب فوق می‌توان چنین بیان نمود که ویژگی‌های ریختی حداقل در مورد گونه *A. parhami* قدرت تفکیکی لازم را جهت جداسازی آن را از دیگر گونه‌های جنس *Alburnoides* در ایران ندارد.

در گذشته صرفاً از ویژگی‌های ریخت‌شناسی برای مطالعات آرایه‌شناسی گونه‌ها استفاده می‌شد، اما امروزه به‌منظور اجتناب از خطاهای ذکر شده، از روش‌های مولکولی به‌عنوان روشی مکمل و تایید کننده استفاده می‌شود. با توجه به نتایج داده‌های مولکولی، گونه *A. holciki* با گونه *A. parhami* تفاوت بسیار اندک با فاصله‌ی ژنتیکی در حدود ۰/۳۳ درصد در سطح ژن *COI* دارد. به‌علاوه براساس نتایج چند شکلی نوکلئوتیدهای تشخیصی ژن *COI*، تنها یک نوکلئوتید میان این دو گونه متفاوت است به‌عبارت دیگر این گونه نوکلئوتید A↔G در جایگاه ٦۱۲۰ (بر اساس شماره جایگاه *Oryzias latipes*) تبدیل شده‌است. همچنین براساس نتایج دارنگاره ترسیم شده می‌توان مشاهده نمود که نمونه‌های *A. parhami* در خوشه‌ای با فاصله‌ای بسیار اندک نسبت به گونه *A. holciki* قرار گرفته است، بنابراین اختلاف ۰/۳۲ درصدی و تنها تغییر در یک نوکلئوتید نمی‌تواند دلیل کافی برای تمایز این گونه از *A. holciki* باشد. با توجه به نتایج فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای در بین نمونه‌های مورد مطالعه به‌نظر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]

می‌رسد که نرخ جهش ژنتیکی درون گونه‌ای جنس *Alburnoides* نسبتاً زیاد است و ماهیان این جنس نسبت به تغییرات زیستگاهی، اقلیمی پاسخ ریختی بالایی از خود بروز می‌دهند (Eagderi et al. 2013) که به تبع آن ساختار ژنتیکی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به‌عنوان مثال نرخ واگرایی درون جمعیتی در بین گونه *A. qanati* در حدود ۰/۴۵ درصد برآورد شده‌است که از نرخ واگرایی بین گونه‌های *A. parhami* و *A. holciki* بیش‌تر است. براساس نتایج این تحقیق که با تلفیق روش‌های مختلف ریخت‌سنجی و مولکولی انجام شد، اعتبار *A. parhami* از لحاظ مولکولی تایید نگردید بنابراین پیشنهاد می‌شود این گونه مترادف *A. holciki* در نظر گرفته شود و از فهرست ماهیان ایران حذف شود.

منابع

Eagderi S, Esmaeilzadegan E, Maddah A 2013. Body shape variation in riffle minnows (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) populations of Caspian Sea basin. Taxonomy and Biosystematics 5: 1-8. (in Farsi).

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D 2012. jModelTest 2:More models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. Nature methods 9: 772-772.

Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak E, Taylor E, Burridge M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. PLoS One 18:e2490.

Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S (2017). Study on phylogenetic of *Alburnoides namaki* Bogutskaya and Coad, 2009 using COI gene. Genetic Novin 11: 531-538. (in Farsi)

Jouladeh-Roudbar A, Eagderi S, Esmaeili HR, Coad BW, Bogutskaya N 2016. A molecular approach to the genus *Alburnoides* using COI sequences data set and the description of a new species, *A. damghani*, from the Damghan River system (the Dasht-e Kavir Basin, Iran) (Actinopterygii, Cyprinidae). ZooKeys 579: 157-181.

Jouladeh-Roudbar A, Rahmani H, Vatandoust S, Najafy M, Rahimi G 2015 A review of morphological character in four described species from *Alburnoids*. Journal of Aquatic Ecology 5:1-17. (in Farsi)

Jouladeh-Roudbar A, Vatandoust S, Eagderi S, Jafari-Kenari S, Mousavi-Sabet H 2015. Freshwater fishes of Iran; an updated checklist. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux) 8:855-909.

Karakousis Y, Triantaphyllidis C, Economidis PS 1991. Morphological variability among seven populations of brown trout, Salmon trutta L., in Greece. Journal of fish Biology 38: 807-817.

Levin BA, Simonov E, Matveyev MP, Artaev ON, Mustafayev NJ, Pashkov AN, Roubenyan HR (2016). DNA barcoding of the fishes of the genus *Alburnoides* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Caucasus. Mitochondrial DNA Part A 1-7.

Mayr E 1947. Ecological factors in speciation. Evolution, 263-288.

Mayr E 1982a. Speciation and macroevolution. Evolution 36: 1119-1132.

Mayr E 1982b. Processes of speciation in animals. In Mechanism of Speciation: 1-19.

Miller SA, Dykes DD, Polesky H 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Mousavi-Sabet H, Vatandoust S, Doadrio I 2015. Review of the genus *Alburnoides* Jeitteles, 1861 (Actinopterygii, Cyprinidae) from Iran with description of three new species from the Caspian Sea and Kavir basins. Caspian Journal of Environmental Sciences 13: 293-331.

Rambaut A 2015. FigTree version 1.4. 0. Available at ht tp://tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree; (assessed: July 27, 2015)

Rambaut A, Drummond AJ 2013. Tracer V1.6. Retrieved from http:// beast.bio.ed.ac.uk/software/tracer/.

Ronquist F, Teslenko M, Mark P, Ayres L, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard A, Huelsenbeck P 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61: 539-42.

Seifali M, Arshad A, Moghaddam FY, Esmaeili HR, Kiabi BH, Daud SK, Aliabadian M 2012. Mitochondrial Genetic Differentiation of Spirlin (Actinopterigii: Cyprinidae) in the south Caspian Sea basin of Iran. Evolutionary Bioinformatics Online 8: 219-227

Silvestro D, Michalak I 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Organisms Diversity and Evolution 12: 335-337.

Stierandová S, Vukić J, Vasil'eva ED, Zogaris S, Shumka, S, Halačka K, Vetešník L, Švátora M, Nowak M, Stefanov T, Koščo J, Mendel J 2016. A multilocus assessment of nuclear and mitochondrial sequence data elucidates phylogenetic relationships among European spirlins (*Alburnoides*, Cyprinidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 94: 479-491.

Taylor WR, Van Dyke GC 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Cybium 9: 107-119.

Ward D, Zemlak S, Innes H, Last R, Hebert D 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences 360:1847-57.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.2.8]