

## تنوع ژنی و رابطه فیلوژنی دو گونه از جنس *Rutilus* در سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس توالی یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی

فریدون چکمه دوز قاسمی\*<sup>۱</sup>، شهرام بهمنش<sup>۱</sup>

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

بندر انزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

تاریخ پذیرش: ۲۰ تیر ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۱ اسفند ۱۳۹۳

### چکیده

رابطه فیلوژنی دو گونه مهم و اقتصادی از جنس *Rutilus* متعلق به خانواده کپورماهیان شامل ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (*Rutilus frisii kutum*) سواحل جنوبی دریای خزر به منظور اثبات وجود رابطه خواهری مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه برداری از باله دم، استخراج DNA به روش PCR با بخشی از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی و روش توالی یابی DNA انجام شد. تعدادی از شاخص‌های تنوع مولکولی و ترسیم درخت‌های فیلوژنی neighbor-joining مدل maximum-likelihood و maximum-likelihood parsimony با ۱۰۰۰ تکرار جهت تجزیه و تحلیل، استفاده شد. ۱۴ هاپلوتاایپ بدست آمد، تنوع هاپلوتاایپی (hd) بین دو گونه ۰/۷۶۱ بود، ۱۱۴ مکان مختلف در کل توالی‌ها به دست آمد. میانگین فاصله ژنتیکی بین دو گونه ۰/۰۹ بود. همچنین درخت‌های فیلوژنی ترسیم شده هر دو گونه در دو شاخه مجزا از هم قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که: تنوع ژنتیکی در هر یک از این دو گونه بالاست و ارتباط نزدیک یا رابطه خواهری بین آنها وجود ندارد.

**کلمات کلیدی:** سواحل جنوبی دریای خزر، *Rutilus*، تنوع ژنی، رابطه فیلوژنی، ژن سیتوکروم b

## مقدمه

خانواده کپورماهیان جزء بزرگترین گروه ماهیان دنیا می باشند. تاکنون حدود ۲۱۰ جنس از این خانواده شناسایی شده و ۲۰۱۰ گونه نیز دارای پراکنش جهانی می باشند (Nelson, 1994). به دلیل وجود تعداد زیاد جنس و گونه، تعیین یک ساختار فیلوژنی مشخص برای این خانواده مشکل می باشد. در گذشته بیشتر مطالعات برای طبقه بندی کپورماهیان بر مبنای روش های مورفومتریک و مرستییک بوده است ولی با پیشرفت روش های ژنتیکی تکنیک های مولکولی بر پایه DNA میتوکندریایی جایگزین روش های قبلی شده است (Howes, 1991; Zardoya and Doadrio, 1999; Tesigenopoulos *et al.*, 2002; Shunping *et al.*, 2008) ژنوم میتوکندریایی اکثر جانوران دارای ۳۷ ژن شامل ۱۳ ژن کد کننده پروتئین، ۲ ژن ریوزومال (rRNA) و ۲۲ ژن انتقال دهنده (tRNA) RNA مورد نیاز برای ترجمه پروتئین، می باشد (Boore, 1999). میتوکندری همچنین دارای یک ناحیه اصلی غیر کد کننده شامل مکان های اولیه برای تکثیر DNA میتوکندریایی و رونویسی RNA میتوکندریایی می باشد. نرخ سریع تکامل میتوکندری تقریباً ۱۰-۵ برابر ژنوم هسته ای بوده، که از طریق مادری به ارث رسیده و در طول دوره تکاملی با چند استثناء بدون تغییر باقی مانده است (Boore, 1999; Habib *et al.*, 2011). بطور کلی نشانگرهای میتوکندریایی بدلیل دستیابی به داده ها و قدرت تجزیه و تحلیل آنها برای مطالعات تکاملی بین جانداران و ژنوم آنها بسیار مناسب می باشد (Boore, 1999; Curole and Kocher, 1999). جنس *Rutilus* دارای پراکنش جهانی بوده و در دریای خزر دوزیر گونه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) و

ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) از این جنس زیست می کنند که در بین ذخایر ماهیان استخوانی سواحل جنوبی از گونه های با ارزش و اقتصادی محسوب شده و از سال های گذشته تا حال به دلیل لذیذ بودن، و کیفیت عالی گوشت در سبد غذایی ساکنین اکثر استان های ساحلی و غیرساحلی قرار گرفته اند. در سال های اخیر عواملی مثل ورود آلودگی های صنعتی و شهری به رودخانه ها، تغییر شرایط زیست محیطی محل های مهاجرت طبیعی، کاهش دبی آب رودخانه ها در فصل مهاجرت و عدم توجه به بازسازی ذخایر جمعیت های مختلف، سبب کاهش ذخایر ماهی کلمه شده است. این عوامل در سواحل جنوبی دریای خزر و سایر نقاط جهان سبب شده تا گونه های مختلف جنس ماهی کلمه در لیست گونه های در معرض خطر انقراض IUCN قرار گیرند (Kiabi *et al.*, 1999; Crivelli, 2006; Freyhof and Kottelat, 2008). اعمال مدیریت صحیح ذخایر آبرزیان و توسعه آبرزی پروری زمانی با موفقیت همراه خواهد بود که ذخایر ژنتیکی گونه های بومی منطقه بطور دقیق و بر مبنای اصول ژنتیکی شناسایی گردد (Lin *et al.*, 2002) و قبل از اجرای هر برنامه مدیریتی یا تولیدی ضرورت دارد تا ساختار ژنتیکی جمعیت های مربوطه را شناسایی و با روش های مولکولی مورد ارزیابی قرارداد و سپس برنامه مدیریتی را برای حفظ و بازسازی ذخایر آن تدوین و اعمال نمود (رضوانی، ۱۳۸۰). در میان روش های مولکولی، توالی یابی DNA یکی از روش های نوین و دقیق مولکولی می باشد که در اکثر آزمایشگاه های شیلاتی و تحقیقاتی جهان به منظور بررسی های خویشاوندی، جمعیتی و ساختار ژنتیکی انواع گونه های ماهیان و سایر آبرزیان مورد استفاده قرار

خزر برای اولین بار از ژن *b* cytochrome میتو کندریایی استفاده گردید.

### مواد و روش‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ نمونه‌های ماهی کلمه از رودخانه لمیر در قسمت جنوب غربی و بندر ترکمن در قسمت جنوب شرقی دریای خزر (جمعا ۱۷ نمونه) و ماهی سفید از رودخانه‌های لمیر، سفیدرود و شیرود (جمعا ۲۹ نمونه) در سواحل جنوبی دریای خزر (شکل ۱) توسط صیادان محلی صید و مقداری از قسمت نرم باله دمی آن‌ها بریده و پس از قرار دادن داخل تیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی الکل ۹۶ درجه به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی بندر انزلی منتقل و قبل از شروع آزمایشات مولکولی به منظور عدم حذف احتمالی الکل داخل ویال و چروکیدگی بافت باله ناشی از آن، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.



شکل ۱: رودخانه‌های نمونه‌برداری از ماهی کلمه و ماهی سفید

در آزمایشگاه DNA ژنومی بافت باله دمی نمونه‌ها با روش استات آمونیوم (McQuowen *et al.*, 2000) استخراج و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به DNA الگو جهت حل شدن اضافه و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به منظور صحت

می‌گیرد. گروهی از محققین با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی، کاریوتایپی و استخوان‌شناسی کپورماهیان را به زیر گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی نموده‌اند (Berg, 1912-1914; Arai, 1982) اما بسیاری از این تقسیم‌بندی‌ها درستی نظریه تکاملی را تایید نمی‌کنند. همزمان با پیشرفت و توسعه انواع روش‌های مولکولی، طبقه‌بندی ماهیان بخصوص کپورماهیان به صورت گسترده‌ای به منظور بررسی روند تکاملی آن‌ها انجام گردید که در این مورد می‌توان به مطالعات Gilles و همکاران در سال ۱۹۹۸ با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA، بررسی‌های Simons و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش توالی‌یابی ژن *b* cytochrome میتو کندریایی و مطالعات He در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش RAPD ژنوم هسته‌ای بر روی کپورماهیان اشاره نمود.

سواحل جنوبی دریای خزر دارای رودخانه‌های متعددی می‌باشد که اکثراً محل مهاجرت و تخم‌ریزی ماهیان مهاجر می‌باشند. ماهی سفید و ماهی کلمه در سواحل جنوبی دریای خزر دارای زمان مهاجرتی و تولید مثلی نزدیک به یکدیگر می‌باشند (اواخر اسفند الی خرداد) و احتمال تولید هیبریدهای طبیعی بین این دو جنس می‌تواند ایجاد شود. به همین دلیل و به منظور اطلاع از این موضوع و با توجه به کاربرد وسیع ژن سیتوکروم *b* میتو کندریایی در بین محققین در جهت بررسی‌های تکاملی گروه‌های مختلف ماهیان (McVeigh and Davidson, 1991; Delin *et al.*, 2006)، ساختار ژنی، رابطه تکاملی و احتمال وجود رابطه خواهری بین جمعیت‌های دو گونه مهم از جنس *Rutilus* مهاجر به رودخانه‌های سواحل جنوبی دریای

باند ژن مورد نظر و نیز کیفیت مناسب آن، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR تمامی نمونه‌ها برداشته و به همراه مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Fermentas GmbH, Germany) با ژل آگارز ۱ درصد حاوی ماده رنگی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و پس از مشاهده باند تکثیر شده در دستگاه ژل داکت دوربین دار متصل به رایانه، تعداد ۴۶ نمونه از محصول PCR (ماهی کلمه ۱۷ عدد، ماهی سفید ۲۹ عدد) به همراه مقداری از آغازگر forward بسته بندی و به شرکت ماکروژن ارسال شد که از آن‌ها پس از خالص سازی (Purify) به عنوان DNA الگو برای توالی‌یابی استفاده گردید. واکنش توالی‌یابی DNA به همراه آغازگر (forward) ژن سیتوکروم *b* با بسته BigDye kit v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) و توسط دستگاه DNA analyzer مدل 3730XL (Applied Biosystems, USA) انجام شد.

جهت تجزیه و تحلیل، اطلاعات نمونه‌های توالی‌یابی شده به صورت فایل‌های کروماتوگرام دریافت و تجزیه و تحلیل آماری آنها به صورت زیر انجام گردید: نمونه‌های کروماتوگرام با نرم افزار Chromas 2.23 بازنگری و سپس با نرم افزار Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) هم‌ردیف (Align) شد. تعداد هاپلو تایپ‌ها، مکان‌های چندشکلی (variablesites)، تنوع هاپلو تایی به همراه واریانس بر اساس مدل Nei (1978)، میانگین فاصله ژنتیکی بر اساس مدل ML و ترسیم درخت‌های فیلوژنی neighbor-joining مدل maximum-likelihood (Saitou and Nei, 1987) و maximum-parsimony (Tamura, 1992) جهت معنی دار بودن آنالیز آماری درخت فیلوژنی. آنالیز تمامی داده‌های

استخراج DNA و بررسی کیفیت آن‌ها از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. از بانک ژن NCBI توالی ثبت شده (AF095610) ژن *Cytochromb* میتوکندریایی ماهی کلمه انتخاب و یک جفت آغازگر به توالی CCT CCC AAC ACC ATC TAA (forward, F55) و CTG AAT AGT AGT GCG (reverse, R880) توسط نرم افزار Gene Runner طراحی شد. به طوریکه در چرخه PCR تولید باندهایی در محدوده ۸۵۰ – ۸۰۰ جفت باز نماید. برای هر نمونه از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در داخل ویال ۰/۲ میلی‌لیتری روی یخ مواد زیر اضافه شد: DNA ۱۰۰ نانوگرم، PCR Buffer با غلظت 10 X (سیناژن، ایران)، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، هر آغازگر با غلظت ۱۰ ماکرومول و آنزیم *Taq DNA* پلی-مرز با غلظت ۵۰ μl (سیناژن، ایران)، آب مقطر استریل، حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. یک ویال جداگانه به عنوان کنترل منفی حاوی تمامی مواد بجز DNA الگو در کنار بقیه نمونه‌ها PCR شد. واکنش PCR داخل دستگاه ترمال سایکلر BIOER مدل XP cyclo (XP cyclo gradient, 96 plus, Bioer, China) انجام شد و چرخه‌های حرارتی پس از بهینه سازی شامل: یک سیکل ۵ دقیقه‌ای به عنوان واسرشته‌سازی اولیه (initial denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل شامل ۶۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای اتصال آغازگر (annealing)، ۶۰ ثانیه مرحله بسط (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی ژن تکثیری بود. به منظور بررسی تکثیر اندازه

سفید سفیدرود، KF056858 ماهی سفید لمیر). هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین دو گونه مشاهده نشد و بیشترین تعداد هاپلوتایپی متعلق به گونه کلمه بود (جدول ۱). ۱۱۴ جایگاه ژنی متغیر و تنوع هاپلوتایپی بین دو گونه ۰/۷۶۱ محاسبه گردید، میانگین فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه ۰/۰۹ بود، تنوع هاپلوتایپی مناسب به دست آمده نشان از تنوع ژنتیکی بین این دو گونه از جنس *Rutilus* در مناطق مورد مطالعه سواحل جنوبی دریای خزر بود.

نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزارهای Mega4، Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 1992) و Dna SP (Rozas *et al.*, 2003) انجام گردید.

## نتایج

توالی ۴۶ نمونه ژن سیتوکروم *b* ماهی کلمه و سفید پس از بازنگری در نرم افزار Mega4 و تحت شبکه NCBI به اندازه ۷۰۵ باز (bp) هم‌ردیف (Align) و توالی ژن یک نمونه از هر منطقه در بانک ژن NCBI ثبت شد (KF056854 کلمه ترکمن، KF056855 کلمه لمیر، KF056856 ماهی سفید شیروود، KF056857 ماهی

جدول ۱: تعداد و پراکنش هاپلوتایپی ژن سیتوکروم *b* بین ماهی کلمه و ماهی سفید

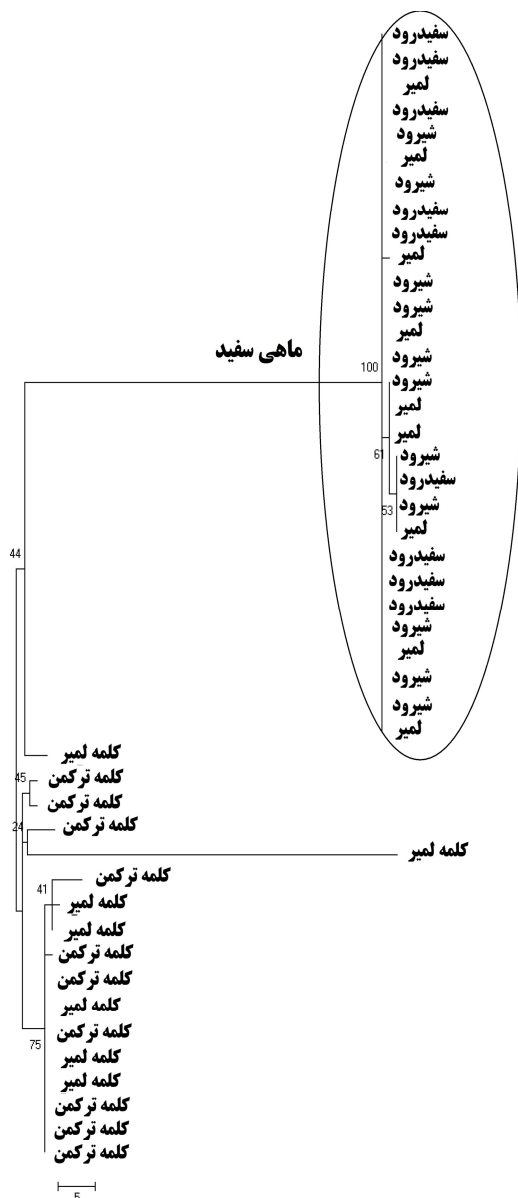
هاپلوتایپ													گونه	
H14	H13	H12	H11	H10	H9	H8	H7	H6	H5	H4	H3	H2		H1
-	-	-	-	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۸	۱	ماهی کلمه
۱	۳	۲۱	۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ماهی سفید

تخم‌ریزی به رودخانه‌های سواحل جنوبی دریای خزر مهاجرت می‌کنند، با بخشی از ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی و روش توالی‌یابی DNA انجام گردید. درده‌های اخیر تحقیقات بر روی ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف آبریان با استفاده از روش‌های نوین مولکولی در بیشتر کشورهای جهان رایج شده و استفاده از نتایج آن‌ها سبب اعمال مدیریت علمی و صحیح در راستای ازدیاد ذخایر آبریان و نیز افزایش تولید در صنعت آبریز‌پروری شده است. اطلاع و آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی و جمعیتی گونه‌های آبریان و برخورداری از تکنیک‌های سریع و قابل اعتماد برای تعیین میزان خویشاوندی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای راه‌گشای بسیار مناسبی جهت تصمیم‌گیری مدیران اجرایی می‌باشد (Palumbi *et al.*, 1991).

در ترسیم درخت فیلوژنی Neighbor-Joining (شکل ۲) تمامی نمونه‌های ماهی سفید در یک شاخه یا کلادوگرام مجزا و بلندتری از نمونه‌های توالی‌یابی شده ماهی کلمه قرار داشتند. در ترسیم درخت فیلوژنی Maximum parsimony (شکل ۳) حد معنی‌دار بودن آماری، جدا بودن نمونه‌های ماهی سفید از نمونه‌های ماهی کلمه در یک شاخه مجزا، با درصد بسیار بالایی (۱۰۰ درصد) مورد تأیید قرار گرفت و این مسئله حاکی از عدم وجود رابطه خواهری بین این دو گونه بود.

## بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی رابطه فیلوژنی جمعیت‌های دو گونه مهم اقتصادی از جنس *Rutilus* که در فاصله زمانی نسبتاً نزدیکی جهت



شکل ۳: درخت فیلوژنی ژن سیتو کروم *b* بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه به روش Maximum parsimony



شکل ۲: درخت فیلوژنی ژن سیتو کروم *b* بین دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه به روش Neighbor-Joining

هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده از نمونه‌های دو گونه و عدم اشتراک آنها با یکدیگر می‌تواند به این دلیل باشد که گونه ماهی سفید مهاجرت تولید مثلی خود به این رودخانه‌ها را زودتر از گونه ماهی کلمه که از اواخر اسفند الی اواسط اردیبهشت شروع می‌شود، انجام می‌دهد (Derzhavin, 1934). بطور کلی در دهه‌های گذشته سیاست‌های بازسازی ذخایر ماهی سفید در

زمانی که گونه خاصی از ماهیان قرار است به‌عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود اطلاع از ساختار ژنتیکی، جمعیتی و رابطه خویشاوندی با سایر گونه‌های هم‌جنس آنها می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در احیای ذخایر شیلاتی آنها بکار گرفته شود (Seeb et al., 1990). بر اساس نتایج این تحقیق تنوع هاپلوتایپی بسیار بالایی بین این دو جنس به‌دست آمد. تعداد

رودخانه‌ها بر اساس تکثیر مصنوعی بوده و نقش تکثیر طبیعی به صفر رسیده است و این عامل می‌تواند توضیحی مبنی بر عدم وجود هاپلوتایپ‌های مشترک بین این دو گونه و به دلیل عدم ایجاد تلاقی طبیعی در رودخانه‌ها و در فصول مهاجرت تولیدمثلی باشد. Ketmeier و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی ساختار ژنتیکی و فایلوژنتیکی جنس *Rutilus* از خانواده کپورماهیان با ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی و روش توالی‌یابی DNA پرداختند. در بررسی آن‌ها با توجه به اینکه مشخصات مورفومتریک و مرستیک متفاوتی بین دو گونه *Rutilus frisia* و *caspicus Rutilus* وجود داشت فاصله ژنتیکی بسیار کمی بین آن‌ها به دست آوردند. عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) روابط فیلوژنی باربوس‌ماهیان جنوب ایران را با روش توالی‌یابی ژن سیتوکروم *b* مورد مطالعه قرار دادند. در دندوگرام رسم شده ایشان که به روش‌های Neighbor-Joining و maximum-parsimony انجام شد مشخص گردید که دو گونه *Schizothorax zarudnyi* و *Schizocypris altidorsalis* در ارتباط نزدیک به هم یعنی در یک گروه خاوه‌ری قرار داشته و هم‌گروه با گونه *Barbus sharpeyi* قرار دارند. Miranta و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی ساختار ژنی و روابط تکاملی جنس *Rutilus* در پانزده نواحی جنوبی دریاچه بالکان پرداختند و برای دانستن این مسئله که آیا نمونه‌های کلمه منطقه بالکان با نمونه‌های کلمه دریای خزر قرابت دارند، از هاپلوتایپ‌های جنس *Rutilus* دریای خزر (Ketmaier et al., 2008) و دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه ثبت شده در بانک ژن NCBI استفاده نمودند. در ترسیم درخت فیلوژنی گونه‌های ماهی سفید و ماهی کلمه دریای خزر در یک خوشه قرار گرفتند که این

مسئله با توجه به اینکه این دو گونه از لحاظ بسیاری از پارامترهای مورفولوژیکی دارای اختلاف می‌باشند (Kottelat and Freyhof, 2007) برای ایشان تعجب آور بود. ایشان با مشاهده هاپلوتایپ‌های تایید نشده موجود در بانک ژن احتمال دادند که نزدیکی گونه‌های ماهی سفید و کلمه دریای خزر می‌تواند به خاطر ادغام ژنوم میتوکندریایی این دو گونه به دلیل ایجاد هیبریداسیون بین آنها بوده باشد. در واقع وقوع هیبریداسیون و ادغام ژنوم میتوکندریایی در خانواده کپورماهیان یک پدیده معمولی و مشترک می‌باشد به طوری که در مطالعه Larmuseau و همکاران (۲۰۰۹) ادغام ژنوم میتوکندریایی ماهی سفید در ماهی کلمه و ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در ماهی کلمه گزارش شده است. در مطالعه حاضر میانگین فاصله ژنتیکی بین این دو گونه که از لحاظ مشخصات مورفولوژیکی دارای تفاوت‌های بسیار زیادی با یکدیگر می‌باشند کم به دست آمد (۰/۰۹) و این عامل با توجه به تنوع هاپلوتایپی بالا بین آنها کمی گیج کننده بوده و نمی‌توان دلیل قانع کننده‌ای برای آن اعلام نمود. هرچند که نتایج به دست آمده از توالی‌های ژن سیتوکروم *b* این بررسی دقیق می‌باشد ولی این اطلاعات بر اساس بخشی از ژنوم میتوکندریایی است که از طریق مادری به ارث می‌رسد، بدیهی است که برای اثبات این مسئله که آیا این دو گونه از یک دودمان یا دودمان‌های مختلفی هستند، نیاز به بررسی‌های بیشتر با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و سایر مارکرهای مولکولی میتوکندریایی و DNA هسته‌ای در کنار سایر نمونه‌های مناطق مختلف جهان می‌باشد تا اطلاعات دقیق و جامعی از وضعیت جمعیتی و زیستی آن‌ها به دست آمده و مسئولین شیلاتی با اعمال سیاست‌های دقیق‌تر علمی

صورت نیاز با ایجاد دورگه‌های آن‌ها گونه جدیدی را به صنعت آبرزی پروری معرفی نمایند.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

۱. رضوانی گیل کلایی، س.، بابایی، س.ع.، پور کاظمی، م.، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I به روش RFLP. مجله علمی شیلات ایران، ۲، ۳۰-۱۵.
۲. عزیزی، م.ر.، قرایی، ا.، غفاری، م.، ۱۳۹۱. بررسی روابط فیلوژنی باربوس ماهیان جنوب ایران بر اساس توالی ژنی سیتوکرم *b*. ژنتیک نوین، ۸(۳)، ۳۲۰-۳۱۳.
3. Arai, R., 1982. A chromosome study on two Cyprinid Fishes, *Acrossocheiluslabiatus* and *Pseudorasborapumilapumila*, with notes on Eurasian Cyprinids and their karyotypes. Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo Ser. A 8, 131-152.
4. Berg, L.S., 1912-1914. Faune de la Russie, etc. Poissons. St. Petersburg, Petrograd 3 (1-2), 189-288.
5. Bogutskaya, N.G. and Iliadou, K. 2006. *Rutiluspanosi*, a new roach from Western Greece (Teleostei: Cyprinidae). Zoosystematica Rossica, 14, 293-298.
6. Bianco, P.G., Ketmaier, V., 2001. Anthropogenic changes in the freshwater fish fauna of Italy, with reference to the central region and *Barbusgraellsii*, a newly established alien species of Iberian origin. Journal of Fish Biology, 59, 190-208.
7. Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes, Nucleic Acids Res, 27, 1767-1780.
8. Crivelli, A.J., 2006. *Rutilusprespensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 October 2013.

مبنی بر حفظ و احیای ذخایر جمعیت‌های این دو گونه منحصر به فرد سواحل جنوبی دریای خزر در صورت لزوم با ایجاد دورگه‌های جدید از آن‌ها گونه جدیدی را به صنعت آبرزی پروری معرفی نمایند.

Bogutskaya و Lliadou (۲۰۰۶) با استفاده از بررسی‌های مورفولوژیکی نتوانستند دو گونه *Rutilusfrissi* و *Rutiluspigus* را در یک خوشه از دندوگرام فایلوژنتیکی قرار دهند در حالی که بنظر می‌رسید این دو گونه از یک زیر جنس (*Pararutilus*) بودند. در دندوگرام حاصل از روش Neighbor-Joining این بررسی، دو گونه ماهی سفید و ماهی کلمه در دو خوشه کاملاً مجزا از یکدیگر قرار گرفتند که نشان از عدم ارتباط نزدیک با یکدیگر بود (رابطه خواهری) و دندوگرام حاصل از روش Maximum parsimony با ۱۰۰۰ تکرار و درصد بالایی آن را تأیید نمود. در واقع تغییرات اکولوژیکی در سواحل جنوبی دریای خزر و تخریب رودخانه‌های مهم مهاجرت ماهیان، صید بی‌رویه و کاهش ذخایر ماهی کلمه و نیز تاثیر عوامل انسانی مبنی بر بازسازی ذخایر ماهی سفید تنها از طریق تکثیر مصنوعی طی دهه‌های اخیر می‌تواند ناشی از این مسئله باشد. در واقع تاثیر عوامل انسانی در راستای تغییر تنوع ژنتیکی در جنس *Rutilus* بیان شده است (Bianco and Ketmaier, 2001).

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان عنوان نمود که ماهی سفید و ماهی کلمه سواحل جنوبی دریای خزر از تنوع ژنتیکی خوبی برخوردارند، هرچند که هر دو گونه از یک جنس هستند ولی هیچگونه ارتباط نزدیک یا خواهری بین آن‌ها مشاهده نگردید. بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیران شیلاتی مبنی بر احیاء ذخایر این دو گونه متمر ثمر بوده و در

20. Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
21. Larmuseau, M.H., Freyhof, D.J., Volckaert, F.A.M., Van Houdt, J.K.J., 2009. Matrilinear phylogeography and demographical patterns of *Rutilus rutilus*: implications for taxonomy and conservation. Journal of Fish Biology, 75, 332–353.
22. Lin, Y.S., Poh, Y.P., Lin, S.M., Tzeng, C.S., 2002. Molecular techniques to identify freshwater Eels. Zoological studies, 41(4), 421–430.
23. McQuown, E., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., May, B., 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in Sturgeon (Acipenseridae): new primer sequence for Scaphirhynchus and Acipenser. Trans. American Fish Society, 129, 1380–1388.
24. McVeigh, H.P., Davidson, W.S., 1991. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. Fish Biology, 39, 277–28.
25. Miranta, T., Andreas, G., Ioannis, A. G., Ioannis, L., Apostolos, P. A., 2014. Phylogenetic relationships among Southern Balkan *Rutilus* species inferred from cytochrome *b* sequence analysis: Microgeographic resolution and taxonomic implications. Biochemical Systematics and Ecology, 54, 172–178.
26. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89, 583–590.
27. Nelson, J.S., 1994. Fishes of the World. John Wiley and Sons, Inc., New York.
28. Palumbi, S., Martin, R.A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's Guide to PCR, Version 2. University of Hawaii Zoology Department, Honolulu.
29. Rozas, J., Sa'nchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19, 2496–2497.
30. Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406–425.
31. Seeb, L.W., Seeb, J.E., Polovina, J.J., 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirus marginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. Fish Bull, 88, 713–718.
9. Curole, A.P., Kocher, T.D., 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes, Trends Ecol, 14, 394–398.
10. Delin, Q., Taiping, L., Xinquan, Z., Songchang, G., Junxiang, L., 2006. Mitochondrial cytochrome *b* Sequence Variation and Phylogenetics of the Highly Specialized Schizothoracine Fishes (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibet Plateau. Biochemical Genetics, 44, 270–285.
11. Derzhavin, J.V., 1934. Freshwater fishes of the southern shore of the Caspian Sea. Nauk SSSR, Sektor Zoologii, Baku, 7 91–126. In Russian. Abstract to English.
12. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131, 479–49.
13. Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Rutilus lykiensis*. *Rutilus panosi*. *Rutilus rutilus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 October 2013.
14. Gilles, A., Lecointre, G., Faure, E., Chappaz, R., Brun, G., 1998. Mitochondrial phylogeny of the European cyprinids: implications for their systematics, reticulate evolution, and colonization time. Molecular Phylogenetics, 10(1), 132–143.
15. Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A.S., Singh, A., Khan, A.A., 2011. Evaluation of cytochrome *b* mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channamarulius* (Channidae: Perciformes). Molecular Biology Reports, 38, 841–846.
16. He, S., 2000. The phylogeny of primitive cyprinidae by the method of RAPD, Act. Hydrobiol, 2000, 24(2), 101.
17. Howes, G.J., 1991. Systematics and biogeography: an overview. In: Winfield, I.J., Nelson, J.S. (Eds.), Biology of Cyprinids. Chapman and Hall Ltd., London, 1–33.
18. Ketmaier, V., Bianco, P.G., Durand, J.D., 2008. Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (*Rutilus*, Teleostei, Cyprinidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 49, 362–367.
19. Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian basin of Iran. Journal of Zoology in the Middle East, 18, 57–65.

35. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997 The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid. Res*, 24, 4876–4882.
36. Tsigenopoulos, C.S., Rab, P., Naran, D., Berrebi, P., 2002, Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers, *Heredity*, 8, 466–473.
37. Zardoya, R., Doadrio, I., 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolutionary*, 49, 227–237.
32. Simons, A.M., Knott, K.E., Mayden, R.L., 2000. Assessment of monophyly and evolution of nest association in the minnow genus *Pteronotropis* (Teleostei: Cyprinidae). *Copeia* 2000, 4, 1068–1075.
33. Shunping, R., Mayden, L., Xuzheng, W., Wei, W., Kevin, L., Tang, W., Weijen, C., Yiyu, C., 2008. Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal protein coding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 818–829.
34. Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678–687.