

Taxonomy of Spirilins (*Alburnoides* spp.) in Iran

Yazdan Keivany^{1*}, Sedigheh Mahmoodi²,
Salar Dorafshan¹, Mansoureh Malekian¹

1. Associate Professor, Department of Natural Resources,
Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111, Iran.
2. M. A., Department of Natural Resources, Isfahan University
of Technology, Isfahan, Iran.

(Received: May 17, 2017- Accepted: Feb. 15, 2023)

تاکسونومی ماهی خیاطه در ایران (*Alburnoides* spp.)

یزدان کیوانی^{۱*}، صدیقه محمودی^۲، سالار درافشان^۱،
منصوره ملکیان^۱

۱. دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، ایران.
۲. کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان،
اصفهان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۶)

Abstract

So far, 13 species were recently recognized in the Iranian basins. In the present study the variation among *A. eichwaldii*, *A. namaki*, *A. idignensis*, and *A. nicolausi*, *A. qanati* *A. petrubanarescui* has been investigated from morphological and molecular approaches. To study the morphological characteristic, 144 specimens of these six species were used, on which 22 morphometrics were measured. Nine meristics characteristics were counted. Analysis of variance (ANOVA), discriminant analysis, and principal component analysis was performed. In the molecular studies, sequences of the mitochondrial gene, cytochrome *b* from six species were sequenced and analyzed. The morphological results of the data showed a high similarity among species, but could separate *A. nicolausi* and *A. idignensis* according to the PC1. Also *A. idignensis* and *A. petrubanarescui* are more similar based on the PC2. Moreover, based on meristic characteristics which were relatively similar, again *A. nicolausi* and *A. idignensis* could be separated by the first component. The phylogenetic analysis using Maximum Likelihood (ML) and Maximum-Parsimony (MP) methods supported the monophyletic status of the six species, suggesting their status as different species. The results of the molecular analysis showed that *A. eichwaldii* and *A. petrubanarescui* have the most similarity (about 99%) and the *A. idignensis* has the maximum difference (about 85%) with the other species. These results justify the results of morphometric analysis.

Keywords: *Alburnoides*, gene, meristics, mitochondry cytochrome *b*, morphology, morphometrics, taxonomy.

چکیده

از ایران تا کنون ۱۳ گونه از جنس *Alburnoides* گزارش شده که در پژوهش حاضر وضعیت آرایه‌شناختی گونه‌های *A. petrubanarescui*، *A. eichwaldii*، *A. idignensis*، *A. nicolausi*، *A. namaki* و *A. qanati* با استفاده از صفات ریخت‌سنجی نسبی و شمارشی و ژن سیتوکروم *b* مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات ریخت‌سنجی و شمارشی در ۱۴۴ نمونه بررسی شد. در مطالعات مولکولی سه نمونه از محصول پی‌سی‌آر هر گونه توالی‌یابی شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات نسبی اندازه‌گیری هم‌پوشانی بالایی بین گونه‌ها مشاهده شد، اما تا حدودی *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول و *A. idignensis* و *A. petrubanarescui* براساس مؤلفه دوم از همدیگر تفکیک شدند. در صفات شمارشی نیز به نسبت کم‌تری هم‌پوشانی دیده شد. گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول از یکدیگر مجزا شدند و گونه *A. eichwaldii* براساس مؤلفه دوم از سایر گونه‌ها جدا شد. در تجزیه خوشه‌ای صفات نسبی اندازه‌گیری دو گونه *A. namaki* و *A. nicolausi* و همچنین دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* شباهت بیش‌تری با یکدیگر داشتند، اما در صفات شمارشی، دو گونه *A. eichwaldii* و *A. qanati* دارای شباهت بیش‌تری با یکدیگر بودند. در تجزیه داده‌های مولکولی گونه‌های *A. eichwaldii* و *A. petrubanarescui* بیش‌ترین شباهت (۹۹ درصد) و گونه *A. idignensis* (۸۵ درصد) بیش‌ترین تفاوت را نسبت به دیگر گونه‌ها نشان دادند. هم‌چنین درخت‌های فیلوژنی حاصل از روش‌های حداکثر احتمال و حداکثر پارسیمونی، گونه *A. idignensis* را از دیگر گونه‌ها مجزا کرد و دو گونه *A. eichwaldii* و *A. petrubanarescui* قرابت بیش‌تری با یکدیگر داشتند.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، ماهی خیاطه، صفات ریخت‌سنجی، صفات شمارشی، سیتوکروم *b* میتوکندریایی.

مقدمه

مدت‌ها، مجموعه جمعیت‌هایی که در شمال اروپا و آسیا، از رشته کوه‌های شرقی آلپ تا حوضه دریای سیاه، خزر و آرال یافت می‌شوند را به‌عنوان *Alburnoides bipunctatus* در نظر می‌گرفتند (Coad, 2016; Bogutskaya & Coad, 2009). به‌تازگی با استفاده از یکسری ویژگی‌های ریخت‌سنجی و شمارشی، Coad & Bogutskaya (2009) جنس *Alburnoides* را به چندین گونه جدید تقسیم کردند که از بین آن‌ها، شش گونه *A. petrubanarescui* از حوضه دریاچه ارومیه، *A. namaki* از حوضه دریاچه نمک، *A. nicolausi* و *A. idignensis* از حوضه رودخانه کرخه، *A. eichwaldii* از حوضه دریای خزر و گونه *A. qanati* از قناتی در حوضه رودخانه کر، در ایران گزارش شد (Keivany et al., 2016). متعاقب آن، Seifali et al. (2012) به بررسی تفاوت ژنوم میتوکندری ماهی جنس *Alburnoides* در جنوب حوضه دریای خزر با استفاده از ۷۷۴ جفت باز ژن سیتوکروم *b* پرداختند. درخت ژن میتوکندری وجود شاخه غربی به‌عنوان *A. eichwaldii*، جمعیت رودخانه تالار و جمعیت شرقی به‌ترتیب به‌عنوان *Alburnoides sp.* را نشان داد. سپس گونه‌های دیگری از این جنس مانند *A. holciki* (Coad & Bogutskaya, 2012) از حوضه هریرود، *A. tabarestanensis* (Mousavi-Sabet et al., 2015)، *A. coadi* (Mousavi-Sabet et al., 2015)، *A. parhami* (Mousavi-Sabet et al., 2015) و از *A. samii* (Mousavi-Sabet et al., 2015) و از

مرکز و شرق حوضه خزر و *A. Damghani* (Roudbar et al., 2016) از حوضه کویر معرفی شدند (Esmaili et al., 2017).

تعدادی مطالعات زیستی، ریختی و ملکولی در مورد ماهیان جنس *Alburnoides* در ایران و جهان انجام شده است (Siroyova, 2004; Dadikyan, 1973; Zivkovic & Jovanovic, 2011; Bogutskaya et al., 2010; Haghigly et al., 2013, 2014, 2015; Mohammadi-Sarpiri et al., 2021a,b). ماهی‌های جنس *Alburnoides* براساس ویژگی‌ها یا صفات ریخت‌شناسی و تشریحی مورد مطالعه قرار گرفته است، اما در رابطه با شناسایی جمعیت‌های این گونه و تفاوت‌های جمعیتی و گونه‌ای آن در حوضه‌های مختلف کمتر مطالعه‌ای صورت گرفته است. با توجه به پراکنش این جنس در ایران و اهمیت آن به‌عنوان ماهی بومی و حفظ ذخایر ژنتیکی آن، انجام تحقیق و بررسی بیشتر ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش بررسی و مقایسه مورفولوژی و مولکولی شش گونه توصیف‌شده از ایران توسط Bogutskaya & Coad (2009) بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش نمونه‌برداری از گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از تور پره ریز چشمه صورت گرفت (جدول ۱). سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶ درصد تثبیت شدند و به موزه ماهی‌شناسی و آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شدند.

جدول ۱. مشخصات حوضه‌های نمونه‌برداری گونه‌های مورد مطالعه.

تعداد نمونه	مختصات جغرافیایی	مشخصات	استان	نام حوضه	گونه	
۳۰	۴۸°۴۳'E	۳۳°۴۷'N	رودخانه سراب شور	لرستان	کارون	<i>A. nicolausi</i>
۲۳	۴۸°۲۲'E	۳۳°۲۲'N	رودخانه دز	خوزستان	کارون	<i>A. idignensis</i>
۲۳	۵۴°۰۵'E	۳۶°۱۶'N	چشمه علی	سمنان	کویر	<i>A. namaki</i>
۳۰	۴۷°۰۲'E	۳۸°۲۷'N	رودخانه اهرچای	آذربایجان شرقی	خزر	<i>A. eichwaldii</i>
۹	۴۴°۳۷'E	۳۷°۴۳'N	رودخانه نازلوچای	آذربایجان غربی	ارومیه	<i>A. petrubanarescui</i>
۳۰	۵۲°۰۲'E	۳۰°۳۷'N	رودخانه تنگه بوراق	فارس	کر	<i>A. qanati</i>

صفات اندازه‌شناسی و شمارشی

تعداد ۲۲ صفت اندازه‌شناسی معمول در ریخت‌شناسی ماهی‌ها و نه صفت نسبی بر روی تمامی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. تعداد فلس‌های موجود در روی خط جانبی و بالا و پایین آن و همچنین تعداد شعاع‌های نرم و سخت باله‌ها به وسیله لوپ با بزرگنمایی $10\times$ شمارش شدند (Coad & Bogutskaya, 2012).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای

یکی از روش‌های بسیار مهم برای دسته‌بندی، استفاده از الگوریتم‌های آماری چند متغیره است که از میان آن‌ها می‌توان به تجزیه به مؤلفه‌های اصلی اشاره کرد. در این تکنیک، کاهش داده‌ها از طریق تغییر خطی متغیرهای اولیه و تبدیل آن‌ها به یک مجموعه جدید از مؤلفه‌های غیرهمبسته به نام مؤلفه‌های اصلی انجام می‌شود. سپس مؤلفه‌ها به ترتیب نزولی مرتب می‌شوند. از این رو چند مؤلفه نخستین، بزرگ‌ترین درصد کل اختلافی که بین واحدهای نمونه‌گیری وجود دارد را نمایان خواهند کرد. در این روش کل تنوع مشاهده‌شده در داده‌های اصلی به اجزایی جمع‌پذیر شکسته می‌شوند. اگر نسبت کمی (کم‌تر از ۲۵ درصد) از تنوع کل توسط مؤلفه اول، دوم و سوم تعریف شود، فاصله بین افراد اغلب نامعتبر بوده و از دیدگاه آماری برای روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و نمایش گرافیکی، مناسب نیست. اما، در چنین شرایطی تجزیه خوشه‌ای برای تعیین روابط شجره‌ای معتبر به نظر می‌رسد. زمانی که سه مؤلفه اصلی بیش از ۲۵ درصد از کل تنوع داده‌های اولیه را توجیه کنند، در این حالت نمایش گرافیکی آن‌ها با تجزیه خوشه‌ای مطابقت بیشتری دارد. تجزیه خوشه‌ای مشاهدات را براساس شباهت میان یک یا چندین متغیر دسته‌بندی می‌کند. در تجزیه خوشه‌ای، با در دست داشتن نمونه‌ای از n فرد و اندازه‌گیری p متغیر یا صفت به روی هر فرد، می‌توان افراد را براساس آن صفات در کلاس‌هایی گروه‌بندی نمود (Moghaddam *et al.*,

1994). بنابراین افراد با خصوصیات مشابه از لحاظ ریاضی در گروه‌های یکسان قرار می‌گیرند. در گروه‌بندی نهایی شباهت افراد داخل گروه‌ها به مراتب بیش از تشابه بین گروه‌ها است، به طوری که بیش‌ترین شباهت داخل گروه‌ها و بیش‌ترین تفاوت بین گروه‌ها است. از مهم‌ترین روش‌های خوشه‌بندی، می‌توان به روش‌های سلسله‌مراتبی اشاره کرد. در این روش با محاسبه فاصله هر فرد از سایر افراد، گروه‌بندی به دو صورت تراکمی و مجاورتی انجام می‌گیرد. در روش تراکمی هر فرد در ابتدا یک گروه مجزا را تشکیل می‌دهد، سپس گروه‌های نزدیک به هم ترکیب شده و در نهایت کلیه افراد مشابه در یک گروه واقع می‌شوند. در پژوهش حاضر با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش سلسله‌مراتبی تراکمی و با شیوه درون گروهی، نمونه‌های بررسی‌شده براساس صفات اندازه‌گیری‌شده گروه‌بندی شدند.

بررسی‌های ملکولی و فیلوژنی

جهت استخراج DNA، سه نمونه از هر گونه که قبلاً خصوصیات شمارشی و اندازه‌شناسی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفته بود، از کیت استخراج BioBasic Canada Inc مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. دستگاه UV ترانس لومیناتور (مدل TCP-20.MC ساخت شرکت ویلبرلورمنت فرانسه) و رتکس (مدل لب‌دنسر ساخت شرکت آی.کی.ا.) آلمان). کیفیت DNA استخراج‌شده براساس روش الکتروفورز ۱ درصد و میزان فلورسانس ترکیب اتیدیوم بروماید جذب شده به وسیله دی.ان.ا بر روی دستگاه ترانس لومیناتور بررسی شد. مواد مورد استفاده عبارتند از بافر TAE با غلظت $10\times$ ، پودر آگارز (ساخت شرکت اینوبیروژن)، بافر سنگین‌کننده، اتیدیوم بروماید ۱ درصد آب مقطر تزریقی. جفت آغازگر اختصاصی به منظور تکثیر سیتوکروم b مورد استفاده قرار گرفت. جهت تکثیر ژن با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی H15149- Thr و L14736-Glu سفارش

می‌شود. در برنامه MEGA از الگوریتم که در آن درخت فیلوژنی به روش حداکثر پارسیمونی با استفاده از روش انشعاب ایجاد می‌شود، استفاده می‌کند (Nei & Kumar, 2000). این روش نوع ساده‌شده از روش حداقل تکامل است. در این روش یک توپولوژی که نشان‌دهنده کوچک‌ترین ارزش در مجموع انشعابات است و به‌عنوان تخمینی از درخت مناسب انتخاب می‌شود (Nei & Kumar, 2000). در این روش نرخ ثابت تکامل در نظر گرفته نمی‌شود و در نتیجه درخت ایجادشده با استفاده از این روش بدون ریشه است، اما با انتخاب گونه‌هایی از جنس *Alburnus* (*A. hohenackeri* و *A. arborella*, *A. escherichii*) به‌عنوان برون‌گروه می‌توان درخت را ریشه‌دار کرد. درصد تکرار درخت‌ها که در آن آرایه‌های شرکت‌کننده با هم در آزمون بوت‌استرپ خوشه‌بندی می‌شوند، در کنار هر انشعاب نوشته می‌شود. در این روش فواصل تکاملی با استفاده از روش حداکثر احتمال محاسبه و واحدهایی از تعداد جایگزینی پایه در هر محل است (Nei & Kumar, 2000).

تحلیل آماری

در این مطالعه کلیه محاسبات آماری مربوط به صفات اندازه‌گیری و شمارشی در دو نرم‌افزار SPSS 18 و Excel 2007 انجام شد. داده‌های آماری به‌دست‌آمده براساس گونه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 دسته‌بندی شده و کلیه داده‌ها در این نرم‌افزار به نسبت‌های صفات اندازه‌گیری شده تبدیل شدند. سپس داده‌های حاصله جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری به نرم‌افزار SPSS 18 انتقال داده شدند. از آزمون کالگومروف- اسمیرنوف به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه واریانس از آزمون چند دامنه دانکن در سطح 0.05 ($P < 0.05$) جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها استفاده

شرکت امین‌سان و ساخت شرکت Biobasic Canada که توالی نوکلئوتیدی آن‌ها به‌ترتیب $5' \text{AACCACCGTTGTTATTCAACTA} 3'$ و $5' \text{CCGGTSTTCGGMTTACAAGACCG} 3'$ بود، انجام شد. برای بهینه‌کردن شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی (۵۶-۵۳ درجه سانتی‌گراد) بهترین دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو به‌دست آمد و در مرحله بعد جهت وضوح مناسب باند، مقدار دی.ان.ا. میتوکندریایی، آغازگرها در واکنش بهینه‌سازی شد.

پس از اتمام کار جهت اطمینان از تکثیر توالی مورد نظر، مقدار ۳ میکرولیتر از محصول پی.سی.آر و ۲ میکرولیتر بافر سنگین‌کننده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و با استفاده از نشانگر برای اطمینان از طول تکثیرشده موردبررسی قرار گرفت (ضمیمه‌های ۱ و ۲). محصول پی.سی.آر جهت توالی‌یابی ژن مورد نظر توسط شرکت تکاپوزیست به کشور کره جنوبی ارسال شد.

برای فیلوژنی اگر m تعداد توالی موجود باشد و هر توالی n نوکلئوتید تشکیل شده باشد از هر توالی n نوکلئوتید با جایگزینی به‌طور تصادفی انتخاب می‌شود. از توالی‌های ایجادشده از این نمونه‌گیری درخت فیلوژنی با استفاده از روش موردنظر ترسیم می‌شود. سپس توپولوژی ایجادشده با توپولوژی حاصل از m توالی اصلی مقایسه می‌شود. هرکدام از انشعابات داخلی درخت اصلی که با درخت ایجادشده به روش بوت‌استرپ تفاوت دارد، امتیاز صفر می‌گیرد و بقیه انشعابات داخلی امتیاز یک می‌گیرند. این کار چندین مرتبه تکرار می‌شود و درصد زمان‌هایی که هر انشعاب داخلی ۹۵ درصد یا بیشتر باشد، توپولوژی صحیح در هر انشعاب است (Nei & Kumar, 2000).

در این روش برای یک توپولوژی مجموع حداقل جایگزینی‌های ممکن در همه مکان‌ها به‌عنوان طول درخت شناخته می‌شود و توپولوژی با کم‌ترین طول درخت به‌عنوان درخت حداکثر پارسیمونی شناخته

مهم‌ترین صفات در مؤلفه سوم ارتفاع باله مخرجی به طول استاندارد است. مهم‌ترین صفات در مؤلفه چهارم و پنجم به ترتیب طول سر به ارتفاع بدن و ارتفاع باله پشتی به طول استاندارد است. پس از محاسبه امتیاز فاکتورهای هر متغیر، موارد مربوط به فاکتورهای اول و دوم که بیش‌ترین تغییرات را نشان می‌دهند در مقابل هم پلات شدند که درصد واریانس برای مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۲۹/۰۵ و ۱۹/۸ درصد است. از آنجایی که مقادیر ویژه برای دو مؤلفه اول بیش‌تر از ۱ است و همچنین ۴۵/۸۵ درصد از کل اختلافات توسط این دو مؤلفه توجیه‌پذیر است، بنابراین ادامه تحلیل براساس دو مؤلفه اول و دوم انجام می‌شود (ضمیمه ۸). موقعیت هر یک از گونه‌ها براساس مؤلفه‌های اول و دوم نشان داده شده است (شکل ۱). گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول و گونه‌های *A. petrubanarescui* و *A. idignensis* براساس مؤلفه دوم از همدیگر مجزا می‌شوند. نیز براساس برهم‌کنش دو صفت فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه به طول استاندارد و قطر حدقه چشم به طول سر که بیش‌ترین تأثیر را بر روی دو مؤلفه اول و دوم داشته‌اند، رسم شده است (شکل ۲). هم‌پوشانی بالایی را در بین گونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که براساس این دو صفت، گونه *A. idignensis* را تقریباً از سایر گونه‌ها تفکیک می‌کند که نسبت قطر حدقه چشم به طول سر آن در مقایسه با گونه‌های دیگر بزرگ‌تر است.

به‌منظور گروه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه براساس میانگین ۲۲ مشخصه اندازه‌گیری نسبی از تجزیه خوشه‌ای به روش سلسله مراتبی استفاده شد (شکل ۲). دندوگرام مربوطه با شیوه درون‌گروهی و براساس فاصله مربع اقلیدسی رسم شد. به دلیل زیادبودن داده‌ها میانگین هر صفت برای گونه‌های جداگانه محاسبه و از آن نمودار خوشه‌ای رسم شد. نتایج حاصل دو خوشه مجزا را نشان دادند که در یک خوشه گونه *A. idignensis* جای گرفته است و با فاصله بیش‌تری نسبت به

شد. برای تعیین میزان شباهت گونه‌ها، براساس صفات شمارشی و نسبت‌های اندازه‌گیری از روش تحلیل عاملی (PCA) استفاده شد. آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه صفات اندازه‌گیری و شمارشی نمونه‌های جمع‌آوری شده با یکدیگر، استفاده شد. نمونه‌های توالی‌یابی شده جهت بررسی میزان اختلاف نوکلئوتیدی و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مورد بررسی از نرم‌افزارهای MEGA5، DNAMAN و Chromas 2.3 استفاده شد و درخت‌های فیلوژنی مربوط به گونه‌های مورد مطالعه رسم شد.

نتایج

صفات اندازه‌گیری

میانگین، انحراف معیار و دامنه ۲۲ صفت نسبی اندازه‌گیری (ضمیمه ۵) آمده است. آنالیز واریانس در رابطه با کلیه نسبت‌های اندازه‌گیری شده به جز در صفات طول کل به طول استاندارد، طول چنگالی به طول استاندارد و ارتفاع باله پشتی به طول استاندارد اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) در بین این شش گونه نشان داد. نتیجه آنالیز این صفات نسبی اندازه‌گیری به مؤلفه‌های اصلی نشان داده شده است (ضمیمه ۶).

نتایج آزمون $KMO = 0.786$ تناسب داده‌ها را برای تحلیل عاملی تأیید کردند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، این صفات به پنج مؤلفه اصلی تقسیم شده‌اند که جمعاً حدود ۶۹/۱۳ درصد تغییرات واریانس را توضیح می‌دهند همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است مهم‌ترین صفات، صفاتی هستند که دارای بیش‌ترین ضریب همبستگی می‌باشند؛ در مؤلفه اول شامل فاصله باله پشتی تا نوک پوزه به طول استاندارد، ارتفاع ساقه دم به طول استاندارد، فاصله باله شکمی تا نوک پوزه به طول استاندارد، فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه به طول استاندارد، ارتفاع بدن به طول استاندارد است. مهم‌ترین صفات در مؤلفه دوم شامل طول کل به طول استاندارد، قطر حدقه چشم به طول سر، طول قاعده باله مخرجی به طول استاندارد است.

گونه‌های دیگر قرار دارد و خوشه دیگر شامل بقیه گونه‌ها است که در این خوشه نیز دو گونه *A. namaki* و *A. nicolausi* و هم‌چنین دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* در دو خوشه مجزا دیگر قرار گرفته‌اند. بنابراین می‌توان گفت دو گونه *A. namaki* و *A. nicolausi* و هم‌چنین دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* از لحاظ صفات نسبی اندازه‌ی قرابت و خویشاوندی بیش‌تری با همدیگر دارند.

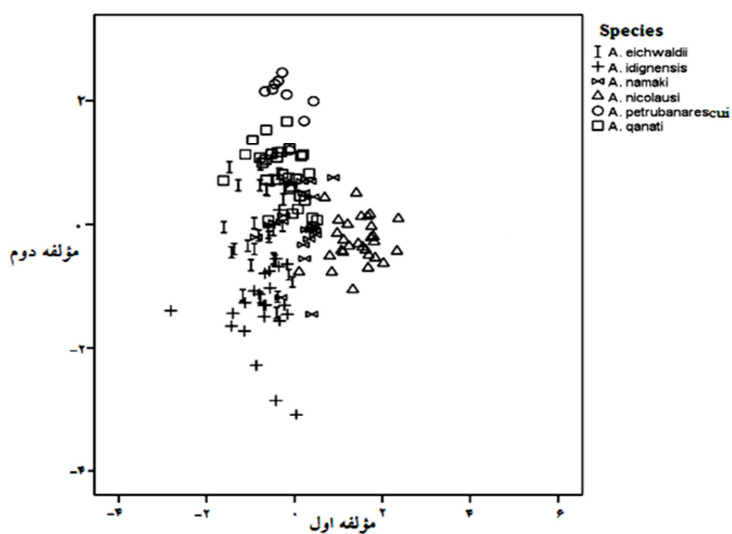
جدول ۲. نتایج آنالیز صفات اندازه‌ی به عامل‌های اصلی و واریانس آن‌ها

مؤلفه	مقادیر اولیه			مجموع مربع بارها			مجموع چرخنده مربع بارها		
	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)
۱	۶/۳۹	۶/۳۹	۲۹/۰۵	۶/۳۹	۶/۳۹	۲۹/۰۵	۴/۵۱	۲۰/۵۱	۲۰/۵۱
۲	۳/۷	۱۶/۸	۴۵/۸۵	۳/۷	۱۶/۸	۴۵/۸۵	۴/۳	۱۹/۵۶	۴۰/۰۹
۳	۲/۷	۱۲/۲۲	۵۸/۰۸	۲/۷	۱۲/۲۲	۵۸/۰۸	۲/۳۴	۱۰/۶۵	۵۰/۷۴
۴	۱/۳۷	۶/۲۵	۶۴/۳۲	۱/۳۷	۶/۲۵	۶۴/۳۲	۲/۲۶	۱۰/۳	۶۱/۰۳
۵	۱/۰۶	۴/۸۱	۶۹/۱۳	۱/۰۶	۴/۸۱	۶۹/۱۳	۱/۷۸	۸/۱	۶۹/۱۳

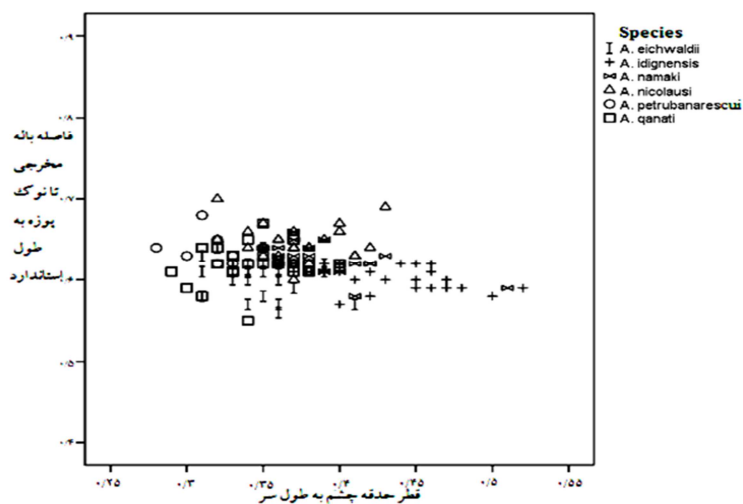
جدول ۳. همبستگی میان صفات اندازه‌ی و پنج مؤلفه به‌دست‌آمده در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

مؤلفه‌ها	نسبت‌های اندازه‌ی				
	مؤلفه ۱	مؤلفه ۲	مؤلفه ۳	مؤلفه ۴	مؤلفه ۵
۱ طول کل / طول استاندارد	۰/۳۷	۰/۶۱*	۰/۳۲	۰/۰۶	-۰/۳۳
۲ طول چنگالی / طول استاندارد	۰/۵۶	۰/۴۸	۰/۲۵	۰/۰۵	-۰/۳
۳ فاصله باله پشتی تا نوک پوزه / طول استاندارد	۰/۷۲*	۰/۴	-۰/۱۵	۰/۰۵۸	-۰/۲
۴ فاصله بین انتهای باله پشتی تا انتهای بدن / طول استاندارد	۰/۴۸	۰/۱۷	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۳۱
۵ طول ساقه دم / طول استاندارد	۰/۵۸	-۰/۲	۰/۱۸	۰/۳۵	-۰/۲۵
۶ ارتفاع ساقه دم / طول استاندارد	۰/۸*	-۰/۳۶	-۰/۲۱	۰/۰۲	۰/۱۳
۷ طول سر / طول استاندارد	۰/۵۶	۰/۳۳	-۰/۵۴	۰/۲۸	۰/۲۱
۸ عرض سر / طول سر	۰/۵۷	-۰/۰۵	-۰/۱۱	-۰/۶۱	۰/۲۳
۹ طول پوزه / طول سر	۰/۴۳	-۰/۵۴	۰/۲۲	-۰/۰۱	۰/۰۶
۱۰ قطر حذقه چشم / طول سر	-۰/۱۴	۰/۷۳*	۰/۰۳	-۰/۱۸	-۰/۱۲
۱۱ طول قاعده باله پشتی / طول استاندارد	۰/۴	-۰/۰۳	۰/۵۱	-۰/۲۶	۰/۱۹
۱۲ طول قاعده باله سینه‌ای / طول استاندارد	۰/۲۳	-۰/۲	۰/۵۵	-۰/۰۲	-۰/۱۳
۱۳ طول قاعده باله شکمی / طول استاندارد	۰/۴۱	-۰/۴۵	۰/۴	۰/۰۷	-۰/۲۲
۱۴ طول قاعده باله مخرجی / طول استاندارد	-۰/۱۲	۰/۶۴*	۰/۳۱	-۰/۱۶	۰/۳۵
۱۵ ارتفاع باله پشتی / طول استاندارد	-۰/۴۱	۰/۲۶	۰/۴۵	۰/۱۱	۰/۴۳*
۱۶ ارتفاع باله مخرجی / طول استاندارد	-۰/۰۸	۰/۱۹	۰/۷۸*	۰/۱۵	۰/۰۸
۱۷ عرض واقع در بین دو حفره چشم / طول سر	۰/۶۳	-۰/۵۷	۰/۰۱	-۰/۰۴	-۰/۰۳
۱۸ فاصله باله شکمی تا نوک پوزه / طول استاندارد	۰/۷۹*	۰/۲۸	-۰/۱۵	-۰/۰۴	-۰/۰۷
۱۹ فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه / طول استاندارد	۰/۸۷*	۰/۲۶	-۰/۱۱	۰/۱۱	-۰/۰۱
۲۰ ارتفاع بدن / طول استاندارد	۰/۶۹*	۰/۳۴	-۰/۴۹	-۰/۰۱	۰/۰۸
۲۱ طول سر / ارتفاع بدن	-۰/۳۶	-۰/۰۱	-۰/۰۸	۰/۷۲*	۰/۲۴
۲۲ ارتفاع ساقه دم / ارتفاع بدن	۰/۵۸	-۰/۶۴	-۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۱

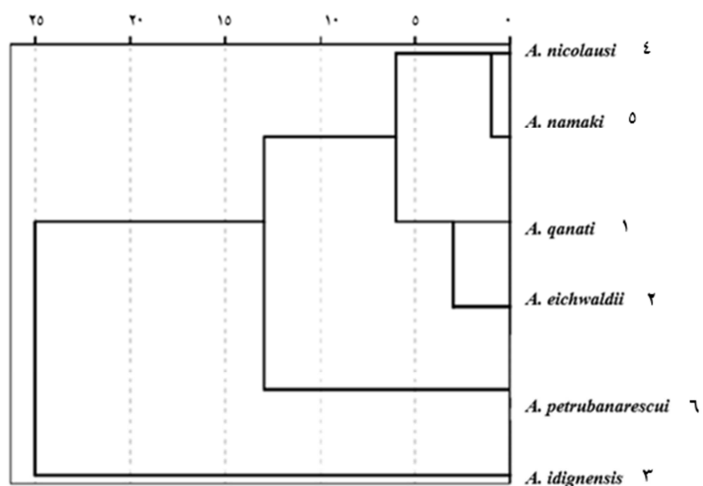
* بیش‌ترین همبستگی بین هر صفت اندازه‌ی نسبی و مؤلفه.



شکل ۱. موقعیت هر یک از گونه‌های جنس *Alburnoides* براساس صفات نسبی اندازه‌شی و با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی



شکل ۲. موقعیت گونه‌های جنس *Alburnoides* در نمودار برهم‌کنش دو صفت نسبی قطر حدقه چشم به طول سر و فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه به طول استاندارد



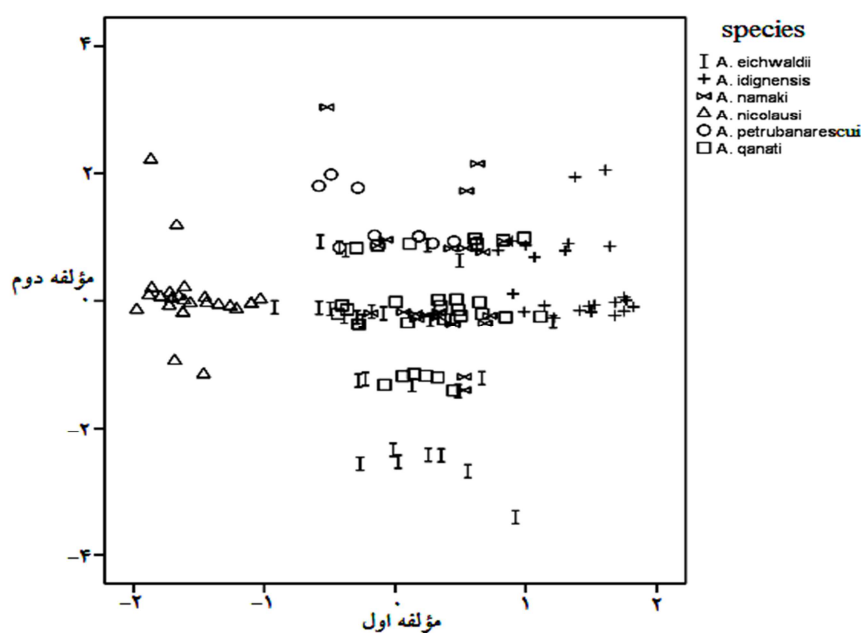
شکل ۳. دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جهت گروه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه براساس ۲۲ صفت نسبی اندازه‌شی

صفات شمارشی

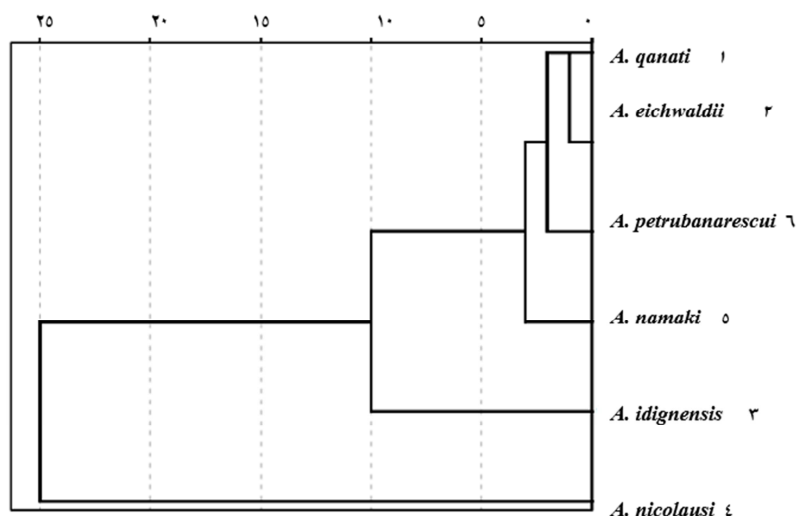
میانگین، انحراف معیار و دامنه برای نه صفت شمارشی در ضمیمه (۹) ارائه شده است. مقایسه واریانس‌ها با آزمون چند دامنه دانکن در رابطه با تمامی صفات اختلاف آماری معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$)، اما در دو صفت تعداد شعاع‌های غیرمنشعب باله پشتی و مخرجی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P > 0.05$).

در تحلیل صورت گرفته، مؤلفه‌ها به ترتیب نزولی بر طبق مقادیر ویژه مرتب شده‌اند که نتیجه آنالیز صفات شمارشی به مؤلفه‌های اصلی در ضمیمه (۹) نشان داده شده است. نتایج آزمون $KMO = 0.702$ که بیان‌کننده مناسب بودن روش تجزیه به عامل‌ها و همبستگی شدید متغیرهای اولیه است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، این صفات به سه مؤلفه اصلی تقسیم شده است که جمعاً حدود $71/78$ درصد تغییرات واریانس را توضیح می‌دهند همان‌طور که در ضمیمه ۱۰ نشان داده شده است، مهم‌ترین صفات در مؤلفه اول شامل تعداد فلس‌های روی خط جانبی و فلس‌های بالا و پایین خط جانبی و شعاع‌های منشعب باله مخرجی است و مهم‌ترین صفات در مؤلفه دوم

شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای و در مؤلفه سوم شعاع‌های منشعب باله پشتی و شکمی است. پس از محاسبه امتیاز فاکتورهای هر متغیر، موارد مربوط به فاکتورهای اول و دوم که بیش‌ترین تغییرات را نشان می‌دهند در مقابل هم پلات شدند که درصد واریانس برای مؤلفه‌ی اول و دوم به ترتیب $38/02$ و $18/8$ درصد است. از آنجایی که مقادیر ویژه برای دو مؤلفه اول بیش‌تر از ۱ است و $56/82$ درصد از کل اختلافات توسط این دو مؤلفه توجیه‌پذیر است، بنابراین ادامه تحلیل براساس دو مؤلفه اول و دوم انجام می‌شود (ضمیمه ۸). در شکل ۴ موقعیت هر یک از گونه‌ها براساس مؤلفه‌های اول و دوم نشان داده شده است. در صفات شمارشی نیز هم‌پوشانی زیادی دیده می‌شود ولی نسبت به صفات ریخت‌شناسی هم‌پوشانی آن‌ها کم‌تر است. گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول از همدیگر مجزا می‌شوند و گونه‌ها *A. eichwaldii* براساس مؤلفه دوم از سایر گونه‌ها مجزا می‌شود. بر این اساس می‌توان بیان نمود که صفات ریخت‌سنجی برای تعیین جدایی گونه‌ها مناسب نبوده ولی با استفاده از تفاوت‌های صفات شمارشی تا حدودی می‌توان گونه‌ها را از یکدیگر متمایز کرد.



شکل ۴. موقعیت هر یک از گونه‌های جنس *Alburnoides* براساس صفات شمارشی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی



شکل ۵. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جهت گروه ندی گونه‌های مورد مطالعه براساس نه صفت شمارشی

صفت قبل اندک است. درصد فراوانی هر یک از گونه‌ها برای صفات، تعداد فلس‌های روی خط جانبی و بالا و پایین آورده شده است (جدول‌های ۴ و ۵ و ضمیمه ۱۱).

تعداد و درصد فراوانی شعاع باله‌ها

تعداد شعاع‌های سخت باله پشتی در هر شش گونه سه عدد بود و اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده نشد. مقایسه واریانس‌ها با آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری بین گونه *A. petrubanarescui* با ۵ گونه دیگر در تعداد شعاع‌های منشعب باله پشتی نشان داد ($P < 0.05$)، اما در تعداد شعاع‌های منشعب باله پشتی پنج گونه دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) که براساس تعداد شعاع‌های منشعب باله پشتی گونه *A. petrubanarescui* را از دیگر گونه‌ها جدا کرد، اما به دلیل کمبود تعداد نمونه‌های این گونه نسبت به دیگر گونه‌ها در این مطالعه نیاز به بررسی دقیق‌تر و جامع‌تری دارد (ضمیمه ۱۲).

تعداد شعاع‌های غیرمنشعب باله مخرجی مشابه تعداد باله پشتی در شش گونه سه عدد بود که اختلاف معنی‌داری بین گونه‌های مورد مطالعه در این صفت مشاهده نشد، اما مقایسه واریانس‌ها با آزمون چنددامنه دانکن اختلاف معنی‌داری بین گونه‌های *A. nicolausi* ($P < 0.05$)

جهت گروه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه براساس صفات شمارشی از تجزیه خوشه‌ای به روش سلسله مراتبی استفاده شد (شکل ۵). دندروگرامی با شیوه درون گروهی و براساس فاصله مربع اقلیدسی رسم گردید. به دلیل زیادبودن داده‌ها میانگین هر صفت برای گونه‌های مختلف جداگانه محاسبه و از آن نمودار خوشه‌ای رسم گردید. نتایج حاصل دو خوشه مجزا را نشان دادند که در یک خوشه *A. nicolausi* جای گرفته است که با فاصله بیش‌تری نسبت به دیگر گونه‌ها قرار دارد و دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* در دو خوشه مجزا و نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.

تعداد و درصد فراوانی فلس‌های خط جانبی

مقایسه واریانس‌ها با آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد فلس‌های روی خط جانبی بین گونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که گونه *A. nicolausi* دارای بیش‌ترین اختلاف در این صفت از گونه‌های دیگر است. در تعداد فلس‌های بالای خط جانبی بیش‌ترین اختلاف بین گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* است. در تعداد فلس‌های پایین خط جانبی اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده می‌شود، ولی این معنی‌داری نسبت به دو

اندازشی و نه صفت شمارشی مورد مقایسه قرار گرفت که در ۱۸ صفت نسبی اندازشی و هفت صفت شمارشی اختلاف معنی‌داری در بین گونه‌ها مشاهده شد.

مطالعات ملکولی و فیلوژنی

به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های موجود، ۲ میکرولیتر از دی.ان.ا. رقیق شده را با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز مشاهده شد. کیفیت دی.ان.ا. استخراج شده از نمونه‌ها نشان داده شده است و وضوح باندهای به دست آمده نشان دهنده کیفیت بالا و قابل قبول دی.ان.ا. استخراج شده بود.

A. namaki و *A. idignensis* با سه گونه دیگر در تعداد شعاع‌های منشعب باله مخرجی نشان داد (ضمیمه ۱۳).

در تعداد شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای و شکمی آنالیز واریانس مقایسه واریانس‌ها با آزمون چند دامنه دانکن ($P < 0.05$) بین تمامی گونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر نشان می‌دهد (جدول ۶). نمودار خوشه‌ای مربوط به صفت تعداد شعاع‌های منشعب باله مخرجی برای گونه‌های جنس *Alburnoides* آورده شده است (شکل ۶).

در این مطالعه تفاوت بین شش گونه جنس *Alburnoides* از طریق سنجش ۲۲ صفت نسبی

جدول ۴. درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله پشتی گونه‌های مورد مطالعه

درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله پشتی					
گونه	۶	۷	۸	۹	
<i>A. qanati</i>	-	۶۰	۴۰	-	۱
<i>A. eichwaldii</i>	۲۴	۲۸	۲۸	-	۲
<i>A. idignensis</i>	-	۸۳	۱۷	-	۳
<i>A. nicolausi</i>	۳	۹۰	۷	-	۴
<i>A. namaki</i>	-	۶۰	۳۰	۱۰	۵
<i>A. petrubanarescui</i>	-	-	۱۰۰	-	۶

جدول ۵. درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله مخرجی گونه‌های مورد مطالعه

درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله مخرجی									
گونه	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
<i>A. qanati</i>	۴	۲۰	۳۰	۲۳	۱۳	-	-	-	-
<i>A. eichwaldii</i>	-	۱۰	۱۰	۶۳	۱۷	-	-	-	-
<i>A. idignensis</i>	-	-	-	-	۴	۵	۵۶	۲۲	۱۳
<i>A. nicolausi</i>	۷	۶۰	۳۰	۳	-	-	-	-	-
<i>A. namaki</i>	-	-	-	۴۸	۳۹	۹	۴	-	-
<i>A. petrubanarescui</i>	۱۱	۴۵	۴۴	-	-	-	-	-	-

جدول ۶. دامنه، میانگین و انحراف معیار تعداد صفات شمارشی گونه‌های مورد مطالعه

نام گونه‌ها												صفات شمارشی مورد مطالعه
<i>A. qanat</i>		<i>A. petrubanarescui</i>		<i>A. nicolausi</i>		<i>A. namaki</i>		<i>A. idignensis</i>		<i>A. eichwaldii</i>		
کد تحقیق	کد	کد تحقیق	کد	کد تحقیق	کد	کد تحقیق	کد	کد تحقیق	کد	کد تحقیق	کد	
۴۸-۵۶	۴۱-۴۹	۴۷-۵۲	۴۳-۵۰	۴۲-۴۵	۴۲-۵۰	۴۶-۵۳	۴۳-۵۲	۴۹-۵۶	۴۱-۴۶	۴۶-۵۶	۴۴-۵۶	فلس‌های روی خط جانبی
۱۰-۱۲	۹-۱۱	۱۱-۱۲	۹-۱۱	۹-۱۰	۸-۱۱	۱۰-۱۲	۹-۱۳	۱۱-۱۳	۸-۱۰	۱۰-۱۲	-	فلس‌های بالای خط جانبی
۴-۵	۴-۶	۵-۶	۴-۶	۳-۴	۳-۶	۴-۶	۴-۷	۴-۶	۴-۶	۴-۵	-	فلس‌های پایین خط جانبی
۷-۸	۷-۸	۸	۷-۸	۶-۸	۷-۸	۷-۹	۷-۹	۷-۸	۶-۸	۶-۸	۸-۹	شعاع‌های منشعب باله پشتی
۳	۳-۴	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	شعاع‌های غیر منشعب باله پشتی
۸-۱۲	۱۰-۱۲	۸-۱۰	۸-۱۰	۸-۱۱	۸-۱۱	۱۱-۱۴	۱۲-۱۴	۱۲-۱۶	۱۰-۱۲	۹-۱۲	۱۲-۱۳	شعاع‌های منشعب باله مخرجی
۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	شعاع‌های غیر منشعب باله مخرجی
۱۲-۱۳	۱۳-۱۵	۱۳-۱۴	۱۳-۱۵	۱۲-۱۳	۱۱-۱۴	۱۲-۱۴	۱۲-۱۵	۱۳-۱۴	۱۲-۱۵	۱۱-۱۳	-	شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای
۸-۹	۷	۷-۹	۶-۷	۷-۹	۶-۷	۶-۸	۶-۷	۷-۹	۶-۷	۷-۸	-	شعاع‌های منشعب باله شکمی

شد (جدول ۷ و ضمیمه ۱۴). قطعه ژن مورد بررسی در درصد تعداد نوکلئوتیدها اختلاف اندکی نشان داد بر این اساس باز تیمین بیشترین فراوانی (میانگین ۳۰/۲ درصد) و گوانین کمترین فراوانی (میانگین ۱۵/۲ درصد) را در قطعه مورد بررسی داشتند. در تعداد اختلافات تک نوکلئوتیدی بین ژنوتیپها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد که گونه *A. idignensis* با بیشترین میزان اختلاف (میانگین ۵۷ درصد) از دیگر گونه‌ها مجزا شد و دو گونه *A. petrubanarescui* و *A. eichwaldii* با چهار نوکلئوتید کمترین میزان اختلاف را داشتند، در نتیجه بیشترین درصد شباهت را نسبت به دیگر گونه‌ها با یکدیگر داشتند (جدول ۸ و ضمیمه ۱۵). میزان تفاوت و شباهت بین گونه‌های مورد مطالعه توسط هر دو نرم‌افزار مذکور محاسبه شد که نتایج مشابهی از آنالیز داده‌ها به دست آمد. بیشترین فاصله (۰/۱۸۳) بین گونه‌های *A. idignensis* و *A. eichwaldii* و کمترین فاصله (۰/۰۱) بین گونه‌های *A. eichwaldii* و *A. petrubanarescui* مشاهده شد.

تحلیل‌های فیلوژنتیک در برنامه MEGA5 با استفاده از روش‌های بیشترین احتمال (ML) و حداکثر پارسیمونی (MP) انجام شد. برای به دست آوردن میزان اطمینان شاخه‌های مختلف ارزش بوت‌استرپ (درصد اطمینان) با آنالیز ۱۰۰۰ بار تکرار محاسبه شد. از ۴۰۹bp ژن سیتوکروم *b* توالی‌یابی شده ۳۳۶bp مکان حفظ شده و ۷۳bp متغیر بودند.

تعداد شش نمونه از DNA گونه‌های مورد مطالعه با آغازگرهای اختصاصی ژن سیتوکروم *b* میتوکندریایی پی.سی.آر گردید. محصول پی.سی.آر تمامی نمونه‌ها بعد از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، تولید باندهایی در محدوده ۴۰۰ جفت باز (bp) نمودند. پس از اطمینان از بهینه بودن شرایط واکنش پی.سی.آر، واکنش پی.سی.آر برای تمامی نمونه‌ها انجام گرفت. محصول پی.سی.آر نمونه‌های مربوط به ۶ گونه مورد مطالعه (مجموعاً ۱۸ محصول پی.سی.آر) با آغازگر اختصاصی L14736-GLu جهت تعیین توالی توسط شرکت تکاپوزیست به کشور کره جنوبی ارسال شد.

توالی‌های به دست آمده پس از ویرایش و حذف گپ‌های کاذب در برنامه MEGA5 و DNAMAN مرتب (ویرایش) شدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ژنوم سیتوکروم *b* سه گونه *Alburnus* sp. (AY026390.1، GU479874.1 و AY026393.1) توالی‌یابی شده از بانک ژن به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شدند. توالی ژن یک نمونه از هر گونه در بانک ژن NCBI ثبت شد (*A. qanati* MT375033، *A. eichwaldii* MT375034، *A. nicolausi* MT375035، *A. namaki* MT375036، *A. petrubanarescui* MT375037 و *A. idignensis* MT375038) درصد تعداد نوکلئوتیدها و تعداد اختلاف تک‌نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ‌های قطعه ۴۰۹bp گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه‌ها محاسبه

جدول ۷. میزان تفاوت بین گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه (نرم‌افزار DNAMAN)

گونه‌ها	<i>A. idignensis</i>	<i>A. petrubanarescui</i>	<i>A. eichwaldii</i>	<i>A. namaki</i>	<i>A. nicolausi</i>	<i>A. qanati</i>	<i>Alburnus</i>
<i>A. idignensis</i>	۰						
<i>A. petrubanarescui</i>	۰/۱۴۴	۰					
<i>A. eichwaldii</i>	۰/۱۴۹	۰/۰۱	۰				
<i>A. namaki</i>	۰/۱۴۱	۰/۰۳۹	۰/۰۳۹	۰			
<i>A. nicolausi</i>	۰/۱۴۱	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴	۰/۰۱۹	۰		
<i>A. qanati</i>	۰/۱۳۷	۰/۰۲۹	۰/۰۳۴	۰/۰۳۱	۰/۰۳۶	۰	
<i>Alburnus</i>	۰/۱۲۲	۰/۱۴۹	۰/۱۵۳	۰/۱۵۶	۰/۱۵۸	۰/۱۵۳	۰

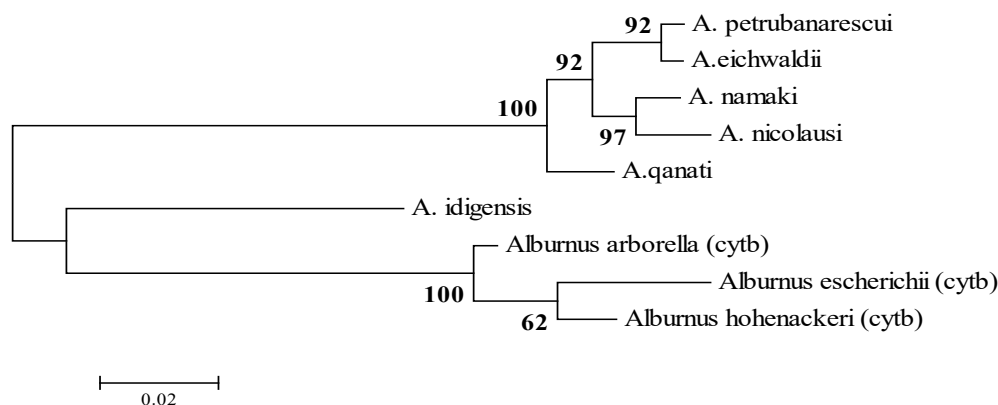
عمیق‌ترین شاخه و بیش‌ترین فاصله بین گونه‌های *A. idignensis* و *A. petrubanarescui* بود. گونه‌های *A. petrubanarescui* و *A. eichwaldii* و گونه‌های *A. namaki* و *A. nicolausi* نیز در خوشه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.

نتایج به‌دست‌آمده از داده‌های توالی‌یابی این قطعه از ژن سیتوکروم *b* برای بررسی روابط فیلوژنتیک گونه‌های مورد مطالعه جنس *Alburnoides* مفید بودند.

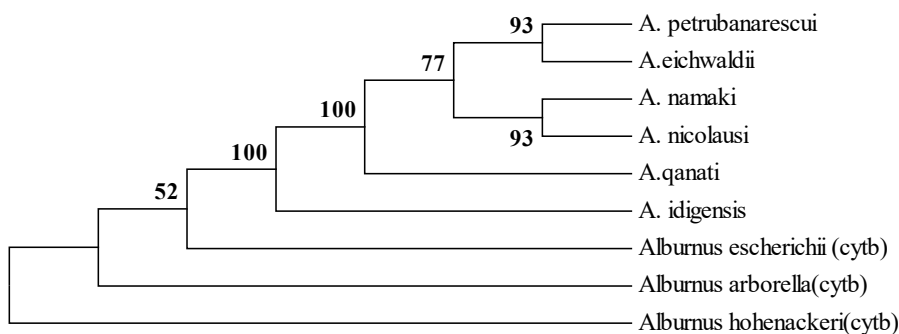
درخت‌های فیلوژنی که قادر به بیان فاصله‌های ژنتیکی بین شاخه‌ها است و مدل‌سازی فیلوژنی را امکان‌پذیر می‌کنند به روش‌های مختلف محاسبه شد. این درخت‌ها با مجموع طول انشعاب ۰/۱ و ارزش بوت‌استرپ در کنار هر انشعاب نشان داده شده است (شکل‌های ۷ و ۸). در تمامی روش‌ها نحوه قرارگیری گونه‌ها در این درخت‌های فیلوژنی مشابه هم است، اما درصد اطمینان برآوردشده با روش بوت‌استرپ در این درخت‌ها با یکدیگر متفاوت بود.

جدول ۸. فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه (نرم‌افزار MEGA5)

گونه‌ها	<i>A. idignensis</i>	<i>A. petrubanarescui</i>	<i>A. eichwaldii</i>	<i>A. namaki</i>	<i>A. nicolausi</i>	<i>A. qanati</i>	<i>Alburnus</i>
<i>A. idignensis</i>	۰						
<i>A. petrubanarescui</i>	۰/۱۷۶	۰					
<i>A. eichwaldii</i>	۰/۱۸۳	۰/۰۱	۰				
<i>A. namaki</i>	۰/۱۷۳	۰/۰۳۰	۰/۰۳	۰			
<i>A. nicolausi</i>	۰/۱۷۴	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶	۰/۰۲	۰		
<i>A. qanati</i>	۰/۱۶۵	۰/۰۳	۰/۰۳۶	۰/۰۳۳	۰/۰۳۸	۰	
<i>Alburnus</i>	۰/۱۴۴	۰/۱۸۴	۰/۱۹۱	۰/۱۹۵	۰/۱۹۹	۰/۱۹	۰



شکل ۷. درخت فیلوژنی رسم‌شده با روش ML برای گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه‌ها (اعداد ذکر شده میزان بوت‌استرپ است).



شکل ۸. درخت فیلوژنی رسم‌شده با روش MP برای گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه‌ها (اعداد ذکر شده میزان بوت‌استرپ است).

بحث و نتیجه گیری

در گذشته سنجش‌های ریخت‌سنجی به‌طور عمده محدود به ساختارهای بدنی مثل باله‌ها با قابلیت کم برای مشخص کردن شکل بدن بود. این اندازه‌گیری‌ها تمایل به تمرکز در طول محور بدن داشتند و بیش‌تر اندازه‌گیری‌ها در ناحیه سر انجام می‌شدند. درحالی‌که امروزه در مطالعات ریخت‌سنجی فواصل اندازه‌گیری‌شده تقریباً تمام سطوح بدن را دربرگرفته و شمای بهتری از شکل ظاهری ماهی را ارائه می‌دهند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌منظور کاهش حجم داده‌ها و تفسیر بهتر آن‌ها استفاده می‌شود. در تحلیل صورت گرفته، مؤلفه‌ها به‌ترتیب نزولی بر طبق مقادیر ویژه مرتب شده‌اند.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت دو گونه *A. eichwaldii* و *A. qanati* از لحاظ صفات شمارشی قرابت و خویشاوندی بیش‌تری نسبت به گونه‌های دیگر با هم دارند. تنوع صفات شمارشی به تفاوت‌های شرایط محیطی وابسته نبوده بلکه تحت تاثیر عوامل وراثتی و ژنتیکی تغییر می‌کنند که شواهدی هم‌چون پایین و نزدیک‌بودن انحراف معیار و میانگین در صفات شمارشی در این پژوهش می‌تواند تصدیق‌کننده این مطلب باشد (Wilson et al., 1985).

در مطالعات Coad (2021) به دلیل این که بیش‌ترین اختلاف در بین صفات شمارشی در صفت تعداد شعاع‌های منشعب باله مخرجی مشاهده شده بود در این مطالعه نیز بررسی شد. اطلاعات اندکی در منابع در مورد ویژگی‌های اندازه‌شی و شمارشی این گونه‌ها وجود دارد که نتایج مقایسه این مطالعه را با آن‌ها ناممکن می‌سازد، اما مقایسه صفات شمارشی گونه‌های مورد مطالعه با نتایج Coad (2021) آورده شده است (جدول‌های ۱۴ و ۱۵).

همان‌طور که مشاهده می‌شود گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش از نظر صفات شمارشی با نتایج Coad (2021) مطابقت دارد. در بررسی خصوصیات جمعیت ماهی *Alburnoides* در دو سرشاخه اصلی تالار

استان مازندران از ۳۰ صفت ریخت‌سنجی و ۱۰ صفت شمارشی در بین جمعیت دو سرشاخه کسپیلان و تجون، ۱۳ صفت ریخت‌سنجی و هفت صفت شمارشی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند ($P < 0.05$) (Ahmadi et al., 2011).

Ahmadi et al. (2011) بیان کردند که اختلاف در صفات ریخت‌سنجی ممکن است حاکی از تغییرپذیری این صفات در جمعیت ماهیان *Alburnoides* باشد که احتمالاً ناشی از تغییرات شرایط اکولوژیک (دما، کدورت، عمق آب و شدت جریان) آن‌ها بوده و امکان تشکیل جمعیت‌های جدید در این مناطق را دارد. زیرا دو سرشاخه کسپیلان و تجون علاوه بر فاصله زیاد از هم و عدم ارتباط آبی از نظر شرایط اکولوژیک نیز اختلافات زیادی با یکدیگر داشته‌اند. معنی‌دار بودن اختلاف در صفات شمارشی نیز می‌تواند بیانگر اختلاف نسبی ژنتیکی ماهیان دو سرشاخه بوده باشد. بر این اساس می‌توان بیان کرد که به دلیل فاصله زیاد حوضه‌های این گونه‌ها، عدم ارتباط آبی و شرایط اکولوژیک متفاوت به‌صورتی که رودخانه کسپیلان دارای آب نآرام، تلاطم و به علت وجود شیب بالا در منطقه دارای منابع ناچیز غذایی و رودخانه تجون در ارتفاعی نزدیک سطح دریا و دارای آب با تلاطم کم‌تر است (Bahrebar, 2013) باعث ایجاد این اختلافات در گونه‌های مورد مطالعه شده است. انعطاف ریختی ماهیان این اجازه را به آن‌ها می‌دهد تا نسبت به تغییرات محیطی پاسخی به صورت تغییرات فیزیولوژیکی و رفتاری دهند که خود می‌تواند منجر به تغییرات ریخت‌شناسی، تولیدمثلی و بقا در آن‌ها شده و بدین ترتیب اثرات تغییرات محیطی تعدیل شود (Soule, 1982). که این تغییرات ریختی الزاماً منجر به تغییرات ژنتیکی در جمعیت نمی‌شود (Mburu & Hanotta, 2005).

اختلافات ژنتیکی و جدایی تولیدمثلی بین جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف که در نهایت منجر به سازگاری‌های مکانی می‌شوند مربوط به ریخت‌شناسی،

می‌کند. در نظریه مانع جغرافیایی، گونه‌های متعلق به منطقه واحد بر روی درخت فیلوژنی به هم نزدیک‌تر هستند، اما در نظریه پراکنش، گونه‌های متعلق به مناطق مختلف به هم نزدیک‌تر هستند (Freeland, 2010). نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نظریه مانع جغرافیایی را تأیید می‌کند.

طبق فرضیه Zardoya *et al.* (1999) احتمالاً انشقاق قاره‌ها علت اصلی تمایز مولکولی مشاهده شده در داخل حوضه‌های جغرافیایی ماهی‌های ایران است و ممکن است بیانگر واگرایی جمعیت ماهی‌ها در مکانیسم‌های رفتاری و اختلافات زمانی در جریان ژنی باشد. زمین‌شناسی ایران حاکی از جدایی سریع مناطق مختلف از یکدیگر است. تورفتگی‌های گسترده از صفحه عربستان به صفحه ایران در ۱۰ میلیون سال قبل باعث ایجاد کوه‌های زاگرس در لبه جنوبی صفحه ایران شده است. ادامه حرکت شمال‌شرقی صفحه عربستان و حرکت شمالی صفحه هند منتج به ساخت زیادتری از کوه‌ها در پنج میلیون سال قبل در امتداد لبه شمالی فلات ایران شده که به‌خوبی صفحات ایران، لوت و هلمند را به هم متصل می‌کند و حوضه‌های زهکشی متفاوتی را ایجاد می‌کند (Jackson *et al.*, 2002). این حوادث جریان ژنی جمعیت‌های مختلف موجود در این مناطق را تحت تأثیر قرار می‌دهد. توصیف و شرح گونه‌های جدید جنس *Alburnoides* از جمله *A. namaki* (حوضه دریاچه نمک)، *A. qanati* (حوضه کر)، *A. petrubanarescui* (حوضه ارومیه)، *A. nicolausi* (حوضه دجله) و *A. idignensis* (حوضه تیگره) که به‌عنوان یک گروه پیچیده از *A. bipunctatus* در نظر گرفته شده است تاریخچه تمایز ژئومورفولوژی این حوضه‌ها را نشان می‌دهد (Seifali *et al.*, 2012). پراکنش گسترده *Alburnoides* در جنوب حوضه دریای خزر از غرب (رودخانه ارس، شرق قفقاز) به سمت شرق (رودخانه اترک، کپه‌داغ) با چنین شرایط زیستگاهی مختلف، ممکن است برای تعیین جمعیت *Alburnoides* و در

رفتارشناسی، فیزیولوژی و ساختار چرخه زندگی می‌شود (Taberlet, 1996). از طرف دیگر عوامل محیطی می‌توانند انعطافات فنوتیپی را به‌وجود آورند و در ضمن ژنوتیپ می‌تواند، فنوتیپ‌های مختلفی را در محیط‌های گوناگون حاصل کند. انعطاف فنوتیپی یک منبع تغییرات ریخت‌شناسی در ماهیان به‌شمار می‌رود (Bronmark & Petterson, 1994). بنابراین، قسمت عمده‌ای از تغییرات درون‌جمعیتی در نتیجه گروه‌های فنوتیپی مختلف در هر منطقه بوده که این تفاوت‌ها در اثر شرایط متفاوت محیطی یا تفاوت‌های ژنتیکی است. گونه *A. idignensis* از دیگر گونه‌ها جدا شده است و با توجه به نتایج حاصل از اختلافات تک‌نوکلئوتیدی و درخت‌های فیلوژنی، این گونه دارای اختلاف زیادی با گونه‌های دیگر حتی با گونه‌های *Alburnus* (برون‌گروه‌ها) است این تغییرات ژنتیکی فراوان در این گونه ممکن است جهت سازگاری مکانی که تحت تأثیر شرایط اکولوژی زیستگاه پراکنش این گونه (استان خوزستان - حوضه کارون - رودخانه دز)، رفتاری، فیزیولوژی و دیگر عوامل موثر باشد. جدایی جغرافیایی، محیط‌زیست، مسئله گردن بطری، جریان ژنی و انتخاب اثرات زیادی را بر ساختار جوامع دارند (Haghighy *et al.*, 2015).

ممکن است ویژگی‌هایی هم‌چون اندازه کوچک این ماهیان، قدرت پراکنش و تحرک پایین، ایزوله یا محدود بودن جمعیت‌های این ماهی و اندازه کوچک زیستگاه یا فضای اشغال‌شده توسط ماهی منجر به تکامل بسیار بومی و منطقه‌ای در اغلب گونه‌های این جنس شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مبنی بر قرارگرفتن *A. eichwaldii* و *A. petrubanarescui* در شاخه‌ای تک‌تبار با واگرایی ملکولی اندک که این دو گونه به‌ترتیب از حوضه دریاچه خزر و دریاچه ارومیه نمونه‌برداری شده بودند ممکن است نیای مشترک این دو گونه به کنج‌های حاشیه‌ای پناه برده و انشقاق به شکل کنونی شکل گرفته باشد. رابطه فیلوژنتیک جمعیت‌ها با توجه به نوع پراکنش و مانع جغرافیایی تغییر

باعث نیرو بخشیدن به انگیزه‌های حفاظت خواهد شد. با انجام آزمون آنالیز واریانس روی ۲۲ صفت نسبی اندازه‌شی به جز در صفات طول کل به طول استاندارد، طول چنگالی به طول استاندارد و ارتفاع باله پشتی به طول استاندارد اختلاف آماری معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول و گونه‌های *A. petrubanarescui* و *A. idignensis* براساس مؤلفه دوم از همدیگر مجزا شدند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای دو خوشه مجزا را نشان دادند که در یک خوشه گونه *A. idignensis* و با فاصله بیش‌تری نسبت به گونه‌های دیگر قرار دارند و خوشه دیگر شامل بقیه گونه‌ها بود که در این خوشه نیز دو گونه *A. namaki* و *A. nicolausi* و همچنین دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* در دو خوشه مجزا دیگر قرار گرفته بودند. بنابراین می‌توان گفت دو گونه *A. namaki* و *A. nicolausi* و همچنین دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* از لحاظ صفات نسبی اندازه‌شی شباهت بیش‌تری با همدیگر دارند.

از بین صفات شمارشی مورد مطالعه با آزمون چند دامنه دانکن در رابطه با تمامی صفات اختلاف آماری معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$)، اما در دو صفت تعداد شعاع‌های غیرمنشعب باله پشتی و منخرجی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P > 0.05$). گونه‌های *A. idignensis* و *A. nicolausi* براساس مؤلفه اول از همدیگر جدا شدند و گونه *A. eichwaldii* براساس مؤلفه دوم از سایر گونه‌ها جدا شد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که گونه *A. nicolausi* در یک خوشه مجزا قرار گرفته است که با فاصله بیش‌تری نسبت به گونه‌های دیگر قرار دارد و دو گونه *A. qanati* و *A. eichwaldii* در دو خوشه مجزا و نزدیک به هم قرار گرفته‌اند، بنابراین می‌توان گفت این دو گونه از لحاظ صفات شمارشی شباهت بیش‌تری به هم دارند

تشکیل گونه‌های مجزا مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نظریه مندل، تجزیه و تحلیل ژن سیتوکروم *b* ژنوم میتوکندری نشان داده است که جنس *Alburnoides* یک گروه پیچیده است که از فرانسه به افغانستان یافت می‌شود که متشکل از پنج گروه هم‌تبار است. به‌عنوان مثال این پنج گروه شامل ۱- *Alburnoides* فرانسه، چک، اسلواکی، ۲- *Alburnoides* sp. کرواسی، ۳- *A. ohridanus* یونان، ۴- *A. strymonicus* یونان و ۵- *Alburnoides* sp. روسیه است. براساس این شواهد، جمعیت‌های مختلف جنس *Alburnoides* در حوضه‌های جدا شده از کوه‌های زاگرس و البرز و فلات ایران تشکیل یک گروه مونوفیلیتیک را می‌دهند. شواهد مولکولی در مطالعات *Seifali et al.* (2012) از این فرضیه که *Alburnoides* حوضه جنوب دریای خزر ایران وجود ندارد و جمعیت‌های غربی و شرقی این حوضه گونه‌های مجزا هستند، پشتیبانی می‌کند (Samaee et al., 2006).

جمعیت‌های جنس *Alburnoides* در ایران و حوضه‌های جنوبی دریای خزر از فراوانی نسبتاً خوبی برخوردار هستند و تقریباً در ۷۵ درصد حوضه‌های آبی ایران پراکنش دارند. با این که از این جنس ۱۵ گونه در اروپا یافت می‌شود، اما به‌عنوان جنس در معرض خطر انقراض معرفی شده است. از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر طبیعی این ماهی می‌توان به تخریب زیستگاه، پایین آمدن سطح آب و آلودگی آب توسط سموم شیمیایی اشاره نمود که با توجه بیش‌تر به شرایط زیستگاهی و تخم‌ریزی این ماهی می‌توان به بقای آن‌ها کمک مؤثرتری کرد. به‌دلیل تنوع زیاد و بومی بودن گونه‌های این جنس در ایران نسبت به کشورهای دیگر مطالعه در زمینه وضعیت بیولوژی، اکولوژی و حفاظتی این گونه‌ها حائز اهمیت است. تعیین جایگاه تاکسونومیک گونه‌های این جنس به‌عنوان گونه‌های مجزا، بیانگر ذخیره ژنتیکی منحصر به فرد (Eagderi et al., 2013) و در نتیجه ارزش‌های حفاظتی آن به‌عنوان گونه بومی است که

دیگر نیز از نظر مولکولی از یکدیگر جدا شدند. نتایج به‌دست‌آمده از داده‌های توالی‌یابی این قطعه از ژن سیتوکروم *b* نشان می‌دهد که این ژن برای بررسی روابط فیلوژنتیک گونه‌های مورد مطالعه جنس *Alburnoides* مفید بوده است. پژوهش‌گران مختلفی براساس خصوصیات و صفات ریخت‌سنجی و شمارشی ماهیان، گونه‌های متفاوتی را تعریف کرده‌اند. صفات ریخت‌شناسی و شمارشی می‌توانند به‌عنوان روشی برای شناسایی و تفکیک گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند و در این مطالعه با وجود هم‌پوشانی‌هایی که در صفات ریخت‌شناسی و شمارشی وجود داشت، با این حال می‌توان گونه‌های مورد مطالعه را از یکدیگر تفکیک کرد و نتایج حاصل از مطالعه مولکولی بر روی گونه‌های مورد مطالعه این نتایج را تأیید کرد. اما، برای درک بهتر لازم است از تعداد نمونه‌ها و صفات بیش‌تر در کنار مطالعات ژنوم‌های دیگر و همچنین استخوان‌شناسی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر منوچهر نصری، دکتر سعید اسدالله، مهندس علی نظام‌الاسلامی و مهندس علی میرزایی جهت همکاری در نمونه‌برداری، تشکر و قدردانی می‌گردد. هزینه‌های مالی اجرای این پژوهش توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

با تلفیق داده‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات شمارشی و اندازه‌های گونه‌های *A. qanati* و *A. eichwaldii* در هر دو شباهت بیش‌تری با هم دارند ولی گونه *A. nicolausi* در صفات اندازه‌های به گونه شباهت دارد ولی در صفات شمارشی به کلی از گونه‌های دیگر جدا می‌شود. در مطالعات شمارشی که گونه *A. nicolausi* اختلاف زیادی با گونه‌های دیگر داشت را این طور می‌توان توجیه کرد که به‌دلیل تعداد نمونه‌های کم‌تر این گونه نسبت به سایر گونه‌ها، این اختلاف قابل توجه شده است و برای اطمینان از این اختلاف نیاز به بررسی تعداد نمونه‌های بیش‌تری از این گونه است. آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی ۴۰۹bp ژن سیتوکروم *b* نشان داد که گونه *A. idignensis* در فاصله بیش‌تری از گونه‌های دیگر قرار گرفته است که در نتایج ریخت‌سنجی و شمارشی نیز این اختلاف مشاهده شد که می‌تواند در نتیجه سازگاری مکانی یا سیر تکاملی گونه‌ها و فرایند گونه‌زایی که در اثر عواملی هم‌چون شرایط زیستگاهی، رفتاری، فیزیولوژی ایجاد شده باشد. گونه‌های *A. petrubanarescui* و *A. eichwaldii* بیش‌ترین شباهت را داشتند که این نتیجه از نظریه مانع جغرافیایی تبعیت می‌کند که گونه‌های مربوط به مکان‌های نزدیک به هم در درخت فیلوژنی در فاصله نزدیک‌تری نسبت به هم قرار می‌گیرند. گونه‌های

ضمائم

ضمیمه ۱. نوع و مقدار مواد استفاده‌شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

ماده	غلظت اولیه مواد	حجم (μl) در هر واکنش
دی.ان.ا.	-	۱
تگ دی.ان.ا. پلی‌مرز	۵۰ μl	۰/۳
دی.ان.تی.بی	۱۰ mM	۰/۴
MgCl ₂	۵۰ mM	۱/۶
PCR buffer	۱۰ X	۲
آغازگر F	۱۰ pM	۱
آغازگر R	۱۰ pM	۱
آب مقطر	-	۱۲/۷
حجم کل	-	۲۰

ضمیمه ۲. مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

مراحل	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه‌ها
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۴	۱
واسرشته‌سازی	۹۶	۰/۵	۳۵
الحاق	۵۶	۰/۵	۳۵
بسط	۷۲	۳	۳۵
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱
	۱۰	بی‌نهایت	

ضمیمه ۳. دامنه، میانگین و انحراف معیار صفات نسبی اندازه‌های گونه‌های مورد مطالعه

<i>A. qanat</i>		<i>A. petrubanarescui</i>		<i>A. nicolausi</i>		نسبت‌های اندازه‌ای
میانگین	دامنه	میانگین	دامنه	میانگین	دامنه	
۱/۲۲±۰/۰۳ ^a	۱/۰۷-۱/۲۴	۱/۲۲±۰/۰۳ ^{ab}	۱/۱۷-۱/۲۶	۱/۲۱±۰/۰۳ ^{ab}	۱/۱۶-۱/۲۸	طول کل / طول استاندارد
۱/۱۱±۰/۰۴ ^a	۰/۸۹-۱/۱۴	۱/۱۲±۰/۰۱ ^a	۱/۱۲-۱/۱۵	۱/۱۱±۰/۰۴ ^a	۰/۷۳-۱/۱۷	طول چنگالی / طول استاندارد
۰/۵۱±۰/۰۲ ^a	۰/۴۵-۰/۵۴	۰/۵۲±۰/۰۱ ^b	۰/۵۱-۰/۵۴	۰/۵۳±۰/۰۲ ^b	۰/۵۱-۰/۵۸	فاصله باله پشتی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۳۷±۰/۰۳ ^b	۰/۲۸-۰/۴۲	۰/۳۷±۰/۰۱ ^b	۰/۳۴-۰/۴	۰/۳۶±۰/۰۲ ^{ab}	۰/۳۱-۰/۴۲	فاصله بین انتهای باله پشتی تا انتهای بدن / طول استاندارد
۰/۲۴±۰/۰۱ ^b	۰/۲۲-۰/۲۷	۰/۲۶±۰/۰۱ ^c	۰/۲۴-۰/۲۸	۰/۲۲±۰/۰۲ ^a	۰/۱۹-۰/۲۶	طول ساقه دمی / طول استاندارد
۰/۱۱±۰/۰۰۵ ^c	۰/۱-۰/۱۲	۰/۱۲±۰/۰۰۴ ^d	۰/۱۲-۰/۱۳	۰/۱۱±۰/۰۱ ^c	۰/۰۹-۰/۱۴	ارتفاع ساقه دمی / طول استاندارد
۰/۲۶±۰/۰۰۹ ^b	۰/۲۳-۰/۳۷	۰/۲۶±۰/۰۰۷ ^{bc}	۰/۲۵-۰/۲۷	۰/۲۹±۰/۰۲ ^d	۰/۲۳-۰/۳۱	طول سر به طول استاندارد
۰/۷۵±۰/۰۲ ^b	۰/۷۱-۰/۸۱	۰/۷۶±۰/۰۲ ^b	۰/۷۳-۰/۷۹	۰/۷۹±۰/۰۴ ^c	۰/۷۴-۰/۹۷	عرض سر / طول سر
۰/۲۵±۰/۰۲ ^c	۰/۲-۰/۳۱	۰/۲۷±۰/۰۲ ^d	۰/۲۴-۰/۲۹	۰/۲۳±۰/۰۲ ^b	۰/۲-۰/۲۸	طول پوزه / طول سر
۰/۳۴±۰/۰۳ ^b	۰/۲۹-۰/۴۰	۰/۳۲±۰/۰۲ ^a	۰/۲۸-۰/۳۵	۰/۳۸±۰/۰۴ ^c	۰/۳۲-۰/۵۱	قطر حدقه چشم / طول سر
۰/۱۴±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۱۲-۰/۱۷	۰/۱۴±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۱۳-۰/۱۵	۰/۱۳±۰/۰۰۹ ^{ab}	۰/۱۲-۰/۱۵	طول قاعده باله پشتی / طول استاندارد
۰/۳۷±۰/۰۰۶ ^{ab}	۰/۰۳-۰/۰۵	۰/۰۴±۰/۰۰۵ ^c	۰/۰۴-۰/۰۵	۰/۰۳±۰/۰۰۵ ^a	۰/۰۳-۰/۰۴	طول قاعده باله سینه‌ای / طول استاندارد
۰/۰۲±۰/۰۰۴ ^b	۰/۰۲-۰/۰۳	۰/۰۴±۰/۰۰۵ ^c	۰/۰۳-۰/۰۴	۰/۰۲±۰/۰۰۵ ^a	۰/۰۲-۰/۰۳	طول قاعده باله شکمی / طول استاندارد
۰/۱۵±۰/۰۱ ^b	۰/۱۲-۰/۱۸	۰/۱۴±۰/۰۱ ^a	۰/۱۳-۰/۱۶	۰/۱۷±۰/۰۱ ^c	۰/۱۴-۰/۱۹	طول قاعده باله مخرجی / طول استاندارد
۰/۲۴±۰/۰۱ ^{cd}	۰/۱۸-۰/۲۸	۰/۲۴±۰/۰۱ ^{ab}	۰/۲۲-۰/۲۵	۰/۲۴±۰/۰۱ ^b	۰/۲۱-۰/۲۷	ارتفاع باله پشتی / طول استاندارد
۰/۱۸±۰/۰۱ ^{cd}	۰/۱۶-۰/۲۲	۰/۱۸±۰/۰۱ ^c	۰/۱۷-۰/۱۹	۰/۱۶±۰/۰۱ ^a	۰/۱۳-۰/۱۹	ارتفاع باله مخرجی / طول استاندارد
۰/۲۸±۰/۰۳ ^c	۰/۲۳-۰/۳۵	۰/۲۷±۰/۰۴ ^d	۰/۱۵-۰/۳۷	۰/۲۷±۰/۰۲ ^c	۰/۲۳-۰/۳۴	عرض واقع در بین دو حفره چشم / طول سر
۰/۴۶±۰/۰۲ ^b	۰/۴۲-۰/۵۱	۰/۴۸±۰/۰۱ ^c	۰/۴۷-۰/۵۱	۰/۰۵±۰/۰۰۳ ^d	۰/۴۷-۰/۶۱	فاصله باله شکمی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۶۲±۰/۰۲ ^{bc}	۰/۵۵-۰/۶۷	۰/۶۴±۰/۰۰۶ ^{cd}	۰/۶۱-۰/۶۸	۰/۶۴±۰/۰۰۲ ^d	۰/۶-۰/۷۰	فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۲۶±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۲۳-۰/۲۸	۰/۲۷±۰/۰۱ ^c	۰/۲۶-۰/۲۹	۰/۲۷±۰/۰۱ ^{cd}	۰/۲۴-۰/۳۰	ارتفاع بدن / طول استاندارد
۱/۰±۰/۰۰۴ ^b	۰/۹۳-۱/۱۰	۰/۹۶±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۸۸-۱/۰۳	۱/۰±۰/۰۰۷ ^b	۰/۸۵-۱/۲۵	طول سر / ارتفاع بدن
۰/۴۲±۰/۰۱ ^c	۰/۳۹-۰/۴۶	۰/۴۷±۰/۰۱ ^d	۰/۴۵-۰/۴۸	۰/۴۳±۰/۰۰۳ ^b	۰/۳۳-۰/۵۳	ارتفاع ساقه دمی / ارتفاع بدن

ضمیمه ۴. دامنه، میانگین و انحراف معیار صفات نسبی اندازه‌های گونه‌های مورد مطالعه

<i>A. namaki</i>		<i>A. idignensis</i>		<i>A. eichwaldii</i>		نسبت‌های اندازه‌ای
میانگین	دامنه	میانگین	دامنه	میانگین	دامنه	
۱/۲۲±۰/۰۳ ^{ab}	۱/۱۶-۱/۲۸	۱/۲۴±۰/۰۶۸ ^b	۰/۹۴-۰/۳۹	۱/۲۳±۰/۰۰۹ ^{ab}	۱/۱۵-۱/۶۹	طول کل / طول استاندارد
۱/۱۳±۰/۰۲۶ ^a	۱/۰۹-۱/۱۸	۱/۱۲±۰/۰۰۷ ^a	۰/۸۲-۱/۱۷	۱/۱۳±۰/۰۰۳ ^a	۱/۰۶-۱/۱۷	طول چنگالی / طول استاندارد
۰/۵۳±۰/۰۰۲ ^b	۰/۴۵-۰/۵۷	۰/۵۱±۰/۰۰۴ ^a	۰/۳۷-۰/۵۵	۰/۵۱±۰/۰۰۴ ^a	۰/۴۵-۰/۵۴	فاصله باله پشتی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۳۵±۰/۰۰۲ ^a	۰/۳۲-۰/۳۸	۰/۳۵±۰/۰۰۳ ^{ab}	۰/۲۸-۰/۴۱	۰/۳۵±۰/۰۰۲ ^a	۰/۳۲-۰/۳۹	فاصله بین انتهای باله پشتی تا انتهای بدن / طول استاندارد
۰/۲۲±۰/۰۰۲ ^a	۰/۱۹-۰/۲۵	۰/۲۱±۰/۰۰۴ ^a	۰/۱۲-۰/۳۴	۰/۲۱±۰/۰۰۲ ^a	۰/۱۷-۰/۲۶	طول ساقه دمی / طول استاندارد
۰/۱۱±۰/۰۰۱ ^c	۰/۰۹-۰/۱۳	۰/۰۹±۰/۰۰۱ ^a	۰/۰۶-۰/۱۴	۰/۰۹±۰/۰۰۱ ^b	۰/۰۸-۰/۱۱	ارتفاع ساقه دمی / طول استاندارد
۰/۳۷±۰/۰۰۱ ^c	۰/۲۵-۰/۳۹	۰/۲۶±۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۲-۰/۲۸	۰/۲۵±۰/۰۰۸ ^a	۰/۲۳-۰/۳۷	طول سر به طول استاندارد
۰/۸۵±۰/۰۲۸ ^c	۰/۷۳-۲/۱۲	۰/۷۱±۰/۰۰۴ ^a	۰/۶۴-۰/۷۸	۰/۷۵±۰/۰۵۴ ^b	۰/۶۳-۰/۸۸	عرض سر / طول سر
۰/۲۳±۰/۰۰۲ ^b	۰/۲-۰/۲۸	۰/۲۱±۰/۰۰۲ ^a	۰/۱۷-۰/۲۵	۰/۲۳±۰/۰۰۳ ^b	۰/۱۷-۰/۲۸	طول پوزه / طول سر
۰/۴۰±۰/۰۰۳ ^c	۰/۳۵-۰/۵۱	۰/۴۴±۰/۰۰۴ ^d	۰/۳۷-۰/۵۲	۰/۳۵±۰/۰۳۳ ^b	۰/۳۱-۰/۴۱	قطر حدقه چشم / طول سر
۰/۱۵±۰/۰۰۱ ^c	۰/۱۳-۰/۱۷	۰/۱۳±۰/۰۰۱ ^a	۰/۱-۰/۱۵	۰/۱۴±۰/۰۰۱ ^c	۰/۱۲-۰/۱۷	طول قاعده باله پشتی / طول استاندارد
۰/۰۴±۰/۰۰۴ ^b	۰/۰۳-۰/۰۵	۰/۰۴±۰/۰۰۷ ^{ab}	۰/۰۲-۰/۰۵	۰/۰۴±۰/۰۰۶ ^{ab}	۰/۰۳-۰/۰۵	طول قاعده باله سینه‌ای / طول استاندارد
۰/۰۳±۰/۰۰۴ ^b	۰/۰۲-۰/۰۳	۰/۰۲±۰/۰۰۷ ^a	۰/۰۱-۰/۰۴	۰/۰۲±۰/۰۰۵ ^{ab}	۰/۰۲-۰/۰۳	طول قاعده باله شکمی / طول استاندارد
۰/۱۷±۰/۰۰۱ ^c	۰/۱۴-۰/۱۹	۰/۱۹±۰/۰۰۲ ^d	۰/۱۵-۰/۲۲	۰/۱۷±۰/۰۰۱ ^c	۰/۱۳-۰/۲۰	طول قاعده باله مخرجی / طول استاندارد
۰/۲۳±۰/۰۰۱ ^a	۰/۲۲-۰/۲۵	۰/۲۴±۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۱۹-۰/۲۷	۰/۲۵±۰/۰۰۲ ^b	۰/۲۲-۰/۳۰	ارتفاع باله پشتی / طول استاندارد
۰/۱۷±۰/۰۰۱ ^b	۰/۱۶-۰/۱۹	۰/۱۹±۰/۰۰۱ ^d	۰/۱۵-۰/۲۰	۰/۱۸±۰/۰۰۱ ^b	۰/۱۶-۰/۲۰	ارتفاع باله مخرجی / طول استاندارد
۰/۳۷±۰/۰۰۴ ^{bc}	۰/۱۵-۰/۳۳	۰/۲۰±۰/۰۰۲ ^a	۰/۱۷-۰/۲۵	۰/۱۸±۰/۰۰۱ ^b	۰/۲۲-۰/۳۱	عرض واقع در بین دو حفره چشم / طول سر
۰/۴۸±۰/۰۰۱ ^c	۰/۴۶-۰/۵۲	۰/۴۴±۰/۰۰۳ ^a	۰/۳۲-۰/۴۶	۰/۴۷±۰/۰۰۲ ^{bc}	۰/۴۴-۰/۵۱	فاصله باله شکمی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۶۲±۰/۰۰۲ ^c	۰/۵۸-۰/۶۶	۰/۶۰±۰/۰۰۳ ^a	۰/۴۵-۰/۶۲	۰/۶۰±۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۵۶-۰/۶۴	فاصله باله مخرجی تا نوک پوزه / طول استاندارد
۰/۲۸±۰/۰۰۱ ^d	۰/۲۵-۰/۳۱	۰/۳۴±۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۱۸-۰/۲۸	۰/۲۵±۰/۰۰۲ ^a	۰/۲۳-۰/۲۹	ارتفاع بدن / طول استاندارد
۰/۹۷±۰/۰۰۶ ^a	۰/۸۵-۱/۰۷	۱/۰۶±۰/۰۰۸ ^b	۰/۹۴-۱/۱۹	۱/۰±۰/۰۰۷ ^b	۰/۸۶-۱/۱۶	طول سر / ارتفاع بدن
۰/۴۲±۰/۰۰۴ ^c	۰/۳۳-۰/۴۷	۰/۳۵±۰/۰۰۷ ^a	۰/۲۷-۰/۵۹	۰/۳۷±۰/۰۰۴ ^b	۰/۲۹-۰/۴۴	ارتفاع ساقه دمی / ارتفاع بدن

ضمیمه ۵. دامنه، میانگین و انحراف معیار صفات شمارشی گونه‌های مورد مطالعه

<i>A. namaki</i>		<i>A. idignensis</i>		<i>A. eichwaldii</i>		صفت شمارشی مورد مطالعه
دامنه	±sd میانگین	دامنه	±sd میانگین	دامنه	±sd میانگین	
۴۵-۵۴	۴۸/۷۴±۲/۴۳ ^b	۴۹-۵۶	۵۲/۷۸±۱/۸۸ ^d	۴۶-۵۶	۵۰/۵۵±۲/۴۳ ^{bc}	فلس‌های خط جانبی
۱۰-۱۲	۱۱/۱۷±۰/۵۸ ^b	۱۱-۱۳	۱۲/۰۴±۰/۳۷ ^c	۱۰-۱۲	۱۱/۰۷±۰/۵۹ ^b	فلس‌های بالای خط جانبی
۴-۶	۵/۰۴±۰/۳۶ ^c	۴-۶	۴/۸۶±۰/۴۵ ^c	۴-۵	۴/۱۷±۰/۳۸ ^a	فلس‌های پایین خط جانبی
۷-۹	۷/۴۷±۰/۶۶ ^a	۷-۸	۷/۱۷±۰/۳۸ ^a	۶-۸	۷/۱۳±۰/۷۹ ^a	شعاع‌های منشعب باله پشتی
۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	شعاع‌های غیرمنشعب باله پشتی
۱۱-۱۴	۱۱/۶۹±۰/۸۲ ^c	۱۲-۱۶	۱۴/۳۴±۰/۹۳ ^d	۹-۱۲	۱۰/۸۶±۰/۸۲ ^b	شعاع‌های منشعب باله مخرجی
۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	شعاع‌های غیرمنشعب باله مخرجی
۱۲-۱۳	۱۳±۰/۶ ^{cd}	۱۳-۱۴	۱۳/۳۳±۰/۴۷ ^{cc}	۱۱-۱۳	۱۲/۳۴±۰/۶۱ ^a	شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای
۶-۸	۶/۳±۰/۵۵ ^a	۷-۹	۸/۱۳±۰/۵۴ ^c	۷-۸	۷/۶۵±۰/۴۸ ^b	شعاع‌های منشعب باله شکمی

ضمیمه ۶. دامنه، میانگین و انحراف معیار صفات شمارشی گونه‌های مورد مطالعه

<i>A. qanat</i>		<i>A. petrubanarescui</i>		<i>A. nicolausi</i>		صفت شمارشی مورد مطالعه
دامنه	±sd میانگین	دامنه	±sd میانگین	دامنه	±sd میانگین	
۴۸-۵۶	۵۱/۲۳±۲/۱۹ ^{cd}	۴۷-۵۲	۴۹/۲۲±۱/۳۹ ^b	۴۲-۴۵	۴۲/۴۷±۱/۰۱ ^a	فلس‌های خط جانبی
۱۰-۱۲	۱۱/۳۳±۰/۵۵ ^b	۱۱-۱۲	۱۱/۱۱±۰/۳۳ ^b	۹-۱۰	۹/۴±۰/۵ ^a	فلس‌های بالای خط جانبی
۴-۵	۴/۵۶±۰/۵ ^b	۴-۵	۴/۵۵±۰/۵۲ ^b	۳-۴	۳/۹۶±۰/۱۸ ^a	فلس‌های پایین خط جانبی
۷/۸	۷/۴±۰/۵ ^a	۸	۸±۰ ^b	۶-۹	۷/۱±۰/۴۸ ^a	شعاع‌های منشعب باله پشتی
۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	شعاع‌های غیرمنشعب باله پشتی
۸-۱۲	۱۰/۳۳±۱/۰۶ ^b	۹-۱۱	۱۰/۳۳±۰/۷ ^b	۸-۱۱	۹/۳±۰/۶۵ ^a	شعاع‌های منشعب باله مخرجی
۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	۳	۳±۰ ^a	شعاع‌های غیرمنشعب باله مخرجی
۱۲-۱۳	۱۲/۶۳±۰/۵ ^{ab}	۱۳-۱۴	۱۳/۳۳±۰/۵ ^c	۱۲-۱۳	۱۲/۹۳±۰/۲۵ ^{bc}	شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای
۸-۹	۸/۵۶±۰/۵ ^d	۷-۹	۸±۰/۵ ^c	۷-۹	۷/۸۳±۰/۵۳ ^{bc}	شعاع‌های منشعب باله شکمی

ضمیمه ۷. نتایج آنالیز صفات شمارشی به عامل‌های اصلی و واریانس آن‌ها

مؤلفه	مقادیر آیگن اولیه			مجموع مربع بارها			مجموع چرخنده مربع بارها		
	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)	جمع	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)
۱	۲/۶۶	۳۸/۰۲	۳۸/۰۲	۲/۶۶	۳۸/۰۲	۳۸/۰۲	۲/۶۶	۳۷/۳۹	۳۷/۳۹
۲	۱/۳۱	۱۸/۸	۵۶/۸۲	۱/۳۱	۱۸/۸	۵۶/۸۲	۵۴/۸	۱۷/۴۱	۵۴/۸
۳	۱/۰۴	۱۴/۹۶	۷۱/۷۸	۱/۰۴	۱۴/۹۶	۷۱/۷۸	۷۱/۷۸	۱۶/۹۸	۷۱/۷۸
۴	-/۱۶	۱۲/۳۸	۸۴/۱۷						
۵	-/۴۶	۶/۶۶	۹۰/۸۴						
۶	-/۳۸	۵/۴۴	۹۶/۳۴						
۷	-/۲۶	۳/۷۱	۱۰۰						

ضمیمه ۸. همبستگی میان صفات شمارشی و سه مؤلفه به‌دست‌آمده در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم
۱ تعداد فلس‌های روی خط جانبی	۰/۷۹*	-۰/۴	-۰/۰۹
۲ تعداد فلس‌های بالای خط جانبی	۰/۸۷*	-۰/۱۹	-۰/۰۶
۳ تعداد فلس‌های پایین خط جانبی	۱/۷۴*	۰/۳	-۰/۱۹
۴ تعداد شعاع‌های منشعب باله پشتی	۰/۱۸*	۰/۴	۰/۶۳*
۶ تعداد شعاع‌های منشعب باله مخرجی	۱/۸۱*	۰/۰۶	-۰/۰۱
۸ تعداد شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای	۰/۱۵	۰/۶۴*	۰/۴
۹ تعداد شعاع‌های منشعب باله شکمی	-۰/۰۵	-۰/۶۵	۰/۶۵*

* بیش‌ترین همبستگی بین صفات شمارشی و مؤلفه‌ها

ضمیمه ۹. تعداد و درصد فراوانی فلس‌های روی خط جانبی گونه‌های مورد مطالعه

گونه	۴۲	۴۳	۴۴	۴۵	۴۶	۴۷	۴۸	۴۹	۵۰	۵۱	۵۲	۵۳	۵۴	۵۵	۵۶
<i>A. qanati</i>	-	-	-	-	-	-	۷	۱۷	۲۰	۱۰	۳۰	۳	۳	۰	۱۰
<i>A. eichwaldii</i>	-	-	-	-	۳	۳	۱۴	۲۱	۱۴	۳	۲۱	۸	۱۰	۰	۳
<i>A. idignensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	۴	۱۳	۵	۱۷	۲۱	۲۶	۵	۹
<i>A. nicolausi</i>	۲۰	۳۰	۳۳	۱۷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. namaki</i>	-	-	-	۹	۱۳	۹	۲۲	۹	۱۷	۴	۱۳	۴	-	-	-
<i>A. petrubanarescui</i>	-	-	-	-	-	۱۱	۱۱	۴۵	۲۲	۱۱	-	۱۱	-	-	-

ضمیمه ۱۰. تعداد و درصد فراوانی فلس‌های بالای خط جانبی گونه‌های مورد مطالعه

ردیف	گونه	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱	<i>A. qanati</i>	-	۳	۶۰	۳۷	-
۲	<i>A. eichwaldii</i>	-	۱۴	۶۵	۲۱	-
۳	<i>A. idignensis</i>	-	-	۴	۸۷	۹
۴	<i>A. nicolausi</i>	۶۰	۴۰	-	-	-
۵	<i>A. namaki</i>	-	۱۰	۶۵	۲۶	-
۶	<i>A. petrubanarescui</i>	-	-	۸۹	۱۱	-

ضمیمه ۱۱. تعداد و درصد فراوانی فلس‌های پایین خط جانبی گونه‌های مورد مطالعه

ردیف	گونه	۳	۴	۵	۶
۱	<i>A. qanati</i>	-	۴۳	۵۷	-
۲	<i>A. eichwaldii</i>	-	۸۳	۱۷	-
۳	<i>A. idignensis</i>	-	۱۷	۷۸	۵
۴	<i>A. nicolausi</i>	۳	۹۷	-	-
۵	<i>A. namaki</i>	-	۴	۸۷	۹
۶	<i>A. petrubanarescui</i>	-	-	۴۴	۵۶

ضمیمه ۱۲. درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله سینه‌ای در گونه‌های مورد مطالعه.

ردیف	گونه	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱	<i>A. qanati</i>	-	۳۷	۶۳	-
۲	<i>A. eichwaldii</i>	۷	۵۲	۴۱	-
۳	<i>A. idignensis</i>	-	-	۷۰	۳۰
۴	<i>A. nicolausi</i>	-	۷	۹۳	-
۵	<i>A. namaki</i>	-	۱۷	۶۵	۱۸
۶	<i>A. petrubanarescui</i>	-	-	۶۷	۳۳

ضمیمه ۱۳. درصد فراوانی شعاع‌های منشعب باله شکمی در گونه‌های مورد مطالعه

ردیف	گونه	۶	۷	۸	۹
۱	<i>A. qanati</i>	-	-	۴۳	۵۷
۲	<i>A. eichwaldii</i>	-	۳۴	۶۶	-
۳	<i>A. idignensis</i>	-	۹	۶۹	۲۲
۴	<i>A. nicolausi</i>	-	۲۳	۷۰	۷
۵	<i>A. namaki</i>	۷۴	۲۲	۴	-
۶	<i>A. petrubanarescui</i>	-	۱۱	۷۸	۱۱

ضمیمه ۱۴. تعداد اختلاف تک نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ های گونه‌های مورد مطالعه

گونه	<i>A. idignensis</i>	<i>A. petrubanarescui</i>	<i>A. eichwaldii</i>	<i>A. namaki</i>	<i>A. nicolausi</i>	<i>A. qanati</i>	<i>Alburnus</i>
<i>A. idignensis</i>	۵۹						
<i>A. petrubanarescui</i>		۴					
<i>A. eichwaldii</i>			۱۲				
<i>A. namaki</i>				۱۲			
<i>A. nicolausi</i>					۶		
<i>A. qanati</i>						۱۰	
<i>Alburnus</i>							۶۴

ضمیمه ۱۵. درصد شباهت بین گونه‌های مورد مطالعه و برون‌گروه (نرم‌افزار DNAMAN)

گونه‌ها	<i>A. idignensis</i>	<i>A. petrubanarescui</i>	<i>A. eichwaldii</i>	<i>A. namaki</i>	<i>A. nicolausi</i>	<i>A. qanati</i>	<i>Alburnus</i>
<i>A. idignensis</i>	٪۱۰۰						
<i>A. petrubanarescui</i>		٪۱۰۰					
<i>A. eichwaldii</i>			٪۱۰۰				
<i>A. namaki</i>				٪۹۷/۱			
<i>A. nicolausi</i>					٪۹۸/۱		
<i>A. qanati</i>						٪۹۶/۴	
<i>Alburnus</i>							٪۸۴/۷

REFERENCES

- Ahmadi, S.E.; Vosoughi, A.R.; Vatandoost, S.; Ghelichi, A.; eidanlou, Z.; (2011). Some specific population structure of Spiralin (*Alburnoides bipunctatus*) in the main Cluster of Talar River in Mazandaran province. Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch; 5(2): 65-80.
- Bahrebar, S.; (2013). Investigation of reproduction characteristics of *Cobitis taenia* in southern coast of Caspian Sea. Journal of Marine Science and Technology; 12(4): 10-20.
- Bogutskaya, N.C.; Coad, B.W.; (2009). A review of vertebral and fin-ray counts in the genus *Alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae) with a description of six new species. Zoosystematic Rossica; 18(1): 126-173.
- Bogutskaya, N.G.; Zupančič, P.; Naseka, A.M.; (2010). Two new species of freshwater fishes of the genus *Alburnoides*, *A. fangfangae* and *A. devolli* (Actinopterygii: Cyprinidae), from the Adriatic Sea Basin in Albania. Proceedings of the Zoological Institute RAS; 314(4): 448-468.
- Bronmark, C; Petterson, L. B.; (1994). Chemical Cues from piscivores induce a change in morphology in crucian carp, *Oikos*; 70: 396-402.
- Coad, B.; (2021). Freshwater fishes of Iran. <http://www.briancoad.com>.
- Coad, B.W.; Bogutskaya, N.; (2009). *Alburnoides qanati*, a new species of cyprinid fish from southern Iran (Actinopterygii, Cyprinidae). ZooKeys; 13: 67-77.
- Dadikyan, M.G.; (1973). Variability of the Armenian riffle minnow (*Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi)) in relation to the altitude at which it occurs. Journal of Ichthyology; 13(1): 68-78.
- 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.
- Esmaeili, H.R.; Mehraban, H.; Abbasi, K.; Keivany, Y.; Coad, B.; (2017). Review and updated checklist of freshwater fishes of Iran: Taxonomy, distribution and conservation status. Iranian Journal of Ichthyology; 4(Suppl. 1): 1-114.
- Freeland, J.; (2010). Molecular ecology. Translated to Persian by Malekian, M. Mashhad Academic Jihad Publisher.

- Haghighy, E.; Sattari, M.; Dorafshan, S.; Keivany, Y.; Khoshkholgh, M.; Comparison of morphological characteristics of Spirlin, (Cyprinidae: *Alburnoides echiwaldii*) in Karganrud and Chalus Rivers using Truss Network System. *Journal of Applied Ichthyological Research*; 1(1): 41-52.
- Haghighy, E.; Sattari, M.; Dorafshan, S.; Keivany, Y.; Genetic structure of spirlin (*Alburnoides echiwaldii*) in Karganroud and Chalous rivers. *Taxonomy & Biosystematics*; 6(2): 1-14.
- Haghighy, E.; Sattari, M.; Dorafshan, S.; Keivany, Y.; Intra-population variations in the morphology of Spirlin, *Alburnoides eichwaldii* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Kargan-Rud and Lamir rivers in Guilan province, northern Iran. *Experimental Animal Biology*; 3(4): 37-46.
- Jackson, J.; Priestley, K.; Allen, M.; Berberian, M.; (2002). Active tectonics of the South Caspian basin. *Geophysical Journal International*; 148: 214-5.
- Keivany, Y.; Nasri, M.; Abbasi, K.; Abdoli, A.; (2016). Atlas of inland water fishes of Iran. Iran Department of Environment Press. 218 p.
- Mburu, D.; Hanotta, O.; (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics, a manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterization of small ruminant genetic resources of Asia. ILRI, Nibirini, Kenya.
- Moghaddam, M.; Mohammadi-Shouti, A.; Aghaei-Sarbarzeh, M.; (1994). Introduction to Multivariate Statistics. Pishtazan Elm, Tabriz, Iran.
- Mohammadi-Sarpiri, F.; Keivany, Y.; Dorafshan, S.; (2021a). Descriptive osteology of *Alburnoides holciki* (Teleostei: Cyprinidae) from Iran. *FishTaxa*; 20: 39-47.
- Mohammadi-Sarpiri, F.; Keivany, Y.; Dorafshan, S.; (2021b). Landmark-based geometric analysis of body shape variation and meristic plasticity among populations of *Alburnoides idignensis* from Tigris River Drainage, Persian Gulf Basin, Iran. *FishTaxa*; 10.22067/IJAB.2021.63448.0
- Mousavi-Sabet, H.; Anvarifar, H.; Azizi, F.; (2015). *Alburnoides tabarestanensis*, a new species of riffle minnow from the southern Caspian Sea basin in Iran (Actinopterygii: Cyprinidae). *Aqua*; 21(3): 144-152.
- 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(4): 293-331.
- Nei, M.; Kumar, S.; (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.
- Perea, S.; Böhme, M.; Zupančič, P.; Freyhof, J.; Šanda, R.; Özuluğ, M.; Abdoli, A.; Doadrio, I.; (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily *Leuciscinae* (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data, *BMC Evolutionary Biology*; 10(265): 1471-2145.
- Roudbar, A.J.; Eagderi, S.; Esmaeili, H.R.; Coad, B.W.; 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.
- Samae, S.; Mojazi, B.; Hosseini, S.M.; (2006). Comparison of *Capoeta capoeta gracilis* (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea River basin, using morphometric ratios and genetic markers. *Folia Zoologica*; 55: 323-335.

- Seifali, M.; Arshad, A.; Yazdani Moghaddam, F.; Esmaeili, H.R.; Kiabi, B.; Khalijah Daud, S.; Aliabadian, M.; (2012). Mitochondrial genetic differentiation of Spiralin (*Actinopterygii*: Cyprinidae) in the south Caspian Sea basin of Iran, *Evolutionary Bioinformatics*; 8: 219-227.
- Siroyova, S.; (2004). External morphology of Spiralin *Alburnoides bipunctatus*. *Acta Zoologica Universitatis Comenianae*; 46(2): 65-74.
- Soule, M.; (1982). Allometric variation, the theory and some consequences, *American Naturalist*; 120: 751-764.
- Stearns, S.C.; (1983). A natural experiment in life history evolution: field data on the introduction of mosquito fish (*Gambusia affinis*) to Hawaii. *Evolution*; 37: 601-617.
- Taberlet, P.; (1996). The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. in *molecular genetics approaches in conservation*, Oxford University Press.
- Wilson, A.C.; Cann, R.L.; Carr, S.M.; George, M.; Gyllensten, U.B.; Helm-Bychowski, K.M.; Higuchi, R.G.; palumbi, S.R.; Prager, E.M.; (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*; 26: 375-400.
- Zardoya, R.; Doadrio, I.; (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 49: 227-37.
- Zardoya, R.; Panos, S.E.; Doadrio, I.; (1999). Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: molecular evidence for at least two origins of the Greek Cyprinid fauna. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 13(11): 22-131.
- Zivkovic, D.; Jovanovic, B.; (2011). Spatial morphometric plasticity of spiralin *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) phenotype from the Nišava River, Serbia, Danube basin. *Biologica Nyssana*; 2(1): 67-77.