13 (2) 239-244, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Molecular identification of native ornamental fish *Aphanius vladykovi* and *Aphanius ginaonis* using cytochrome oxidase gene in Iran

***Reza Nahavandi* [*1], *Saeid Tamadoni Jahromi* [2], *Forough Bayati* [1], *Sajjad Pourmozaffar* [3], *Mohsen Gozari* [2]**

[1] *Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*
[2] *Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Bandar Abbas, Iran*
[3] *Persian Gulf Mollusks Research Station, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Bandar-e-Lengeh, Iran*

Key Words

Aphanius vladykovi
Aphanius ginaonis
Cytochrome Oxidase Gene
Sequencing

Abstract

Introduction: This research was carried out with the aim of molecular identification and using cytochrome oxidase gene of two species of ornamental fish native to Iran entitled *Aphanius vladykovi* and *Aphanius ginaonis*.

Materials & Methods: Five samples of each fish were collected from Sarcheshmeh Park (Aloni city, Chaharmahal and Bakhtiari province) and Genu spring (Bandar Abbas) and after morphological identification and DNA extraction, they were sequenced. Then using BioEdit software and the NCBI database, the amount of homology of the obtained sequences was measured. The analysis of the evolution tree was performed by the closest proximity and parsimony method based on the Kimura 2-parameter model using mega software.

Result: The results showed that these species were genetically close to each other in different parts of Fars province (*A. vladykovi*) and Turkey, and a clade with two sister clusters next to the species belonging to the northern offerings more than Turkey includes *Aphanius anatoliae*, *Aphanius sureyanus*, *Aphanius maeandricus* and *Aphanius iconii*. The greatest genetic differences can be observed between the specimens of *Aphanius vladykovi* from Sarcheshmeh Park spring and *Aphanius sureyanus* from Turkey, which was not unexpected due to the deep geographical gap between the mentioned regions. At the same time, the species *Aphanius* Genu shows itself in a separate clade with a large genetic distance. Various geological factors caused Genu fish to separate itself from other studied species and to hide in Hormozgan region.

Conclusion: Various geological factors caused Genu fish to separate itself from other studied species and to hide in Hormozgan region. As a result, the gene flow between this region and other regions has stopped, and caused the *Aphanius ginaonis* in Hormozgan province to remain as a unique species.

* Corresponding Author's email: rezanahavandi91@gmail.com
Received: 11 April 2020; Reviewed: 26 May 2020; Revised: 19 August 2020; Accepted: 21 September 2020
(DOI): 10.22034/aej.2021.137386

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی ماهیان زینتی بومی آفانیوس زاگرس (*Aphanius vladykovi*) و آفانیوس گنو (*Aphanius ginaonis*) با استفاده از ژن سیتوکرم اکسیداز در ایران

رضا نهاوندی*[1]، سعید تمدنی‌جهرمی[2]، فروغ بیاتی[1]، سجاد پورمظفر[3]، محسن گذری[2]

[1] موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[2] پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

[3] ایستگاه تحقیقاتی نرم‌تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان ،موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران

کلمات کلیدی

آفانیوس زاگرس
Aphanius vladykovi
آفانیوس گنو
Aphanius ginaonis
ژن سیتوکرم اکسیداز
توالی‌یابی

چکیده

مقدمه: این تحقیق با هدف شناسایی مولکولی و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز دو گونه از ماهیان زینتی بومی ایران به‌نام‌های آفانیوس زاگرس (*Aphanius vladykovi*) و آفانیوس گنو(*Aphanius ginaonis*) انجام گردید.

مواد و روش‌ها: تعداد پنج نمونه از هرگونه ماهیان موردنظر از مناطق، پارک سرچشمه (شهر الونی، استان چهارمحال و بختیاری) و چشمه گنو (بندرعباس) جمع‌آوری گردید و پس از شناسایی از نظر مرفولوژیک و استخراج DNA، توالی‌یابی گردیدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. آنالیز درخت تکاملی به‌روش نزدیک‌ترین هم‌جواری و پارسیمونی براساس مدل Kimura 2-parameter با استفاده از نرم‌افزار مگا انجام گردید.

نتایج: نتایج نشان داد این گونه‌ها در نواحی مختلف استان فارس (*A. vladykovi*) و کشور ترکیه از لحاظ ژنتیکی به‌هم نزدیک بوده و یک کلاید را با دو خوشه خواهری در کنار گونه‌های متعلق به عرض‌های شمالی‌تر از کشور ترکیه مانند: *Aphanius anatoliae*، *Aphanius sureyanus*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius iconii* تشکیل می‌دهند. بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی در بین نمونه‌های آفانیوس زاگرس از چشمه پارک سرچشمه و آفانیوس سوریانوس از کشور ترکیه قابل مشاهده است که با توجه به شکاف عمیق جغرافیایی بین مناطق یاد شده دور از انتظار نبود. درضمن گونه آفانیوس گنو در یک کلاید جداگانه با فاصله ژنتیکی زیاد خود را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری و بحث: عوامل مختلف زمین‌شناختی باعث شد که ماهی گنو با اختلاف زیاد خود را از دیگر گونه مورد مطالعه جدا و در منطقه هرمزگان مستور نماید. درنتیجه جریان ژنی بین این منطقه و دیگر مناطق متوقف شده و باعث گردید که ماهی آفانیوس‌گینونیس به‌صورت یک گونه منحصر به‌فرد باقی بماند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rezanahavandi91@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲۳ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ٦ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۹ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۳۱ شهریور ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.137386

مقدمه

آفانیوس‌ها، ماهیان با ارزش زیستی بالا هستند که در مبارزه با بیماری مالاریا (با خوردن لارو پشه آنوفل) نقش دارند و از لحاظ ظاهری برای اهداف زینتی به‌کار می‌روند. ماهیان گورخری، تنها جنس خانواده کپور ماهیان دندان‌دار، (Coad، ۱۹۸۰) شامل یوری هالین (Euryhaline) و یوری ترم (Eurytherm) در ایران هستند. این ماهیان به کمبود اکسیژن مقاوم هستند، اما آب‌های خنثی و پر اکسیژن را ترجیح می‌دهند و هم‌چنین آلودگی موادآلی و غیرآلی و نیز سطوح کم اکسیژن آب را تحمل می‌کنند (Frenkel و Goren، 2000). حوضه‌های پراکنش گونه‌های آفانیوس در ایران مربوط به حوضه‌های مرکزی و جنوبی کشور ازجمله حوضه‌های آبریز مرکزی، آبریز نی ریز، آبریز خلیج‌فارس، آبریز اصفهان و آبریز کویر نمک می‌باشند. بنابراین پراکنش آن‌ها محدود به نواحی مرکزی، جنوب و جنوب‌غرب ایران می‌باشد. این نوع پراکنش گونه‌های آفانیوس، بیانگر ارتباط زمین‌شناسی حوضه‌های مختلف با یکدیگر در زمان‌های گذشته است و از سوی دیگر، جدایی حوضه‌ها ممکن است تبادل ژنی بین جمعیت‌ها را محدود نموده و باعث ایجاد تفاوت‌های بین جمعیتی گردد و بدین گونه تاریخچه تکاملی این گونه‌ها را به‌وجود آورده باشد. لذا مطالعه پراکنش این گونه ماهیان در بررسی ارزیابی و حفاظت ذخایر آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های موجود در جنس آفانیوس، دارای توانایی قابل توجهی در تحمل شرایط محیطی حداکثر یا بی‌ثبات هستند (Reichenbacher و همکاران، ۲۰۰۹). دامنه بردباری آن‌ها به دما و شوری بالا است و هم‌چنین آلودگی مواد آلی و غیرآلی و نیز سطوح کم اکسیژن آب را تحمل می‌کنند (Frenkel و Goren، ۲۰۰۰). اغلب در محیط‌های با شوری بالا که گونه‌های دیگر ماهی، توانایی زیست ندارند، یافت می‌شوند (Leonardoes و Sini، ۱۹۹۸؛ Al-Daham و همکاران، ۱۹۹۷). ماهی کپور دندانی زاگرس با نام علمی *Aphanius Vladykovi*، بومی ایران بوده و برای اولین بار توسط Coad (۱۹۸۸) شناسایی و گزارش گردید. این ماهی متعلق به خانواده Cyprinodontidae می‌باشد. گرچه این خانواده دارای ۹ جنس و بیش از ۱۰۰ گونه است، ولی تاکنون در ایران فقط هفت گونه از این خانواده شناسایی شده‌اند که همگی متعلق به جنس *Aphanius* هستند. این ماهی با توجه به وضعیت فنوتیپی دو جنس نر و ماده آن، پتانسیل معرفی شدن به صنعت ماهیان زینتی را نیز دارد. این ماهی، گونه بومزاد استان چهار محال و بختیاری، یک گونه بومی از هفت گونه ماهیان جنس آفانیوس، در ایران است و تنها در زیستگاه‌های آبی و رودخانه‌های این استان زندگی می‌کند (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۸؛ Coad، ۱۹۸۸). ماهی گورخری چهارمحال و بختیاری، از ماهیان بومی گورخری، یک گونه بومی آب‌های داخلی ایران است. جمعیت این ماهی بومی با ارزش در حال حاضر تحت تاثیر آسیب‌های وارده به زیستگاه‌های آن‌ها ازجمله شکار توسط قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی فرار کرده از استخرها قرار دارد و هم‌چنین کاهش آب‌ها با توجه به برداشت آب و خشکسالی، جمعیت آن‌ها را در زیستگاه‌ها با تلفات زیادی روبرو کرده است. ماهی آفانیوس منطقه گنو، ازجمله گونه‌های منحصر به‌فردی از ماهیان است که توانسته است شرایط استرس حرارتی چشمه‌های آب گرم را تحمل نموده و نسبت به آن سازگار شود. علت گرمای این چشمه، به درجه زمین گرمایی محلی مربوط می‌شود. درجه حرارت این چشمه به‌طور ثابت بین ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و اکسیژن محلول آن زیر ۱/۳ میلی‌گرم در لیتر است. نکته جالب توجه آن است که تنها گونه ماهی ساکن در این چشمه، این گونه است که توانسته نسبت به شرایط استرس حرارتی و کمبود اکسیژن این اکوسیستم آبی سازگار شود. کپور دندانی گنو (*Aphanius ginaonis*)، در جهان فقط منحصر به چشمه آب گرم گنو، واقع در استان هرمزگان است. این ماهی متعلق به راسته کپور دندان شکلان و خانواده کپور دندان ماهیان است. متاسفانه بر روی جمعیت‌های ایرانی آفانیوس، بسیار کم کار شده است (Hrbek و همکاران، ۲۰۰۶). ماهی آفانیوس معمولاً در همه زیستگاه‌های آب‌شیرین حضور دارد، زیستگاه‌هایی که گستره متفاوتی از جریان، شیمی آب، دما و جنس بستر دارند (Al- Daham و همکاران، ۱۹۹۷). شایان ذکر است که تنوع بالایی از گونه‌های آفانیوس از ترکیه تا ایران نشان داده شده‌است (Hrbek و Meyer، ۲۰۰۳). ژن DNA میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک به‌عنوان یک بارکد در تشخیص گونه‌ای بسیاری از ماهیان، ازجمله ماهیان دریایی استرالیایی، ماهیان آب شیرین کانادا و ماهیان زینتی آمریکای شمالی موثر و کارا بوده است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳a)، استفاده از این ژن را به‌عنوان یک سامانه تشخیص زیستی جانوری معرفی کردند. تشخیص دقیق و بدون ابهام ماهیان و محصولات آن‌ها، از تخم تا ماهی بالغ به مدیریت پایدار ذخایر شیلاتی و بهبود حفاظت از بوم‌سازگان کمک خواهد کرد (نوروزی و زاهدی‌پور، ۱۳۹۵). لذا تکنیک بارکدگذاری DNA می‌تواند در تشخیص دقیق گونه‌های ماهیان موثر باشد (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳a). این تحقیق با هدف شناسایی ملکولی با استفاده از قسمتی از ژن سیتوکرم اکسیداز از دو گونه از ماهیان زینتی بومی ایران به نام‌های آفانیوس زاگرس (*Aphanius vladykovi*) و آفانیوس گنو (*Aphanius ginaonis*) انجام شد.

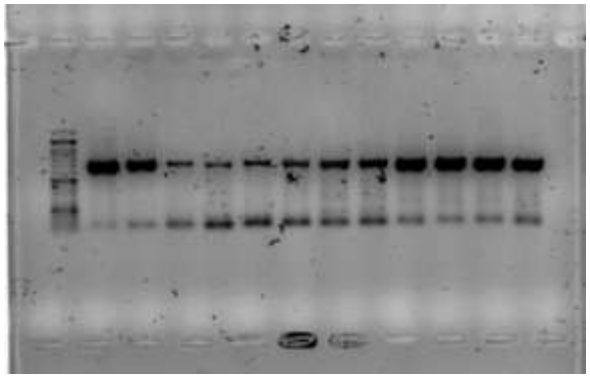
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری‌ها از مناطق هدف و مورد نظر که اصلی‌ترین و مهم‌ترین زیستگاه‌های منحصر به‌فرد دو گونه مورد مطالعه در این تحقیق در ایران می‌باشد، انجام گرفت. نمونه‌های ماهی گورخری گنو (*Aphanius ginaonis*) از چشمه آب گرم گنو (در ۹۳ کیلومتری

شهر بندرعباس در استان هرمزگان، واقع در دامنه شرقی کوه گنو که در ارتفاع ۷۳۱ متری از سطح دریا واقع است) و نیز نمونه‌های ماهی (*Aphanius vladykovi*) از چشمه پارک در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از تور دستی صید شدند و از هریک از نمونه‌ها طبق روش استاندارد، حداقل پنج قطعه از باله‌های شنا از هر دو گونه مورد مطالعه (Zhang و Hanne، ۲۰۱۱) جهت انجام آزمایشات مولکولی بر روی ژن مشترک سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک با هدف تشخیص دقیق گونه‌ها و تهیه خط شناسه ژنتیکی، برداشته شد و پس از تثبیت در الکل ۹۶ درصد به آزمایشگاه منتقل گردید (شکل ۱).

شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری در این تحقیق

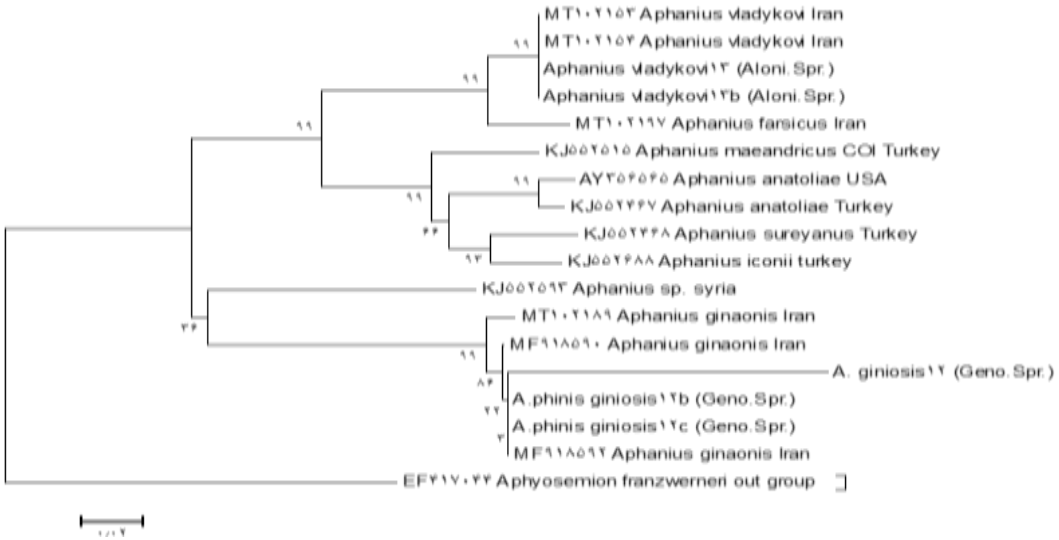
استخراج DNA: استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از باله شنای گونه‌های مورد مطالعه باموفقیت کامل انجام گردید. برای استخراج ژنوم کل (DNA total) روش‌های گوناگون وجود دارد که در این تحقیق از روش فنل-کلروفرم استفاده گردید (Taggart و همکاران، ۱۹۹۰). جهت انجام PCR در حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج‌شده در یک واکنش به‌میزان ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۰/۶ ماکرولیتر از آغازگرهای ForwardFISH1F: 5’TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3’ و Reverse FISH1R: 5’TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3’، ۲۵ میلی‌مولار MgCl2، ۱۰ میلی‌مولار dNTP (Promega USA)، 5X PCR buffer (Promega) و ۵ واحد از Taq DNA polymerase (Promega) استفاده گردید. جهت بهینه کردن عملیات PCR، در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال (Annealing Temperature) هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به‌دست آمد و در مرحله بعد، جهت اخذ بهترین و شفاف‌ترین باندها و حذف باندهای ناخواسته، اقدام به بهینه کردن محصول PCR از طریق تغییر غلظت‌های MgCl2، DNA ژنومی و dNTP گردید. سیکل حرارتی مورد استفاده در دستگاه PCR شامل سیکل اولیه ۹۴ درجه به‌مدت ۴/۳۰ دقیقه، به‌دنبال آن ۴۰ سیکل شامل دماهای واسرشته سازی (Denaturation) ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) به‌مدت ۴۵ ثانیه در دماهای اختصاصی آغازگر که در این مطالعه برای اکثر گونه‌ها ۵۶ درجه بود، بسط و تکثیر (Extension) ۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه و در آخر دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به‌مدت پنج دقیقه قرار گرفت (شکل ۲). تصاویر از طریق دستگاه مستند ساز ژل (شرکت Vilber Lourmant) با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Photo capture انجام گردید. پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و ابزار Blast در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. به‌منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم افزار Clustal W هم‌ردیف شدند (Thompson، ۱۹۹۷). درخت تکاملی به‌روش نزدیک‌ترین همجواری (Neighbor-Joining) براساس مدل Kimura 2-parameter، (Kimura، ۱۹۸۰) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 رسم گردید.



شکل ۲: الگوی باندی محصول PCR ژن COI روی ژل آگارز دو درصد

نتایج

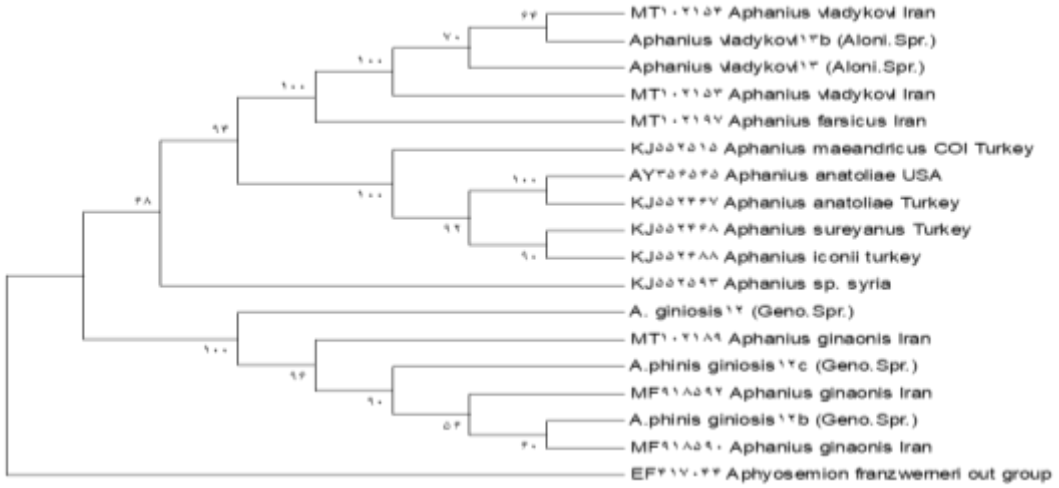
نتایج به‌دست آمده، نشان داد که آغازگرهای اختصاصی (Fish F & R 1) در جهت خط شناسه ژنتیکی گونه‌های مورد بحث موفق عمل نمودند و در حدود ۶۰۰ جفت باز را برای گونه‌های مورد بررسی ایجاد نمودند. مقایسه توالی نوکلئوتیدها (BLAST) نشان داد که گونه مورد بررسی در استان چهارمحال و بختیاری (*A. vladykovi*) و کشور ترکیه از لحاظ ژنتیکی به‌هم نزدیک و در یک کلاید با دو خوشه خواهری در کنار گونه‌های متعلق به عرض‌های شمالی‌تر از کشور ترکیه مانند: *Aphanius anatoliae*، *Aphanius sureyanus*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius iconii* تشکیل می‌دهند. در این مطالعه بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی در بین نمونه‌های مطالعه شده *A. vladykov* و *Aphanius ginaonis* به‌میزان ۲۲ درصد به‌دست آمد که نشان از تفرق ژنتیکی بالا با توجه به اشتقاق جغرافیایی می‌باشد. (شکل۳) (جدول ۱).



شکل ۳: درخت تکاملی ژن COI دو گونه از ماهیان آب گرم در مقایسه با دیگر گونه‌ها و مناطق دیگر به‌روش Neighbor-Joining

جدول ۱: در صد فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مختلف ماهیان آب گرم در این تحقیق

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. MT102153 Aphanius vladykovi Iran																		
2. MT102154 Aphanius vladykovi Iran	0.00																	
3. KJ552593 Aphanius sp. syria	0.20	0.20																
4. AY356565 Aphanius anatoliae USA	0.17	0.17	0.22															
5. MT102189 Aphanius ginaonis Iran	0.22	0.22	0.19	0.23														
6. A. giniosis12 (Geno.Spr.)	0.33	0.33	0.27	0.34	0.11													
7. Aphanius vladykovi13 (Aloni.Spr.)	0.00	0.00	0.20	0.17	0.22	0.33												
8. Aphanius vladykovi13b (Aloni.Spr.)	0.00	0.00	0.20	0.17	0.22	0.33	0.00											
9. A.phinis giniosis12b (Geno.Spr.)	0.22	0.22	0.19	0.22	0.02	0.11	0.22	0.22										
10. A.phinis giniosis12c (Geno.Spr.)	0.22	0.22	0.19	0.22	0.02	0.11	0.22	0.22	0.00									
11. KJ552515 Aphanius maeandricus COI Turkey	0.14	0.14	0.22	0.08	0.22	0.33	0.14	0.14	0.22	0.22								
12. MT102197 Aphanius farsicus Iran	0.04	0.04	0.21	0.18	0.24	0.34	0.04	0.04	0.23	0.23	0.14							
13. KJ552468 Aphanius sureyanus Turkey	0.15	0.15	0.23	0.08	0.24	0.35	0.15	0.15	0.23	0.23	0.08	0.16						
14. KJ552467 Aphanius anatoliae Turkey	0.15	0.15	0.22	0.02	0.23	0.33	0.15	0.15	0.22	0.22	0.09	0.17	0.08					
15. MF918592 Aphanius ginaonis Iran	0.22	0.22	0.19	0.22	0.02	0.11	0.22	0.22	0.00	0.00	0.22	0.23	0.23	0.22				
16. MF918590 Aphanius ginaonis Iran	0.21	0.21	0.19	0.22	0.02	0.11	0.21	0.21	0.00	0.00	0.22	0.23	0.23	0.22	0.00			
17. KJ552688 Aphanius iconii turkey	0.15	0.15	0.23	0.08	0.22	0.34	0.15	0.15	0.23	0.23	0.07	0.16	0.05	0.08	0.23	0.22		
18. EF417044 Aphyosemion franzwerneri out group	0.31	0.31	0.29	0.31	0.29	0.37	0.31	0.31	0.30	0.30	0.30	0.29	0.31	0.32	0.30	0.30	0.30	



شکل ۴: درخت تکاملی ژن COI دو گونه از ماهیان آب گرم در مقایسه با دیگر گونه‌ها و مناطق دیگر به‌روش maximum parsimoney

بحث

رویکردهای سنتی در ارتباط با شناسایی گونه‌ها با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک نمی‌تواند جدایی گونه‌ها و زیر گونه‌ها و تنوع ژنتیکی که در اثر کاهش جریان ژن رخ می‌دهد، را به‌درستی آشکار نماید (هوشیار و همکاران، ۱۳۹۶). بنابراین مطالعات شجره‌شناسی و تفریق گونه‌ها امروزه بیش‌تر بر پایه یافتن تنوع ژنتیکی و جهش‌های احتمالی است (Behrens-Chapuis و همکاران، ۲۰۱۵). لذا در این مطالعه به شناسایی دو گونه مهم از ماهیان آب گرم ایران از جنبه‌های شجره‌شناسی با استفاده از روش بارکدینگ با آغازگرهای اختصاصی پرداخته شد. هم‌ردیفی و مقایسه این توالی‌ها با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) و رسم درخت تبارزایی (Phylogeny) به‌روش‌های Neighbor-Joining و Parsimoney نشان داد که گونه موردبررسی (*A. vladykovi*) جدا شده ازناحیه چشمه پارک سرچشمه استان جهارمحال و بختیاری و کشور ترکیه از لحاظ ژنتیکی به‌هم نزدیک و در یک کلاید با دو خوشه خواهری در کنار گونه‌های متعلق به عرض‌های شمالی‌تر از کشور ترکیه مانند: *Aphanius anatoliae*، *Aphanius sureyanus*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius iconii* تشکیل می‌دهند که بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی در بین نمونه‌های *A. vladykov* در ایران و *Aphanius anatoliae* به‌میزان ۱۷ درصد قابل مشاهده است (جدول ۱، شکل‌های ۳ و ۴). در همین میان بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی در بین نمونه‌های مطالعه شده *A. vladykov* و *Aphanius ginaonis* به‌میزان ۲۲ درصد به‌دست آمد که با توجه به میانگین ثبت شده (۱۷ درصد) قابل توجه می‌باشد. ثابت شده است که در طبقه‌بندی براساس خواص مورفولوژیک حضور سه جنس مجزا در خانواده Aphaniidae با فاصله ژنتیکی قابل توجه تأیید شده است (Reichenbacher و همکاران، ۲۰۰۹). متوسط فاصله ژنتیکی در بین جمعیت‌ها و زیرگونه‌های این خانواده به‌ترتیب ۰/۰۱۳۷٪ و ۰/۱۷۱٪ است و در بین جنس‌ها ، این مقدار از ۷/۷۰٪ تا ۳۰/۵۰٪ (میانگین ۲۳/۲۳٪) و در درون خانواده از ۱۷٪ تا ۳۱٪ (میانگین ۲۵٪) است (Reichenbacher و همکاران، ۲۰۰۹). جنس *Aphanius* شامل کلیه کپورهای دندانی داخلی است که عمدتاً در آب‌های داخلی ترکیه و ایران و هم‌چنین در محیط‌های مربوط به‌داخل حوضه مدیترانه پراکنده هستند (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۸). در تحقیقی که توسط Herbek و همکاران (۲۰۰۲) در کشور ترکیه بر روی ارتباط فایلوژنی گونه آفانیوس در آناتولی مرکزی (ترکیه) انجام گرفت، نشان داده شد که گونه آفانیوس علی‌رغم مشابهت ظاهری گونه‌ها طی دوران پلئوستوسن اولیه، دستخوش تغییرات گونه‌زایی جغرافیایی شده‌اند. لازم به ذکر است که در این تحقیق تعداد ۳۶ جمعیت از سه گونه آفانیوس مورد بررسی قرار گرفته بودند (Dunham، ۱۹۹۷). این امر مسلم است که با افزایش فاصله جغرافیایی، فاصله ژنتیکی افزایش می‌یابد که علت آن کاهش جریان ژنی در اثر وجود موانع فیزیکی و یا طبیعی می‌باشد (Beacham و همکاران، ۲۰۰۴). اصولاً اختلاف ژنتیکی بین گونه‌ها در نتیجه مهاجرت افراد به یک منطقه خاص و به‌واسطه آمیزش درون جمعیتی یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌شود (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷). بنابر این، به‌منظور جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی و نیز بالا نگه داشتن تنوع و تعداد آلل ها در هر جمعیت می‌توان مدیریت متفاوتی با توجه به نوع جمعیت و میزان مهاجرت اعمال گردد (Kimura،۱۹۸۰). در این مطالعه گونه منحصر به‌فرد آفانیوس گینونیس خود را به‌صورت گونه‌ای مجزا در کلاید جداگانه با اختلاف ژنتیکی بالا (۲۲٪) خود را از گونه *vladykovi* جدا می‌کند که با توجه به فاصله جغرافیایی زیاد دور از انتظار نبود. مطالعات ریخت شناسی (مورفومتریک) و ژنتیکی سال‌های اخیر مشخص نموده است که ماهی گورخری گنو منحصراً در چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان وجود دارد و تنها گونه بومی این منطقه است (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۸). در این تحقیق در کل تنوع هاپلوتایپی در درون گونه‌های مورد بررسی با توجه به اختلاف جغرافیایی بین مناطق مختلف منطقه مورد بررسی بسیار پایین بود. این موضوع می‌تواند نشان دهنده تعلق احتمالی آن‌ها به یک جمعیت و انتقال مرحله به مرحله آن‌ها از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد (Behrens-Chapuis، ۲۰۱۵)، اگر چه سلیمی و همکاران (۱۳۷۹) در ارتباط با مطالعه تنوع ژنتیکی گونه ماهی گورخری آفانیوس گینونیس با استفاده از روش PCR-RFLP تنوع بالاتری را نسبت به روش‌های دیگر به‌دست آوردند. از سوی دیگر،عدم مشاهده تنوع هاپلوتایپی در این مطالعه نیز می‌تواند به‌دلیل کوچک بودن اندازه جمعیت‌های ماهیان مورد مطالعه باشد. به‌طور کلی می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که شناسایی تکامل گونه های مورد مطالعه بعلت جدایی‌های جغرافیایی، در کنار مطالعات مولکولی می‌تواند چشم‌انداز واضحی از ذخائرگونه‌های حد واسط یا جدید را ارائه نماید. براساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود که مدیریت ذخایر گونه‌های مورد بررسی باید بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد و آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها و نیز خط شناسه‌گذاری گونه‌های مهم و بومی منطقه در جهت حفاظت از ذخایر گونه‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در همین ارتباط آگاهی از ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف ماهیان آب گرم از جنس آفانیوس در ایران به‌خصوص آفانیوس گینونیس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های هدف در استان هرمزگان در راستای شناسایی و ارتباط قرابت ژنتیکی آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

۱. **سلیمی، ع.؛ ذوالقرنین، ح. و ارچنگی، ب.، ۱۳۷۹.** تعیین تنوع ژنتیکی گونه بومی و نادر آب‌های داخلی ایران، ماهی گورخری گنو *Aphanius ginaonis* با استفاده از مارکر مولکولی PCR-RFLP. مجله زیست شناسی جانوری تجربی. سال ۶، شماره ۴، پیاپی ۲۴، صفحات ۳۵ تا ۴۰.

۲. **نوروزی، م. و زاهدی‌پور، م.، ۱۳۹۵.** تنوع و تمایز ژنتیکی ماهی شیر *(Scomberomorus commerson)* در سواحل شمالی خلیج فارس و دریای عمان با روش مولکولی ریز ماهواره. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۸، شماره ۲، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۴.

۳. **هوشیار، ف.؛ رضایی، ح.؛ سیف‌علی، م. و رضایی، س.، ۱۳۹۶.** تبارشناسی و مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه *(Alburnoides eichwaldi* De Filippi1986) براساس ژن سیتوکروم b در پنج رودخانه از حوزه شمالی ایران. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۹، شماره ۳، صفحات ۲۹۱ تا ۳۰۴.

4. **Al-Daham, N.K.; Huq, M.F. and Sharma, K.P., 1977.** Notes on the ecology of fishes of genus *Aphanius* and *Gambusia affinis* in Southern Iraq. Fresh water Biology. Vol .7, pp: 45-251.

5. **Beacham, T.D.; Lapointe, M.; Candy, J.R.; McIntosh, B.; MacConnachie, C.; Tabata, A.; Kaukinen, K.; Deng, L.; Miller, K.M. and Withler, R.E., 2004.** Stock identification of Fraser River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) using microsatellites and major histocompatibility complex variation. Transactions of the American Fisheries Society. Vol. 133, pp: 1106-1126.

6. **Behrens-Chapuis, S.; Herder, F.; Esmaeili, H.R.; Freyhof, J.; Hamidan, N.A. and O¨ zuluğ, M., 2015.** Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies–can this marker help to explain conflicts in cyprinids. Vol. 3, pp: 187-199.

7. **Coad, B.W., 1980.** A re-description of *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) from southern Iran (Osteichthyes: Cyprinodontiformes). J. Nat. Hist. Vol. 14, pp: 33-40.

8. **Dunham, J.B. and Minckley, W.L., 1997.** Allozymic variation in desert pupfish from natural and artificial habitats: genetic conservation in fluctuating populations. Molecular Phylogenetic and Evolution. Vol. 84, pp: 7-15.

9. **Esmaeili, H.R.; Ebrahimi, M. and Saifali, M., 2008.** Karyological analysis of five tooth-carps Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran. Micron. Vol. 39, pp: 95-100.

10. **Frenkel, V. and Goren, M., 2000.** Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. Aquaculture. Vol. 091, pp: 022-012.

11. **Herbek, T.; Küçük, F.; Frickey, T.; Stölting, K.N.; Wildekamp, R.H. and Meyer, A., 2002.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 25, pp: 125-137.

12. **Hrbek, T. and Meyer, A., 2003.** Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of Eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). Journal of Evolutionary Biology. Vol. 16, No. 1, pp: 17-36.

13. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and DeWaard, J.R., 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. Vol. 270, pp: 313-321.

14. **Hrbek, T.; Keivany, Y. and Coad, B.W., 2006.** New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan province of Iran and a reanalysis of other Iranian species. Copeia. Vol. 2, pp: 244-255.

15. **Herbek, T.; Küçük, F.; Frickey, T.; Stölting, K.N.; Wildekamp, R.H. and Meyer, A., 2002.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 25, pp: 125-137.

16. **Kimura, M., 1980**. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. Vol. 16, pp: 111-120.

17. **Leonardoes, I. and Sinis, A., 1998.** Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1998 (Pisces: Ciprinodontidae) in the Mezolongy and Etolikon lagoons (W. Greece Fisheries research. Vol. 35 pp: 171-181.

18. **Pinera, J.A.; Blanco, G.; Vázquez, E. and Sánchez, J.A., 2007.** Genetic diversity of black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations Spanish Coasts: a preliminary study. Marine Biology. Vol. 151, pp: 2153-2158.

19. **Reichenbacher, B.; Kamrani, E.; Esmaeili, H.R. and Teimori, A., 2009.** The endangered cyprinodont *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) from southern Iran is a valid species: evidence from otolith morphology. Environmental Biology of Fishes. Vol. 86, No. 4, pp: 507-521.

20. **Taggart, J.B.; McNally, S.F. and Sharp, P.M., 1990.** Genetic variability and differentiation among founder population of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. Heredity. Vol. 64, pp: 177-183.

21. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Vol. 22, pp: 4673-4680.

22. **Zhang, J.B, and Hanne, R., 2011.** DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. Biotechnology Systematics and Ecology. Vol. 39, No. 1, pp: 31-42.