13 (3) 247-252, Autumn 2021

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

Original Research Paper

Sequencing of the cytochrome oxidase gene in DNA Barcoding of *Aphanius dispar* and *Aphanius sophiae* isolated from warm waters in Iran

***Reza Nahavandi* [*1], *Saeid Tamadoni Jahromi* [2], *Sayyed Kamaleddin Allameh* [3], *Forough Bayati* [1]**

[1] *Iranian Animal Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Karaj, Iran*
[2] *Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran*
[3] *Animal Science Research Department, Agricultural Research and Education Center and Natural Resources of Isfahan Province, Iranian Animal Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Isfahan, Iran*

Key Words
DNA barcoding
Aphanius dispar
Aphanius sophiae
Sequencing

Abstract

Introduction: This research was performed in order to determine of DNA Barcoding of *Aphanius dispar* and *Aphanius sophiae* isolated from warm waters in Iran.

Materials & Methods: Samples of the desired fish were collected from Kolo areas (Ashkanan city of Fars province), Gomban spring (Arsanjan city).

Result: Molecular study using COI primers for DNA Barcoding of the studied species showed that *A. sophiae*, isolated from Gomban spring are genetically very close to *Aphanius anatoliae*, *Aphanius maeandricus* and *Aphanius sureyanus* from Turkey, which have shown themselves as separate clusters. However, the *dispar* species, with a genetic difference of about seven percent, has separated itself from this species and, together with the *sophiae* species, has created a sister cluster in the same keyboard. At the same time, the two species in question, with a much higher difference than the *fasciatus* and *stiassnyae* species in Portugal and Italy, are distinct as a separate clade. The highest genetic difference between the *fasciatus* and *sophiae* species was observed in 21% of Germany, which is very significant, was not unexpected due to the deep geographical gap between the mentioned areas.

Conclusion: The use of primers used in this research can be effective in identifying genetic diversity, barcoding and the relationship of genetic origin of the target species.

* Corresponding Author's email: rezanahavandi91@gmail.com
Received: 1 May 2020; Reviewed: 6 June 2020; Revised: 6 August 2020; Accepted: 13 September 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.236637.2289

مقاله پژوهشی

توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز در خط شناسه ژنتیکی ماهیان گورخری (*Aphanius dispar*) و آفانیوس سوفیه (*Aphanius sophiae*) جدا شده از آب‌های گرم در ایران

رضا نهاوندی*[1]، سعید تمدنی‌جهرمی[2]، سیدکمال‌الدین علامه[3]، فروغ بیاتی[1]

[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] بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

کلمات کلیدی

خط شناسه‌گذاری DNA
آفانیوس گورخری
Aphanius dispar
آفانیوس سوفیه
Aphanius sophiae
توالی‌یابی

چکیده

مقدمه: این تحقیق با هدف تعیین خط شناسه ژنتیکی ماهیان گورخری (*Aphanius dispar*)، آفانیوس سوفیه (*Aphanius sophiae*) جدا شده از آب‌های گرم در ایران انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های ماهیان مورد نظر از مناطق کولو (شهر اشکنان استان فارس)، چشمه گمبان (شهرستان ارسنجان)، جمع‌آوری شدند.

نتایج: بررسی مولکولی با استفاده از آغازگرهای COI جهت خط شناسه ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه نشان داد که گونه *A. sophiae* جدا شده از چشمه گمبان از لحاظ ژنتیکی بسیار نزدیک به گونه *Aphanius anatoliae*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius sureyanus* از کشور ترکیه می‌باشد که خود را به‌صورت کلاستر جداگانه نشان دادند. اگرچه گونه *dispar* نیز با اختلاف ژنتیکی نزدیک به هفت درصد خود را از این گونه جدا و همراه با گونه *sophiae* یک کلاستر خواهری را در همین کلاید ایجاد کرده است. در همین حال دو گونه مورد بحث با اختلاف بسیار بالاتری نسبت به گونه‌های *fasciatus* و *stiassnyae* از کشورهای پرتقال و ایتالیا به‌صورت یک کلاید جداگانه قابل توجه می‌باشد. بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی بین گونه *fasciatus* و *sophiae* به‌میزان ۲۱ درصد از کشور آلمان مشاهده گردید و بسیار قابل توجه می‌باشد که با توجه به شکاف عمیق جغرافیایی بین مناطق یاد شده دور از انتظار نبود.

نتیجه‌گیری و بحث: استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند در شناسایی تنوع ژنتیکی، بارکدینگ و ارتباط منشا ژنتیکی گونه‌های هدف موثر باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rezanahavandi91@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۲ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۷ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۶ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ شهریور ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.236637.2289

مقدمه

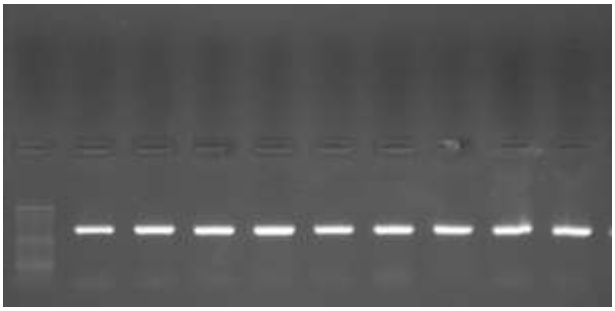
خانواده کپورماهیان دندان‌دار از معمول‌ترین ماهیان آب‌های داخلی ایران است. مطالعات محدودی بر روی ماهیان این خانواده در زیستگاه‌های مختلف انجام شده است. WildeKamp و همکاران (۱۹۹۹) بیان کرده‌اند که شاخص‌های ریخت‌شناسی اصلی به‌کار رفته در طبقه‌بندی آفانیوس نظیر رنگ‌آمیزی، استخوان‌شناسی و ریخت‌شناسی دندان مخروطی، طبقه‌بندی‌های ناپایداری هستند. بنابراین استفاده از آن‌ها در طبقه‌بندی و سیستماتیک محدود شده است (Bardakci و همکاران، ۲۰۰۴). 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 و اغلب در محیط‌های با شوری بالا که گونه‌های دیگر ماهی، توانایی زیست ندارند، یافت می‌شوند (Leonardoes و Sinis، ۱۹۹۸؛ Al-Daham و همکاران، ۱۹۹۷). اصول مطالعه کپورماهیان دندان‌دار در ایران براساس ریخت‌شناسی است و به‌دلیل آن‌که این روش، دارای معایبی می‌باشد، لذا شناسایی این ماهیان را مشکل ساخته است (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۸). پس به‌کارگیری روش‌های دیگر مانند: مطالعات مولکولی، اکولوژیک و تکوینی ممکن است در شناخت هرچه بهتر این گروه پیچیده از ماهیان موثر باشد (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۷). روش‌های اصلی به‌کار رفته برای مطالعه گونه‌های آفانیوس، شامل: آزمایشات نژاد آمیزی، تجزیه و تحلیل ژنتیکی، آنالیز مقایسه‌ای از صفات شمارشی، استخوان‌شناسی و رنگ‌آمیزی است (Reichenbacher و همکاران، ۲۰۰۹). خصوصیات ریخت‌شناسی، به‌خصوص در مکان‌هایی که تاثیرات محیطی نسبت به تمایز ژنتیکی نقش مهم‌تری در تفاوت جمعیت‌ها دارد، بسیار حائز اهمیت است. جدایی جغرافیایی جمعیت‌ها و تولیدمثل می‌تواند به تغییرات مرفومتریک بین جمعیت‌ها منجر شود و این تنوع مرفومتریک می‌تواند به‌عنوان اساس تمایز جمعیت‌ها عنوان شود. حوضه‌های پراکنش گونه‌های آفانیوس در ایران مربوط به حوضه‌های مرکزی و جنوبی کشور از جمله حوضه آبریز مرکزی، حوضه آبریز نی‌ریز، حوزه آبریز خلیج فارس، حوضه آبریز اصفهان و حوضه 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 بوده و از سوی دیگر، جدایی حوضه‌ها ممکن است تبادل ژنی بین جمعیت‌ها را محدود نموده و باعث ایجاد تفاوت‌های بین جمعیتی شده است و تاریخچه تکاملی این گونه‌ها را به‌وجود آورده است. 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). آگاهی از حوضه آبریز و محل جمع‌آوری نمونه‌های کپورماهیان دندان‌دار و نیز الگوی رنگ‌آمیزی آن‌ها از مهم‌ترین اطلاعات عملی برای شناسایی سریع گونه‌های آفانیوس است (اسماعیلی و غلامی، ۱۳۸۶). متاسفانه بر روی جمعیت‌های ایرانی آفانیوس، بسیار کم کار شده است (Hrbek و همکاران، ۲۰۰۶). 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. تنوع بالایی از گونه‌های آفانیوس از ترکیه تا ایران نشان داده شده است (Hrbek و همکاران، ۲۰۰۶). ماهی *Aphanius dispar* همه‌چیزخوار است و از سخت‌پوستان، لارو پشه و جلبک‌های رشته‌ای تغذیه می‌کنند (Frenkel و Goren، ۲۰۰۰). در حالی‌که محتویات روده در یک جمعیت وحشی *A. dispar* نشان داده است که این ماهی با چریدن با بیش از ۹۰٪ روی جلبک‌های تک‌سلولی تغذیه می‌کند. هرچند این ماهی قادر است در برابر یک دوره طولانی از گرسنگی مقاومت کند (Frenkel و Goren، ۲۰۰۰). ماهی گورخری آفانیوس صوفیا، متعلق به خانواده کپورماهیان دندان‌دار و از راسته کپور دندان‌ماهی‌شکلان است (عبدلی، ۱۳۷۸). این جنس تقریباً دارای ۱۶ گونه و پراکنش آن‌ها در سواحل دریای باستانی تتیس شامل آب‌های ساحلی و آب‌های داخلی حوضه مدیترانه و دریای سرخ، خلیج فارس (ایران) و پاکستان است (Hrbek و همکاران، ۲۰۰۲؛ Blanco و همکاران، ۲۰۰۶). در گذشته تصور می‌شد بیش‌ترین تنوع گونه‌ای در خاور نزدیک به‌خصوص آناتولی باشد (Blanco و همکاران، ۲۰۰۶). اما مطالعات اخیر نشان داد که در ایران نیز تنوع گونه‌های این جنس زیاد است (Blanco و همکاران، ۲۰۰۶؛ Coad، ۲۰۰۶). کاربرد روش‌های غیرمرفولوژیک هم‌چون مطالعات مولکولی در سال‌های اخیر، منبعی از داده‌های مکمل برای دقت بیش‌تر و شناسایی دقیق این ماهی ایجاد کرده است (Esmaeili و همکاران، ۲۰۰۸؛ Galetti و همکاران، ۲۰۰۰). 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. در میان نشانگرهای مولکولی، ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی، یکی از معتبرترین نشانگرها برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر می‌باشد (هوشیار و همکاران، ۱۳۹۶). با استفاده از تکنیک توالی‌یابی ژن می‌توان پلی‌مورفیسم را در افراد بسیار شبیه به‌هم آشکار

کرد و تا حدی از آن در سطح بین گونه‌ای استفاده می‌شود. Hubert و همکاران (۲۰۰۳) 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. با توجه به عدم وجود اطلاعات ژنتیکی کافی در مورد ماهیان ارزشمند و زینتی بومی کشور که تا به‌حال برای آن‌ها چنین روش‌های علمی و دقیق صورت نپذیرفته است، لذا تکنیک بارکدگذاری DNA می‌تواند در تشخیص دقیق گونه‌های ماهیان موثر باشد (مقدم و همکاران، ۱۳۹۸).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری‌ها از مناطق هدف و مورد نظر که اصلی‌ترین و مهم‌ترین زیستگاه‌های منحصر به‌فرد گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در ایران می‌باشد، انجام پذیرفت. از هر نمونه، طبق روش استاندارد حداقل پنج قطعه از باله شنای گونه‌های مورد مطالعه(Zhang و Hanne، ۲۰۱۱) جهت انجام کار مولکولی بر روی ژن مشترک سیتوکروم اکسیداز ساب یونیت یک با هدف تشخیص دقیق گونه‌ها و تهیه خط شناسه ژنتیکی منحصر به‌فرد هر گونه، برداشته شد. سپس در الکل اتیلیک خالص نگه‌داری گردید و درنهایت جهت انجام آزمایشات مولکولی، به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم از باله شنای گونه‌های مورد مطالعه به‌روش Taggart و همکاران (۱۹۹۲) انجام گردید. جهت انجام PCR در حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در یک واکنش به‌میزان ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۰/۶ ماکرولیتر از آغازگرهای COIF Forward و Reverse 5’TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3’: COIR: 5’TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3’، ۲۵ میلی‌مولار MgCl2، ۱۰ میلی‌مولار dNTP، 5X PCR buffer و ۵ واحد از Taq DNA polymerase استفاده گردید. سیکل حرارتی مورد استفاده شامل سیکل اولیه ۹۴ درجه به‌مدت ۴,۳۰ دقیقه، به‌دنبال آن ۳۵ سیکل شامل دماهای واسرشته سازی (Denaturation) ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در دماهای اختصاصی آغازگر(۵۶ درجه) به‌مدت ۴۵ ثانیه،بسط و تکثیر (Extension)به‌مدت یک دقیقه در ۷۲ درجه و در آخر دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به‌مدت پنج دقیقه به‌دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: الگوی باندی محصول PCR ژن COI روی ژل آگارز دو درصد

نتایج

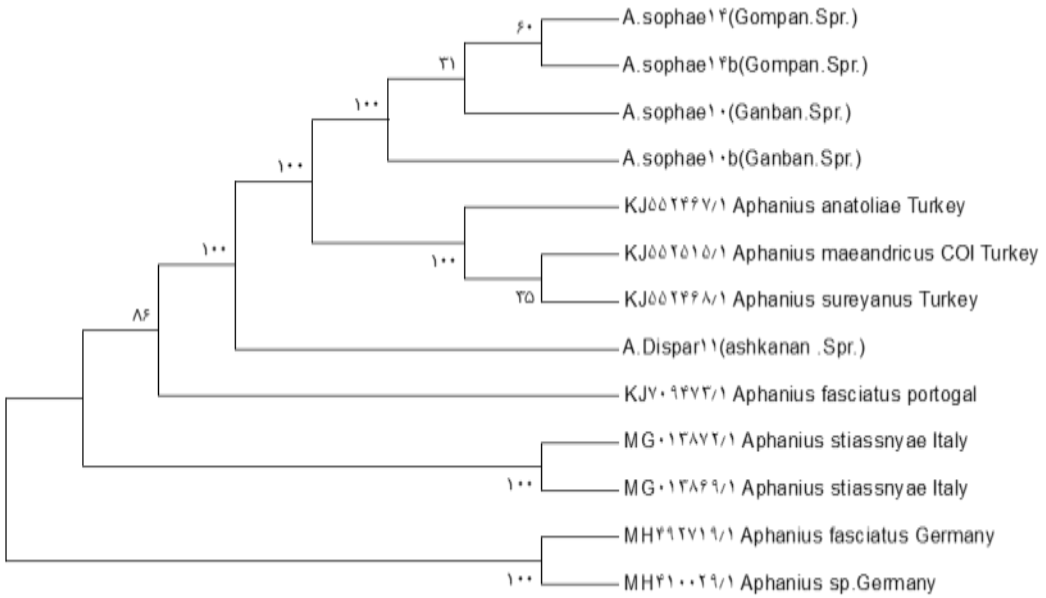
نتایج PCR حاکی از تکثیر شدن حدود ۶۰۰ جفت باز برای گونه‌های مورد بررسی بود که باندهای مناسب نشان از در اختیار داشتن توالی‌های مناسب جهت آنالیز بودند.

شکل ۲: درخت فایلوژنی از ژن COI در ارتباط با دو گونه از ماهیان آب‌گرم در مقایسه با دیگر گونه‌ها و مناطق دیگر ازجمله آلمان و ایتالیا به‌روش Neighbor-Joining

بلاست این توالی‌ها نشان داد که گونه *A. sophiae* جداشده از چشمه گمبان از لحاظ ژنتیکی بسیار نزدیک به گونه *Aphanius anatoliae*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius sureyanus* از کشور ترکیه می‌باشد که خود را به‌صورت کلاستر جداگانه نشان دادند. اگر چه گونه *dispar* نیز با اختلاف ژنتیکی نزدیک به هفت درصد خود را از این گونه جدا و همراه با گونه *sophiae* یک کلاستر خواهری را در همین کلاید ایجاد کرده است (شکل ۲) (جدول ۱).

جدول ۱: در صد فاصله ژنتیکی محاسبه شده در دو گونه مختلف ماهیان آب‌گرم

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. A.sophae 10(Ganban.Spr.)													
2. A.sophae 10b(Ganban.Spr.)	0.002												
3. A.sophae 14(Gompan.Spr.)	0.002	0.003											
4. A.sophae 14b(Gompan.Spr.)	0.002	0.003	0.000										
5. A.Dispar 11(ashkanan .Spr.)	0.695	0.706	0.699	0.699									
6. KJ552515.1 Aphanius maeandricus COI Turkey	0.165	0.168	0.162	0.162	0.881								
7. KJ552468.1 Aphanius sureyanus Turkey	0.173	0.176	0.170	0.170	0.957	0.081							
8. KJ552467.1 Aphanius anatoliae Turkey	0.170	0.173	0.167	0.167	1.010	0.085	0.084						
9. KJ709473.1 Aphanius fasciatus portogal	15.531	15.545	15.531	15.531	15.717	16.041	19.529	15.357					
10. MG013872.1 Aphanius stiassnyae Italy	15.754	15.767	15.754	15.754	19.494	16.594	16.462	19.720	15.031				
11. MG013869.1 Aphanius stiassnyae Italy	15.592	15.605	15.592	15.592	16.425	16.441	16.307	19.487	15.179	0.003			
12. MH492719.1 Aphanius fasciatus Germany	20.979	20.962	20.979	20.979	20.004	20.168	19.873	20.248	20.553	21.684	21.492		
13. MH410029.1 Aphanius sp.Germany	20.906	20.889	20.906	20.906	19.877	20.087	19.788	20.167	20.512	21.746	21.557	0.011	



شکل ۳: درخت فایلوژنی از ژن COI در ارتباط با دو گونه از ماهیان آب‌گرم در مقایسه با دیگر گونه‌ها و مناطق دیگر ازجمله آلمان و ایتالیا به‌روش Maximum Parsimony

بحث

در حوضه آبریز داخلی و در بین دو گونه مورد مطالعه بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی را به‌میزان نزدیک به هفت‌درصد بین گونه‌های دیسپار از چشمه اشکنان با گونه سوفیا وجود داشت که همراه با گونه ذکر شده یک کلاستر خواهری در یک کلاید جداگانه قرار گرفتند. در همین حال دو گونه مورد بحث با اختلاف بسیار بالاتری نسبت به گونه‌های *fasciatus* و *stiassnyae* از کشورهای پرتقال و ایتالیا به‌صورت یک کلاید جداگانه قابل توجه می‌باشد. بیش‌ترین اختلاف ژنتیکی بین گونه *fasciatus* و *sophiae* به‌میزان ۲۱ درصد از کشور آلمان مشاهده گردید که بسیار قابل توجه می‌باشد که با توجه به شکاف عمیق جغرافیایی

بین مناطق یاد شده دور از انتظار نبود که می‌توان نتیجه گرفت گونه اخیر توانسته است در این حوضه آبریز داخلی مهاجرت کم‌تری به حوضه‌های دیگر و در نتیجه جریان ژنی کم‌تری را با دیگر مناطق دیگر ایجاد نماید. در بین نمونه‌های منطقه چشمه گمبان، کم‌ترین اختلاف ژنتیکی بین آفانیوس سوفیا از همین چشمه و چشمه گمبان (صفر درصد) مشاهده شد که با توجه به فاصله جغرافیایی کم بین مناطق یاد شده دور از انتظار نبود. در این میان اختلاف ژنتیکی به نسبت کم آفانیوس سوفیا با گونه *Aphanius anatoliae*، *Aphanius maeandricus* و هم‌چنین *Aphanius sureyanus* از کشور ترکیه می‌باشد (در حدود ۱۵ صدم درصد) که علی‌رغم فاصله جغرافیایی زیاد این گونه قابل توجه است که می‌توان به این نکته توجه کرد که احتمالاً این گونه توانسته است جریان ژنی بیش‌تری را از طریق حوضه‌های آبریز رودخانه‌ها و دریاچه‌های زیرزمینی به این منطقه ایجاد نماید.

در تحقیق مشابهی که توسط Herbek و همکاران (۲۰۰۳) در کشور ترکیه بر روی ارتباط فایلوژنی گونه آفانیوس در آناتولی مرکزی (ترکیه) انجام گرفت، نتیجه مشابهی حاصل شد، مبنی بر این‌که 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 و Minckly، ۱۹۹۷) در همین ارتباط می‌توان دلیل اختلاف ژنتیکی گونه دیسپار از چشمه اشکنان و سوفیا احتمالاً به‌دلیل گونه‌زایی و جدایی جغرافیایی بوده که این گونه را دستخوش تغییراتی نموده است، هر چند از لحاظ شکل ظاهری، شباهت‌هایی وجود دارد، ولی تغییرات ژنومی بین آن‌ها قابل توجه می‌باشد، زیرا فاصله جغرافیایی این مناطق زیاد است. 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 مجتمع شدن افراد در یک منطقه خاص به‌وجود می‌آید و جمعیت‌های یک گونه به‌واسطه آمیزش درونی با یکدیگر یک مخزن ژنی منحصر به همان جمعیت را ایجاد می‌کنند (Pinera و همکاران، ۲۰۰۷). به‌طور کلی، اگر تمایز ژنتیکی قابل توجه و یا به‌عبارت دیگر ساختار جمعیتی قوی در میان جمعیت‌ها رخ می‌دهد و یا مهاجرت کم است، باید برای هر جمعیت یک مدیریت جدا در نظر گرفته شود و نیز اندازه جمعیت به‌منظور جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی، بالا نگه داشته شود. تنوع هاپلوتایپی در درون گونه‌های مورد بررسی با توجه به اختلاف جغرافیایی بین مناطق مختلف منطقه مورد بررسی، بسیار پایین بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تعلق احتمالی آن‌ها به یک جمعیت و انتقال مرحله به مرحله آن‌ها از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد. به‌طورکلی، میزان تنوع در ناحیه سیتوکروم اکسیداز، بسیار پایین است. حداکثر میزان تنوع درون گونه‌ای در ماهیان، یک درصد است و تقریباً در اغلب گونه‌های ماهیان، میزان تنوع درون گونه‌ای کم‌تر از یک درصد است. با این‌حال، تنوع هفت درصد در ماهیان آب شیرین (Hubert و همکاران، ۲۰۰۸) و ۲۲/۱۶ درصد در ماهیان مناطق مرجانی (Hubert و همکاران، ۲۰۱۱) گزارش شده است. مطالعه اخیر ثابت کرد که استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند در شناسایی تنوع ژنتیکی، بارکدینگ و ارتباط منشا ژنتیکی گونه‌های هدف موثر باشد. ضمنا در تحقیق حاضر، ژن COI اطلاعات مفیدی را در خصوص پارامترهای تنوع و ساختار ژنتیکی گونه‌های مختلف ماهیان آب‌گرم از جنس آفانیوس در مناطق مورد مطالعه در جهت مدیریت بهینه از ذخایر گونه‌های مهم در ایران در اختیار می‌گذارد.

منابع

۱. **مقدم، م.؛ رحمانی، م.ر.؛ ایگدری، س. و کیانی‌هرچگانی، س.، ۱۳۹۸.** بررسی آرایه‌شناسی جنس *Paraschistura* (در جنوب ایران) با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی (COI). فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۱، شماره ۲، صفحات ۳۰۵ تا ۳۱۲.

۲. **هوشیار، ف.؛ رضایی، ح.ر.؛ سیف‌علی، م. و رضایی، س.، ۱۳۹۶.** تبارشناسی و مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldi* De Filippi 1986) براساس ژن سیتوکروم b در پنج رودخانه از حوزه شمالی ایران. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۹، شماره ۳، صفحات ۲۹۱ تا ۳۰۴.

3. **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: 145-251.

4. **Bardakci, F. and Skibinski, D.O.F., 1994.** Applications of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity. Vol. 73, pp: 117-123.

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. **Blanco, J.l.; Hrbek, T. and Doadrio, I., 2006.** A new species of the genus *Aphanius* (Nardo, 1832). (Actinoptergii, Cyprinodontidae) from Algeria. Zootaxa. Vol. 1158, pp: 530-539.

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. **Frenkel, V. and Goren, M., 2000.** Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. Aquaculture. Vol. 184, pp: 255-265.

10. **Galetti, P.M.; Aguliar, C.T. and Molina, W.F., 2000.** An overview of marine fish cytogenetics. Hydrobiologia. Vol. 420, pp: 55-62.

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

13. **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.

14. **Hubert, N.; Paradis, E.; Bruggemann, H. and Planes, S., 2011.** Community assembly and diversification in Indo Pacific coral reef fishes. Ecology and Evolution. Vol. 1, pp: 229-237.

15. **Hubert, N.; Hanner, R.; Holm, E.; Mandrak, N.E.; Taylor, E.; Burridge, M.; Watkinson, D.; Dumont, P.; Curry, A.; Bentzen, P.; Zhang, J.; April, J. and Bernatchez, L., 2008.** Identifying Canadian freshwater fishes through DNA Barcodes. PLoS ONE 3, e2490.

16. **Leonardoes, I. and Sinis, A., 1998.** Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces: Ciprinodontidae) in the Mezolongy and Etolikon lagoons (W. Greece). Fisheries research. Vol. 35, pp: 171-181.

17. **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.

18. **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.

19. **Taggart, J.B.; hynes, R.A.; Prodohal, P.A. and Ferguson, A., 1992.** A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of Fish Biology. Vol. 40, pp: 963-965.

20. **Wildekamp, R.H.; Kucuk, F.; Unlusayin, M. and Neer, W.V., 1999.** Species and subspecies of the genus *Aphanius* Nardo 1897 (Pisces: Cyprinodontidae) in Turkey. Tr. J. Zool. Vol. 23, pp: 23-44.

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