تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت ماهیان گورخری *Aphanius ginaonis* و *Aphanius dispar* در آب‌های داخلی هرمزگان و بوشهر با استفاده از نشانگر مولکولی PCR-RFLP

عصمت سلیمی[۱]، حسین ذوالقرنین*[۱]، بیتا ارچنگی[۱]، محمدتقی رونق[۱]، ، سید احمد قاسمی[۲]

۱.گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر
۲. گروه بیولوژی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۳

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ماهیان گورخری گنو و معمولی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی گردید. جهت تعیین تنوع ژنتیکی این دو ماهی در حوضه خلیج فارس، تعداد ۳۰ نمونه ماهی گورخری گنو (*Aphanius ginaonis*) از چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان و ۳۰ نمونه ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*) از چشمه آب گرم میراحمد در استان بوشهر جمع‌آوری گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR به طول ۵۵۰ جفت‌باز در ناحیه D-loop میتوکندریایی، از ۵ آنزیم محدودگر *AluI, DpnI, Eco47I, HindIII HinfI* استفاده شد. در نتیجه این آنالیزها، ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت به دست آمد که ۹ هاپلوتیپ مربوط به ماهی گورخری گنو و ۳ هاپلوتیپ مربوط به ماهی گورخری معمولی بود. ۴ هاپلوتیپ به دست آمده در ماهی گورخری گنو جزء هاپلوتیپ‌های نادر بودند. در ماهی گورخری معمولی هاپلوتیپ AAAAA بیشترین فراوانی را دارا بود و در ماهی گورخری گنو هاپلوتیپ‌های EABAB، EACAB و CABAB بیشترین فراوانی را نشان دادند. میزان تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت نمونه‌های ماهی *A.ginaonis* ، ۰/۷۹ و در نمونه‌های ماهی *A.dispar* ، ۰/۳ و تنوع نوکلئوتیدی در درون جمعیت نمونه‌های ماهی*A.ginaonis* ، ۰/۱۹ و در نمونه‌های ماهی *A.dispar* ، ۰/۰۵ محاسبه گردید. محاسبه تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی نشان داد که تنوع در ژنوم میتوکندریایی ماهی گورخری گنو بالاتر از ماهی گورخری معمولی است. بررسی‌های انجام شده بر ژنوتیپ‌های حاصله نشان داد که PCR-RFLP تکنیک مناسبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی در دو گونه ماهی مذکور می‌باشد.

کلید واژه‌ها: تنوع ژنتیکی، *Aphanius ginaonis* ، *Aphanius dispar* ، PCR-RFLP

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zolgharnine@yahoo.com

۱. مقدمه

کشور ایران، با پراکندگی وسیع جغرافیایی دارای زیستگاه-های متعددی است و دارای اهمیت بوم‌شناسی بسیار بالایی می‌باشد. در میان مطالعات بوم‌شناسی، بررسی‌های انجام شده بر روی آب‌های داخلی ایران بسیار اندک است. آگاهی از ویژگی‌های زیست‌شناسی و همچنین بوم‌شناسی گونه‌های مختلف آبزیان در ایران می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت مدیریت موثر ذخایر ماهیان در آینده فراهم نماید. خانواده کپورماهیان دندانادار (Cyprinodontidae) از سازگارترین ماهیان آب‌های داخلی ایران است. مطالعات محدودی بر روی ماهیان این خانواده در زیستگاه‌های مختلف انجام شده است. علت انتخاب ماهی گورخری جهت مطالعه، اهمیت این ماهی در مهار زیستی پشه‌ها، ارزش اکولوژیک و ارزش زیبایی‌شناسی از نظر ماهیان زینتی و آکواریومی می‌باشد. در حالی که کار کمی روی جمعیت‌های ایرانی آفانیوس انجام شده است (Hrbek et al., 2006).

جنس *Aphanius* تنها جنس از تیره کپورماهیان دندانادار موجود در ایران است (Coad, 1988). تاکنون ۷ گونه اسمی از آن در ایران گزارش شده است (Esmaeili *et al.*, 2008). ماهی گورخری گنو (*Aphanius ginaonis*) منحصرا در چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان وجود دارد و تنها گونه بومی این منطقه به شمار می‌رود (Reichenbacher et al., 2009). ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar*) در همه محیط‌های طبیعی و محیط های آب شیرین دست ساخته بشر و سواحل زهکشی شده با آب دریا، به طور موقتی یا دائمی حضور دارد (Alkahem et al., 1994). ماهی گورخری معمولی دارای دامنه وسیعی از تحمل شوری است و در آب‌های شیرین ساکن می‌شود و محدوده شوری تا ۴ برابر آب دریا را نیز تحمل می‌کند (Galil, 2007).این ماهی یوری‌هالین و یوری‌ترمال است، درجه معینی از آلودگی آلی ، آلودگی غیر آلی و درجه نسبی پائین اکسیژن را تحمل می‌کند (Frenkel and Goren, 2000). این ماهی می‌تواند به پژوهش‌های وابسته به محیط کمک کند (Al-Kahem-Al-Balawi et al., 2008). DNA میتوکندریایی در یوکاریوت‌ها در خارج از هسته و درون میتوکندری یافت می‌شود (Brown, 1989) که به سبب دارا بودن ۵ تا ۱۰ برابر موتاسیون در مقایسه با هسته-ای به مولکول ساعت تکامل معروف است و در بررسی‌های خویشاوندی و جمعیت‌شناسی کاربرد وسیع دارد (Cronin et al., 1994).

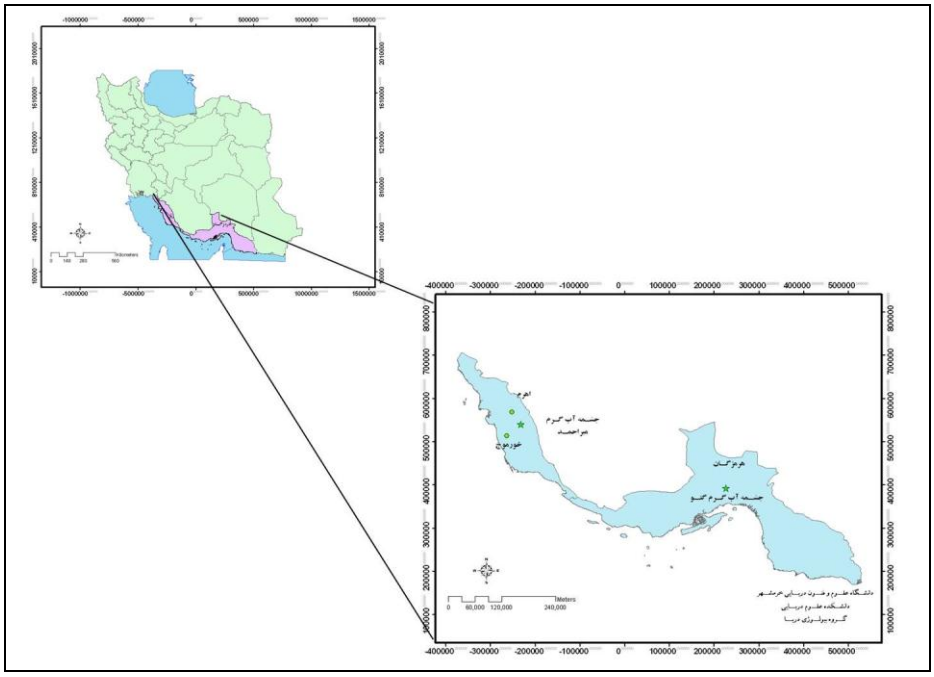
آنالیز mtDNA به وسیله روش مستقیم توالی نوکلئوتیدها و روش غیر مستقیم با آنالیز RFLP صورت می‌پذیرد که روش پیشرفته‌ای برای بررسی جمعیت‌ها می‌باشد (Nahavandi et al., 2006). قابل ذکر است که چندشکلی ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای به عنوان یک شاخص ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی می‌باشد (Taggart and Hynes, 1998) و از آنجاییکه آنزیم‌ها فرآورده‌های ژنها می‌باشند و نشان دادن تغییرات الکتروفورزی در آنها بر روی ژل انعکاس مستقیمی از اختلاف ژنتیکی آنهاست برای بررسی تغییرات ژنوم میتوکندری از مکان‌های عمل آنزیم‌های برشی استفاده می شود (Nahavandi et al., 2006). تنها مطالعه مولکولی صورت گرفته بر روی ماهی گورخری گنو، توسط خواجه در سال ۱۳۸۸ بوده است؛ که به بررسی چندشکلی ژنتیکی ماهی گورخری گنو با استفاده از منطقه D-loop پرداخت و میزان تنوع هاپلوتیپی بالایی را در این گونه گزارش داد. هر چه دانش ما از زیست‌شناسی، پراکنش و زیستگاه یک گونه بیشتر باشد تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت آمیزتر است. مطالعات زیست‌شناختی حاکی از آن است که سطوح مختلف تنوعات زیست گونه‌ای و اکوسیستمیک عمیقا متاثر از تنوعات ژنتیکی درون گونه‌ای است. در این مطالعه تلاش شد تا با بررسی چندشکلی احتمالی موجود در mtDNA جمعیت ماهی گورخری گنو و مقایسه آن با ماهی گورخری معمولی با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP این امر مهم حاصل شود. یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های درون گونه-ای و قرابت ژنتیکی این جمعیت‌ها می‌تواند شناخت دقیق‌تر و متمایزکننده‌ای از ساختار ژنتیکی این گونه‌ها به دست دهد و راهکارها و تمهیدات احتمالی عملی برای حفظ گونه‌های مورد تهدید را فراهم سازد.

نظر به اینکه ماهی گورخری یکی از ماهیان مهم اکولوژیکی خلیج‌فارس می‌باشد که در خطر انقراض قرار دارد و تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای بر روی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت-

های این گونه در آب‌های ایرانی خلیج فارس با نشانگر RFLP صورت نگرفته است. لذا این تحقیق می‌تواند راهگشای تعدادی از سوالات در خصوص ویژگی‌های جمعیتی این ماهیان باشد.

۲. مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۳۰ قطعه ماهی *Aphanius ginaonis* از چشمه آب گرم گنو واقع در استان هرمزگان، ۳۵ کیلومتری بندرعباس در دامنه شرقی کوه گنو با موقعیت جغرافیایی ۲۷ درجه و ۲۸ دقیقه و ۲۹/۸۶ ثانیه عرض شمالی و ۵۶ درجه و ۱۷ دقیقه و ۲/۶۷ ثانیه طول شرقی و ارتفاع ۱۹۷ متر از سطح دریا و ۳۰ قطعه ماهی *Aphanius dispar* از چشمه آب گرم میراحمد واقع در استان بوشهر با استفاده از تور دستی صید شد. چشمه آب گرم میراحمد در ۷۷ کیلومتری مسیر جاده اهرم به خورموج قرار دارد که با یک کیلومتر جاده خاکی به مظهر چشمه می‌رسد.



شکل ۱. نقشه ایستگاه‌های نمونه‌برداری تهیه شده در محیط Arc Gis 9.3

ماهی‌ها به علت اندازه کوچکی که داشتند به طور کامل در الکل ۹۶ درصد تثبیت و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند. استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل-کلروفرم انجام شد (Hillis and Moritz, 1990). برای بررسی کمیت و کیفیتDNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیدم بروماید و نیز اشعهUV استفاده گردید و غلظت آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری محاسبه گردید. برای واکنش PCR بخشی از توالی D-loop ژنوم میتوکندریایی استفاده شد، که علت انتخاب این ناحیه، میزان چندشکلی بالا و سریع‌تر بودن میزان موتاسیون نسبت به DNA ژنومی می‌باشد. یک جفت پرایمر مورد استفاده در این تحقیق از سایت NCBI[1] اقتباس گردیده است. توالی نوکلئوتیدهای پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

DL S: 5´_ CCC ACC ACT AAC TCC CAA AGC _ 3´
DL R: 5´_ CTG GAA AGA ACG CCC GGC ATG_ 3´

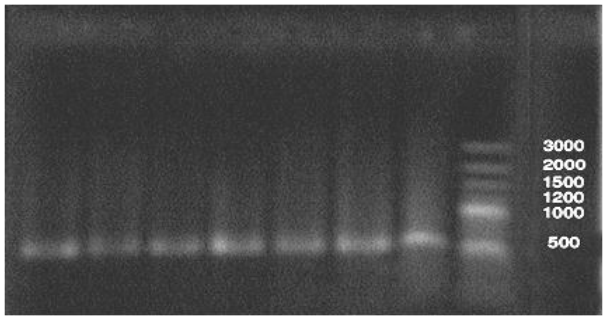
1. National Center for Biotechnology Information

واکنش PCR در سیکل‌های دمایی، ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه (واسرشته‌شدن اولیه)، ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه (واسرشته‌شدن)، ۵۲ درجه ۹۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه برای ماهیان گورخری انجام گرفت. محصول PCR حاصل با استفاده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱٪ مورد سنجش قرار گرفت. جهت تعیین آنزیم‌ها، نمونه‌ای از توالی DNA ماهی گورخری گنو به نرم افزار DNASIS داده شد، که درنهایت ۴۶ آنزیم محدودالاثر را برای ما مشخص کرد که از بین آنها ۵ آنزیم که منطقه برش کوتاهتری داشتند و بیشتر در دسترس بودند، با نام‌های *Alu*I, *Dpn*I *Eco*47I, *Hin*dIII, *Hin*fI جهت هضم محصول PCR و مشاهده قطعات هضم شده بر روی ژل مورد استفاده قرار گرفت، که چهار آنزیم چندشکلی را نشان دادند.

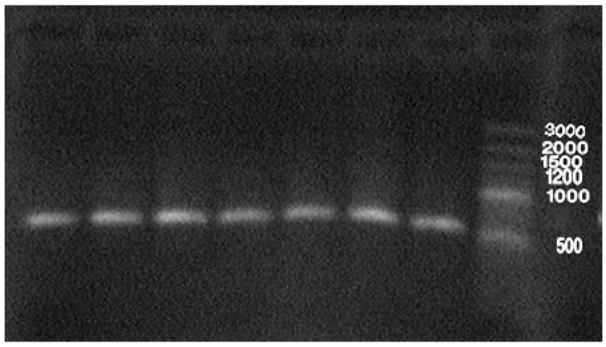
جهت انجام این مرحله از کار، ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۱ تا ۲ میکرولیتر آنزیم و ۲ میکرولیتر بافر آنزیم در یک تیوب با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۲ تا ۱۶ ساعت در داخل حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. محصولات PCR هضم شده با استفاده از الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶٪ و رنگ‌آمیزی نیترات نقره و همراه با مارکر 100bp مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از تعیین عددی باندها به وسیله نرم‌افزار Labimage هاپلوتیپ‌ها مشخص گردید. داده‌های ۰ و ۱ به دست آمده جهت تعیین تنوع به نرم‌افزار 3.11 Arlequin داده شد.

نتایج

کمیت و کیفیت DNA استخراجی مورد سنجش قرار گرفت و پس از اطمینان از مطلوب بودن DNA نسبت به تکثیر ناحیهD-loop به کمک دستگاه PCR اقدام شد. طول تقریبی قطعه تکثیر شده، در حدود ۵۵۰ جفت‌باز می‌باشد و به کمک ژل آگارز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و اشعه UV، از تکثیر ژن مورد نظر اطمینان حاصل شد (شکل ۲).



(الف)



(ب)

شکل ۲ .الکتروفورز محصول PCR برروی ژل آگارز ۱٪ : الف) ماهی گورخری گنو، ب) ماهی گورخری معمولی

جدول ۱. برنامه داده شده به دستگاه PCR

مراحل	تعداد چرخه (سیکل)	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (سانتی گراد)
واسرشته سازی اولیه	۱	۵	۹۵
واسرشته سازی		۴	۹۴
الحاق	۳۵	۱:۳۰	۵۲
بسط		۱:۳۰	۷۲
بسط نهایی	۱	۱۰	۷۲

محصول هضم آنزیمی مربوط به هر آنزیم در هر ماهی به صورت جداگانه بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید برده شد. در همه نمونه‌ها مجموع اندازه باندها با اندازه محصول PCR برابری داشت. باندها قادر به نشان دادن اندازه عددی ژنوتیپ‌ها بودند. اندازه قطعات ایجاد شده بر اثر هضم آنزیمی محصول

PCR برای هر آنزیم محاسبه گردید. بر اساس اندازه قطعات ایجاد شده، ژنوتیپ‌ها مشخص و نامگذاری گردید.

جدول۲- الگو و اندازه قطعات هضم شده توسط پنج آنزیم برشگر بر روی ناحیه D-loop میتوکندریایی

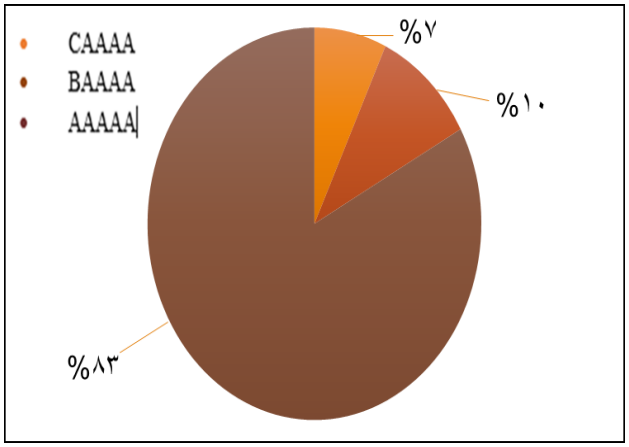
Eco47I(AvaII)			*HindIII*		*HinfI*		*AluI*					*DpnI*
A	B	C	A	B	A	B	A	B	C	D	E	A
۴۵۰	۳۳۰	۵۵۰	۲۷۵	۱۹۰	۲۷۵	۳۳۰	۲۰۰	۳۵۰	۵۵۰	۲۷۵	۳۰۰	۵۰۰
۱۰۰	۲۲۰		۲۷۵	۱۹۰	۲۷۵	۲۲۰	۱۸۰	۲۰۰		۲۷۵	۲۵۰	
				۱۷۰			۱۷۰					

ژنوتیپ‌های حاصله برای ۵ آنزیم محدودگر، ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت را نشان دادند. در این میان ۳ هاپلوتیپ مربوط به ماهی گورخری معمولی و ۹ هاپلوتیپ مربوط به ماهی گورخری گنو بودند (جدول ۳ و ۴). در ماهی گورخری گنو از ۱۲ هاپلوتیپ مشاهده شده ۴ هاپلوتیپ شامل فراوانی ۱ بودند که هاپلوتیپ نادر[۱] نامیده می‌شوند (DABAB، DACBB، DABBB، CABBB). در *A. disper* هاپلوتیپ AAAAA با ۸۳ درصد فراوانی و در *A.ginaonis* هاپلوتیپ‌های EABAB، EACAB و CABAB به ترتیب با۳۶ ، ۲۰ و ۱۶ درصد فراوانی، رایج ترین هاپلوتیپ‌های مناطق مورد بررسی بودند (شکل ۳ و ۴). میزان تنوع هاپلوتیپی در درون جمعیت نمونه‌های ماهی *A.ginaonis* ، ۰/۷۹ و در نمونه‌های ماهی *A.dispar* ، ۰/۳ و میزان تنوع نوکلئوتیدی در درون جمعیت نمونه‌های ماهی *A.ginaonis*، ۰/۱۹ و در نمونه‌های ماهی *A.dispar* ، ۰/۰۵ محاسبه گردید، که هر دو اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. خلاصه محاسبات انجام شده در هر دو ماهی در جدول ۵ آورده شده است.

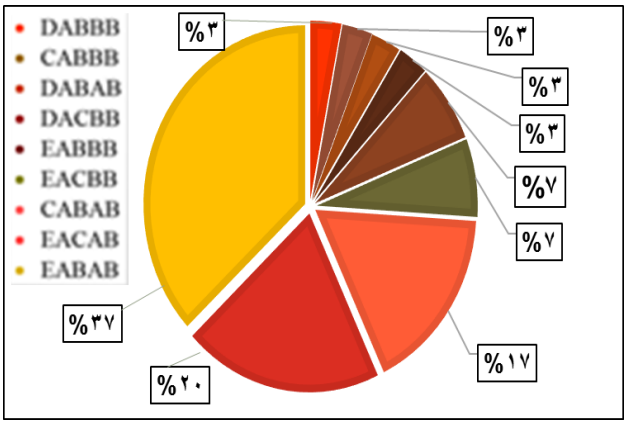
جدول۳-فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius dispar*

شماره هاپلوتیپ	هاپلوتیپ	فراوانی
۱	AAAAA	۲۵
۲	BAAAA	۳
۳	CAAAA	۲

۱. Rare Haplotyoe



شکل ۳- فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius dispar*



شکل ۴- فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius ginaonis*

۴. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه مطالعات ژنتیکی با استفاده از روش RFLP و همچنین استفاده از دو یا چند روش همزمان جهت تکمیل نتایج به دست آمده بسیار رایج و معمول می‌باشد (Eimanifar *et al.*, 2006). ابزارها و روش‌های مذکور اطلاعات جامع و کاملی را

جهت تخمین و برآورد تنوع ژنتیکی گونه‌ها در اختیار می‌گذارد. آنزیم *Alu*I با ایجاد الگوی هضمی متفاوت A، B، C، D، E می‌تواند برای تفکیک نمونه‌ها در هر دو گونه مورد استفاده قرار گیرد. الگوی C بین دو جمعیت مشترک بوده و پراکنش مشابه البته با فراوانی متفاوت بین جمعیت‌ها نشان داد. ژنوتیپ‌های A و B مختص ماهی گورخری معمولی و ژنوتیپ‌های D وE مختص ماهی گورخری گنو بودند. مقایسه دو منطقه مطالعه شده و الگوهای مشترک بین آنها نشان داد که الگوهای ذکر شده می‌توانند به عنوان مارکر ممیزه جمعیت ماهی گورخری معمولی و ماهی گورخری گنو استفاده شوند. میزان تنوع هاپلوتیپی بالای مشاهده شده در ماهی گورخری گنو، ممکن است به دلیل محیط زیست پراسترس این گونه باشد، زیرا میزان شوری و درجه حرارت بالا که این گونه در معرض آن قرار دارد، موجب بروز سطوح بالایی از موتاسیون در این گونه شده است.

جدول۴- فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius ginaonis*

شماره‌هاپلوتیپ	هاپلوتیپ	فراوانی
۱	EABAB	۱۱
۲	EACAB	۶
۳	CABAB	۵
۴	EACBB	۲
۵	EABBB	۲
۶	DABAB	۱
۷	DACBB	۱
۸	DABBB	۱
۹	CABBB	۱

جدول ۵- خلاصه محاسبات انجام شده بین دو ماهی *Aphanius dispar* و*Aphanius ginaonis*

	Aphanius ginaonis	*Aphanius dispar*	میانگین
تعداد فرد	۳۰	۳۰	۳۰
تعداد لوکوس‌ها	۱	۱	۱
تعداد لوکوس‌های چندشکلی	۱۰	۵	۷/۵
هتروزیگوسیتی قابل‌انتظار	۰/۷۹	۰/۳	۰/۵۴
تعداد آلل‌ها	۹	۳	۶
مشاهده‌شده F value	۰/۲	۰/۷۶	۰/۴۸
قابل‌انتظار F value	۰/۲۱	۰/۵۹	۰/۴

در میان هاپلوتیپ‌های مورد مطالعه، هاپلوتیپ‌های نادری (با فراوانی ۱) دیده شد که احتمالا یا در گذشته جزء هاپلوتیپ‌های غالب بوده و به مرور زمان جمعیت آنها کاهش یافته است، یا هاپلوتیپ‌های جدیدی هستند که در جمعیت ایجاد شده و ممکن است شرایط زیستی سبب افزایش تعداد آنها در آینده گردد و از وضعیت نادر خارج شوند و یا در اثر بروز موتاسیون و یا موارد نوترکیبی احتمالی به وجود آمده باشند. شرایطی دیده شده است که در آن هاپلوتیپ‌های رایج[1] بسیار کم بوده و در عوض هاپلوتیپ‌های نادر بسیار زیاد می‌باشند که این به دلیل وجود جهش‌هایی است که اغلب در آن جمعیت اتفاق افتاده است (Durna *et al*., 2010). تنوع هاپلوتیپی پس از آنالیز داده‌ها نشان داد که ماهی گورخری معمولی، دارای ۳ هاپلوتیپ و ۵ سایت چندشکلی با تنوع هاپلوتیپی ۰/۳ و ماهی گورخری گنو، ۹ هاپلوتیپ و ۱۰ سایت چندشکلی با تنوع هاپلوتیپی ۰/۷۹ را دارا می‌باشند. میزان تنوع هاپلوتیپ می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (همه افراد دارای هاپلوتیپ متفاوت) متغیر باشد. بر این اساس می‌توان گفت تنوع هاپلوتیپی در ماهی گورخری گنو، بیشتر از تنوع هاپلوتیپی در ماهی گورخری معمولی می‌باشد. میانگین تنوع هاپلوتیپ‌ها برای این دو ماهی ۰/۵۴ به دست آمد.

در تحقیق مشابهی که توسط Hrbek و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی ارتباطات فیلوژنتیکی گونه آفانیوس در آناتولی مرکزی (ترکیه) انجام گرفت نتیجه مشابهی حاصل شد مبنی بر اینکه در گونه آفانیوس علیرغم مشابهت ظاهری، گونه‌ها طی دوران

1. Common Haplotype

پلئوستین اولیه دستخوش تغییرات گونه‌زایی جغرافیایی[1] شده‌اند. در این تحقیق تعداد ۳۶ جمعیت از ۳ گونه آفانیوس مورد بررسی قرار گرفته بود (Dunham and Minckley, 1997). علاوه بر این می‌توان دلیل وجود اختلاف ژنتیکی بین دو جمعیت را این-طور استدلال نمود که جمعیت‌های مذکور در طول دوران‌های زمین‌شناسی و طی پدیده گونه‌زایی و جدایی جغرافیایی دستخوش تغییر و تحولاتی گردیده‌اند هرچند از نظر شکل ظاهری هنوز به هم شباهت دارند، ولی تغییرات بسیاری در ژنوم آنها رخ داده است. حرکات متعدد زمین‌شناسی در این منطقه باعث شده جمعیت ماهی گورخری گنو از نظر جغرافیایی از جمعیت ماهی گورخری معمولی جدا شده و در این مکان مستور گردد. در نتیجه جریان ژنی بین دو جمعیت طی میلیون‌ها سال قبل متوقف شده و باعث گردیده جمعیت ماهی گورخری گنو به صورت یک جمعیت مجزا با خصوصیات ژنتیکی منحصر به فرد باقی بماند. در طول زمان، به دلیل خصلت سازگاری سریع ماهی گورخری گنو به محیط خود عادت کرده و صفات کاملا متمایزی را نشان داده است. در تحقیقی که توسط Hrbek انجام گرفت نیز نتایج مشابهی به دست آمد مبنی بر اینکه فعالیت های آتشفشانی و حرکات زمین در اوایل ائوسین میانی باعث شده جمعیت گونه آفانیوس در مرکز آناتولی مستور شده و جریان ژنی بین گونه‌های مذکور با افرادی که قبلا جزء یک جمعیت محسوب می‌شدند متوقف گردد. در این شرایط، اختلافات بین گونه‌ای ایجاد شده، پس از مدت زمانی طولانی بر شکل ظاهری گونه‌های جدا شده نیز مشاهده می‌گردد. به عنوان مثال تعداد و ضخامت نوارهای بدن در افراد جمعیت‌های مقایسه شده در این تحقیق متمایز شده‌اند. علاوه بر این مطالعات میکروسکوپی نگاره (SEM) نشان داده است که فلس ماهی گورخری گنو دارای زوائد مخروطی شکل ظریفی در بخش عقبی خود بوده و بنابراین از نوع شانه‌ای بسیار ظریف است که از این نظر با فلس شانه‌ای سایر ماهیان متفاوت می‌باشد (Esmaeili and Gholami, 2008). این مطالعه با معرفی آنزیم‌هایی که قادر به ایجاد چند-شکلی در این دو گونه آفانیوس بودند بیان داشت که این آنزیم‌ها می‌توانند در تحقیقات RFLP بر روی سایر گونه‌های آفانیوس نیز مورد استفاده قرار گیرند. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت، روش PCR-RFLP برای تعیین رابطه فایلوژنتیکی هر دو گونه ماهی از خانواده کپورماهیان دنداندار در منطقه هرمزگان و بوشهر، دارای کارایی کافی و مناسب بوده و روش مناسبی برای تمایز جمعیت ماهی گورخری گنو و معمولی ارائه نموده است.

1. Geographic Speciation

منابع

Alkahem, H.F., Ahmed, Z. and Arrasheed, M.A. 1994. Comparative study on the Rates of Respiration of a Native Saudi Arabian fish *Aphanius dispar* (Ruppell, 1828) and an Introduced Competitor, *Gambusia affinis* (Baird and Girard, 1853) under Laboratory Conditions; Journal king Saudi University.7 (2): 245-253.

Al-Kahem-Al-Balawi, H.F., Al-Ghanim, K.A., Ahmad, Z., Temraz, T.A., Al-Akel, A.S., Misned, F.Al. and Annazri, H. 2008. A Threatened Fish Species (*Aphanius dispar*) in Saudi Arabia, A Case Study. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11 (19): 2300-2307.

Brown, W.M. 1989. Genetics: a molecular approach. London: Van Nostrand Reinhold (International). GB. 467 p. (QH 442 .B7).

Coad, B.W. 1988. *Aphanius vladykovi*,a new species of tooth-carp from the Zagros Mountain of Iran (Osteichthyes: Cyprinidontidae). Environmental Biology of Fishes. 23: 115- 125.

Cronin, M.A., Hilis, S., Born, E.W. and Potton, C. 1994. mtDNA variation in Atlantic and Pacific walruses. Genetics. 3. 2001. 72: 1035-1043.

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. 84: 7-15.

Durna, S., Bradkci, F. and Degerli, N. 2010. Genetic diversity of *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. Biochemical Systematics and Ecology. 30: 83-92.

Esmaeili, H.R., Ebrahimi, M. and Saifali, M. 2008. Karyological analysis of five tooth-carps (Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran. Micron. 39:95–100.

Esmaeili, H.Z. and Gholami, Z. 2008. Investigation on the surface ultrastructure of scale of Geno tooth-carp, *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) (Actinopterygii: Cyprinodontidae) using scanning electron microscope. Iranian Journal of Biology. 20(2): 307-314.

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

Galil, B.S. 2007. Loos or gain? Invasive aliens and biodiversity in the Mediterranean sea. Marine Pollution Bulletin. 55, 314-322.

Hillis, D. M. and Moritz, C. 1990. Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U. S. A. 120 p.

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

Khaje, P. 2010. Investigation of genetic polymorphic of Geno tooth-carp, *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) in mitochondrial D-loop region. Master's thesis. Hormozgan university. 89 pp.

Nahavandi, R., Rezvani, S., Vosoughi, Gh., Kazemi, B. 2006. Gene 18s rRNA variation of cuttlefish population (*Sepia pharaonis*) in the Persian Gulf and Oman Sea using PCR-RFLP method. Iranian Scientific Fisheries Journal. 14(2): 157-168.

Reichenbacher, B., Feulner, G.R. and Schulz-Mirbach, T. 2009. Geographic variation in otolith morphology among freshwater populations of *Aphanius dispar* (Teleostei, Cyprinodontiformes) from the Southeastern Arabian Peninsula. Journal Morphology. 270:469–484.

Taggart, J.B. and Hynes, R.A., 1998. A simplified protocol for routine total DNA isolation from fishes. Journal of fish biology. 42: 628-639.

Genetics Diversity of *Aphanius ginaonis* and *Aphanius dispar in* Hormozghan and Bushehr Coastal Zones respectively using PCR-RFLP Molecular Marker

Esmat Salimi[1], Hossein Zolgharnine[1*], Bita Archangi[1], Mohammad Taghi Ronagh[1], Seyyed Ahmad Ghasemi[2]

1. Marine Biology Department, Faculty of Marine and Oceanic Science- Department of Marine Biology. Marine Science and Technology University, Khorramshahr
2. Faculty of Marine Biology. Persian Gulf University, Bushehr.

Abstract

In this study, two populations of *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) and *Aphanius dispar* (Ruppell, 1828) were examined to determine genetic diversity using PCR-RFLP technique. A total of 60 individual specimens were collected from Hormozgan and Bushehr internal waters, comprising two sampling sites; from Geno hot spring (30 individuals of *A. ginaonis*) and Mir Ahmad hot spring (30 individuals of *A. dispar*). The D-loop region of mitochondrial DNA (550 bp) was amplified using PCR followed by RFLP analysis based on 5 restriction endonucleas enzymes (*Alu*I, *Dpn*I, *Eco*47I, *Hin*dIII *Hin*fI). In order to undertake data analysis, Arlequin 3.11 was applied. Results at population levels indicated that Geno individuals have more haplotype diversity than Mir Ahmad individuals (9 and 3 haplotypes respectively). However, further investigation using genetic techniques is required to clarify the molecular history and evolution of *Aphanius* species in this area. Results obtained from this research would be applicable to understand conservation genetics and management of this important fish species in Iran.

Keyword: Genetic diversity, *Aphanius ginaonis*, *Aphanius dispar*, PCR-RFLP.

Fig. 1. Map of the sampling stations in the Arc Gis 9.3
Fig. 2. Electrophorese of PCR product in agarose gel 1%. A) *Aphanius dispar* B) *Aphanius ginaonis*
Fig. 3. Frequency of haplotypes in *Aphanius dispar*
Fig. 4. Frequency of haplotypes in *Aphanius ginaonis*
Table 1. The program is given to PCR
Table 2. The pattern and size of PCR product after using restriction endonucleases
Table 3. Abundance of haplotypes of *Aphanius dispar*
Table 4. Abundance of haplotypes of *Aphanius ginaonis*
Table 5. Summary calculations between two species, *A. ginaonis* and *A. dispar*

Corresponding author E-mail: zolgharnine@yahoo.com