

Identification and Phylogenetic Status of Members of Aphaniidae Family in the Isfahan and Sirjan Basin Using COI Gene

Arash Jouladeh-Roudbar^{1*}, Negar Hossein Rahimi²,
Dorsa Cheraghi²

1. Ph.D., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. B. A., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: Sep. 26, 2021 - Accepted: Feb. 16, 2023)

Abstract

Isfahan basin, with 18 species of fish, has a relatively good variety of fish among the Endorheic basins of Iran. In previous studies, the presence of one species of the pupfishes family Aphaniidae was recorded in this basin. However, a recent report of the presence of *Esmaeilius vladaykovi* based on morphological evidence from this basin has been recorded, which needs further investigation. For this purpose, samples of *E. isfahanensis*, *E. vladaykovi* were obtained from their type localities and Hoz mahi village (where the presence of a new species has been reported) by electro fisher and Hand net. After DNA extraction from the samples, their COI gene was amplified in a thermocycler and then sequenced. Subsequent sequences of other species in this family were obtained from the NCBI Gene Bank. The best evolutionary model and the phylogenetic tree were selected and drawn by IQTREE. The results of the phylogenetic tree showed that at least nine valid species of this family are present in Iran. In addition, due to the location of specimens in the village of Hoz Mahi in the cluster of specimens caught from the type locality of *E. vladaykovi*, the presence of this species in the Isfahan and Sirjan basin was confirmed. Also, due to the few genetic distance observed between the population of Isfahan and Sirjan basin and Karun, it was possible that this species was transferred to mentioned basin by local people.

Keywords: *Aphaniops*, COI, Iran, Killifish, Morphological variation.

شناسایی و بررسی جایگاه آرایه‌شناسی اعضای خانواده گورخرماهیان Aphaniidae در حوضه اصفهان و سیرجان با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز I

آرش جولاده رودبار^{۱*}, نگار حسین رحیمی^۲, درسا چراغی^۲

۱. دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. کارشناس، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷)

چکیده

حوضه اصفهان و سیرجان با دارا بودن ۱۸ گونه ماهی، تنوع نسبتاً مناسبی از ماهیان را در بین حوضه‌های آبریز مخصوص ایران دارد. در مطالعات پیشین حضور یک گونه از خانواده گورخرماهیان Aphaniidae در این حوضه به ثبت رسیده بود. اما به تازگی گزارشی از حضور گونه *Esmaeilius vladaykovi* براساس شواهد ریخت‌شناسی از این حوضه به ثبت رسیده است که نیاز به بررسی بیشتر دارد. به همین منظور با دستگاه الکتروفیشر و ساقچوک از محل تیپ *E. vladaykovi*-*E. isfahanensis* و حوض ماهی (جایی که حضور گونه جدید از آن گزارش شده است) نمونه برداری به عمل آمد. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، ژن COI آنها در دستگاه ترموسایکلر تکثیر و سپس تعیین توالی شد. در ادامه توالی‌های گونه‌های دیگر این خانواده از بانک ژن NCBI دریافت شد. سپس با استفاده از نرمافزار IQTREE بهترین مدل تکاملی انتخاب و درخت تبارشناختی ترسیم شد. نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناختی نشان داد حداقل نه گونه معتبر از خانواده گورخرماهیان در ایران حضور دارد. علاوه بر این با توجه به قرارگرفتن نمونه‌های روستایی حوض ماهی در خوشة نمونه‌های صیدشده از محل تیپ گونه *E. vladaykovi* حضور این گونه در حوضه اصفهان و سیرجان تأیید گردید. همچنین با توجه تمایز ژنتیکی اندک مشاهده شده بین جمعیت حوضه مذکور و کارون، احتمال داده شد این گونه توسط مردم محلی به حوضه فوق منتقل شده باشد.

واژه‌های کلیدی: ایران، تنوع ریختی، گورخرماهی، *Aphaniops*.
COI

مقدمه

Nelson *et al.*,) Aphaniidae ۲۰۱۶) و آن را ذیل کپورماهیان دنداندار (Cyprinodontidae دسته‌بندی نموده، اما برخی دیگر آن را به عنوان خانواده‌ای مجزا و معتبر دسته‌بندی می‌کنند (Betancur-R *et al.*, 2017). با بررسی و تجمعیع مطالعات مختلف به نظر می‌رسد حداقل ۲۰ گونه اسمی از اعضای این خانواده در ایران گزارش شده است که حداقل هشت گونه آن برای جغرافیای ایران بومی Jouladeh-) (Endemic ویژه (Roudbar *et al.*, 2020) با توجه به مطالعات پیشین ۱۵ گونه اسمی از این خانواده که همگی در جنس Aaphanius قرار می‌گرفتند در آب‌های داخلی ایران وجود داشت که در سال‌های اخیر تغییرات بسیاری در وضعیت آرایه‌شناسی آن‌ها اعمال شد (جدول ۱).

آب‌های داخلی کشور ایران دارای ۳۳ خانواده ماهی است که در ۱۹ حوضه آبریز آن پراکنده شده‌اند (Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015; 2020) خانواده گورخرماهیان (Aphaniidae) یکی از مهمترین و پیچیده‌ترین خانواده ماهیان ایران از نظر Coad, 1980; Coad, 2009; آرایه شناختی است (Alavi-Yeganeh *et al.*, 2014; Freyhof & Yoğurtçuoğlu, 2020; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020; Teimori *et al.*, 2020; Freyhof et al., 2021). در حال حاضر توافق جامعی میان آرایه‌شناسان بر سر وضعیت رده‌بندی و جایگاه جنس‌ها و گونه‌های این خانواده وجود ندارد (Nelson *et al.*, 2016; Betancur-R *et al.*, 2017). برخی خانواده

جدول ۱. گونه‌های اسمی گزارش شده از خانواده گورخرماهیان (Aphaniidae) در ایران

ردیف	نام علمی	حوضه پراکنش	وضعیت فعلی	منبع
۱	<i>Aphanius arakensis</i> Teimori, Esmaeili, Gholami, Zarei & Reichenbacher, 2012	نمک	متراծ <i>Esmaeilius sophiae</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۲	<i>A. darabensis</i> Esmaeili, Teimori, Gholami & Reichenbacher, 2014	کل	متراծ، تغییر جنس به <i>Esmaeilius</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۳	<i>A. farsicus</i> Teimori, Esmaeili & Reichenbacher 2011	کر	متراծ <i>Esmaeilius persicus</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۴	<i>A. furcatus</i> Teimori, Esmaeili, Erpenbeck & Reichenbacher, 2014	مهران، کل و مکران	تغییر جنس به <i>Aphaniops</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۵	<i>A. ginaonis</i> (Holly, 1929)	مکران	تغییر جنس به <i>Aphaniops</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۶	<i>A. hormuzensis</i> Teimori, Esmaeili, Hamidan & Reichenbacher 2018	موند، مهران، کل و مکران	متراծ <i>Aphaniops teimorii</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۷	<i>A. isfahanensis</i> Hrbek, Keivany & Coad, 2007	اصفهان و سیرجان	متراծ، تغییر جنس به <i>Esmaeilius</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۸	<i>A. kavirensis</i> Esmaeili, Teimori, Gholami & Reichenbacher 2014	کویر غربی	متراծ <i>Esmaeilius sophiae</i>	Jouladeh-Roudbar <i>et al.</i> , 2020
۹	<i>A. mento</i> (Heckel, 1843)	عدم پراکنش در ایران	تغییر جنس به <i>Paraaphanius</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۱۰	<i>A. mesopotamicus</i> Coad, 2009	کارون	متراծ <i>Esmaeilius sophiae</i>	Jouladeh-Roudbar <i>et al.</i> , 2020
۱۱	<i>A. pluristriatus</i> (Jenkins 1910)	موند	متراծ <i>Esmaeilius sophiae</i>	Jouladeh-Roudbar <i>et al.</i> , 2020
۱۲	<i>A. shirini</i> Gholami, Esmaeili, Erpenbeck & Reichenbacher, 2014	کر	متراծ، تغییر جنس به <i>Esmaeilius</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۱۳	<i>A. sophiae</i> (Heckel, 1849)	کویر غربی، نمک، اصفهان و سیرجان، کارون، کرخه، موند و کل	متراծ، تغییر جنس به <i>Esmaeilius</i>	Jouladeh-Roudbar <i>et al.</i> , 2020
۱۴	<i>A. stoliczkanus</i> (Day, 1872)	لوت، جازموریان، ماشکید، مکران، موند، پرسپیس، کارون، کرخه و تیگریس	متراծ، تغییر جنس به <i>Aphaniops</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020
۱۵	<i>A. vladykovi</i> Coad, 1988	کارون، اصفهان و سیرجان	متراծ، تغییر جنس به <i>Esmaeilius</i>	Freyhof and Yoğurtçuoğlu, 2020

اپهانیidae ساکن حوضه اصفهان و سیرجان با استفاده از توالی ژن COI هدف‌گذاری شد تا پس از بررسی صورت‌گرفته مشخص شود چه گونه‌هایی از خانواده گورخرماهیان در این حوضه یافت می‌شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به‌منظور شناسایی گورخرماهیان حوضه اصفهان از رودخانه زاینده رود (اطراف پل ورزنه)، روستای چشممه‌ماهی و نهر خروجی از تالاب چغاخور (حوالی بلایجی) با استفاده از دستگاه الکتروفیشر SAMUS 725M و ساقچوک نمونه‌برداری صورت گرفت. از ایستگاه‌های ذکر شده باله دو نمونه در اتanol ۹۶ درصد تثبیت و برای استخراج DNA و توالی‌یابی به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه Lund کشور سوئد منتقل شد. لازم به ذکر است با توجه به این که جمعیت گورخرماهی در ایستگاه‌های یادشده بسیار انک بو، تنها دو نمونه از هر جمعیت برداشت و تثبیت شد.

استخراج DNA

باله‌های سینه‌ای نمونه‌های صیدشده پس از الكل‌زدایی، هموژن شدند. برای استخراج نمونه‌ها از کیت استخراج شرکت Bioneer استفاده شد.

واکنش PCR

FishF1- رفت از آغازگر
 $5' \text{TCAACCAACCACAAAGACATTGG}$
 FishR1- و برگشت CAC3'
 $5' \text{TGAGCTTCTGGTGGCCAAAGAAT}$
 CA3' جهت تکثیر ژن میتوکندریای COI در دستگاه Ward *et al.* (2005). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که از مقدار ۲/۲۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۱/۲۵ میکرولیتر منیزیم کلرید (MgCl_2)، ۰/۲۵

کوچک‌بودن اندازه بدن، تنوع ریختی بسیار بالا در بین جمعیت‌های مختلف، خشکشدن محل تایپ (Type locality)، در دسترس نبودن نمونه‌های تایپ، ایجاد دورگه‌ها، انتقال بین حوضه‌ای به‌وسیله مردم، سخت بودن نمونه برداری از جمعیت‌ها مختلف و ... باعث شده حل نمودن مشکلات آرایه‌شناسی اعضای این خانواده بسیار مشکل و با چالش همراه باشد. Jouladeh-Roudbar *et al.* (2020) از این بین گونه‌های اشاره شده در جدول ۱ گونه‌های *A. pluristriatus*, *A. kavirensis* و *A. sophiae* *A. mesopotamicus* قرار داده و دامنه پراکنش گونه *A. mento* را نیز تنها به Freyhof & Yoğurtçuoğlu (2020) علاوه بر تأیید نتیجه ذکر شده گونه *A. arakensis* را نیز متزلف باقی‌مانده این خانواده در ایران به دو جنس *Esmaeilius* و *Aphaniops* تعلق دارد.

در بسیاری از مطالعات انجام‌شده روی ماهیان آب‌های داخلی ایران گونه *Aphanius Esmaeilius* (*E. isfahanensis*) موجود در حوضه اصفهان را به گونه Coad, 1998; Coad, 1995; Coad 2005; Esmaeili *et al.*, 2018; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2015; 2020 نسبت دادند (Roudbar *et al.*, 2020). این گونه بومی اختصاصی حوضه ذکر شده بوده و تنها در قسمت‌های پایاب رودخانه زاینده‌رود (کمی قبل از تالاب گاوخونی) یافت می‌شود. اما براساس نتایج Jouladeh-Roudbar (*A. isfahanensis* 2020) *et al.* *A. isfahanensis* نیز در حوضه اصفهان یافت می‌شود. این در حالی است که پراکنش این گونه پیش‌تر در مطالعات مختلف به قسمت‌های شمالی حوضه کارون محدود شده بود و گزارشی از این گونه در حوضه اصفهان و سیرجان مشاهد نشده بود، بنابراین در بین مطالعات موجود تضاد آشکاری وجود داشت. لذا مطالعه حاضر با هدف شناسایی دقیق گونه‌های خانواده

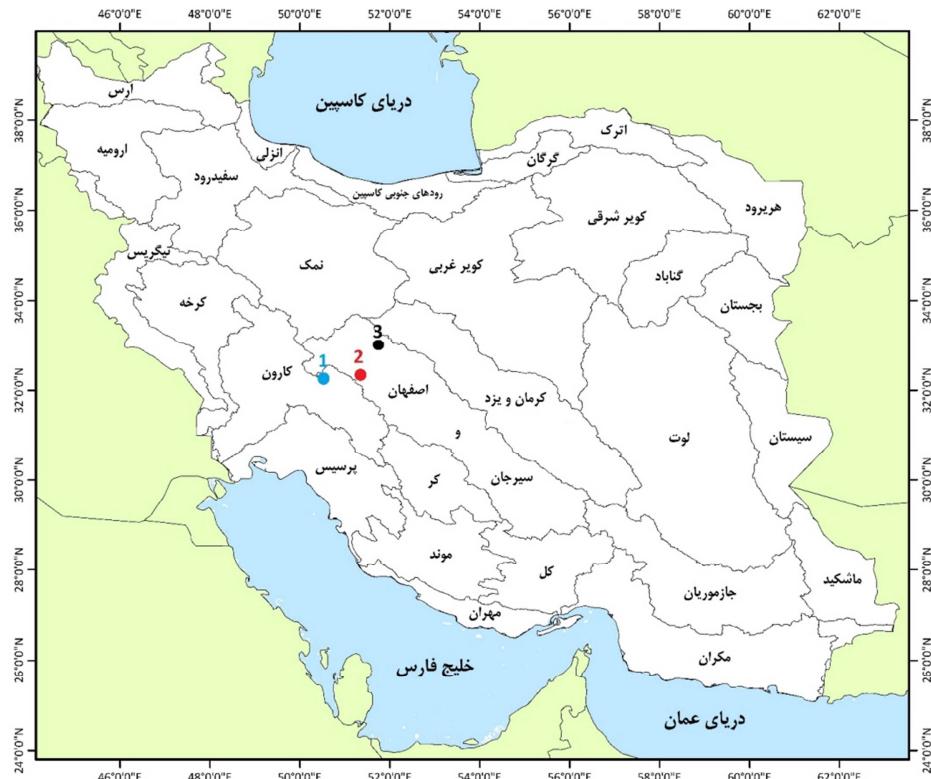
آنالیز داده‌ها

نمونه‌های توالی‌یابی شده پس از هم‌ردیفی با استفاده از نرم‌افزار MEGA ویرایش شدند. سپس توالی دیگر نمونه‌های خانواده گورخرماهیان در ایران از بانک جهانی NCBI استخراج شد. سپس نمونه‌های توالی‌یابی شده و استخراج شده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Larkin *et al.*, 2007 CLUSTALW هم‌ردیف شدند (Larkin *et al.*, 2007). برای انتخاب بهترین مدل تکاملی جهت تجزیه و تحلیل توالی‌های انتخابی و ترسیم درخت تبارشناختی maximum likelihood از نرم‌افزار IQTREE و بوت استرپ ۲۰۰۰ استفاده شد. تعیین فاصله نوکلئوتیدی نمونه‌ها نیز با استفاده از روش فاصله غیروابسته MEGA v. (uncorrelated distance) در نرم‌افزار MEGA 7.0 استفاده شد (Kumar *et al.* 2016). از نرم‌افزار Figtree v. 1.5 برای مصورسازی درخت‌های تبارشناختی استفاده شد (Rambaut, 2009). گونه *Aphyosemion franzwernerii* نیز (EF417044) برای برونو انتخاب شد.

میکرولیتر پرایمر رفت و ۰/۲۵ میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۱۲۵ میکرولیتر (۱۰ mM) dNTPs و ۰/۶۲۵ میکرولیتر آنزیم تک‌پلیمراز (۵ u/µl) و ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۸/۷۵ میکرولیتر آب مقطر بودند. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه، به‌دنبال آن سه چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود.

توالی‌یابی

مقدار ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR قطعه تکثیر شده جهت خالص سازی و توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. قطعه‌های تکثیر شده با استفاده از آغازگر رفت و برگشت به صورت دو طرفه توالی‌یابی شدند.



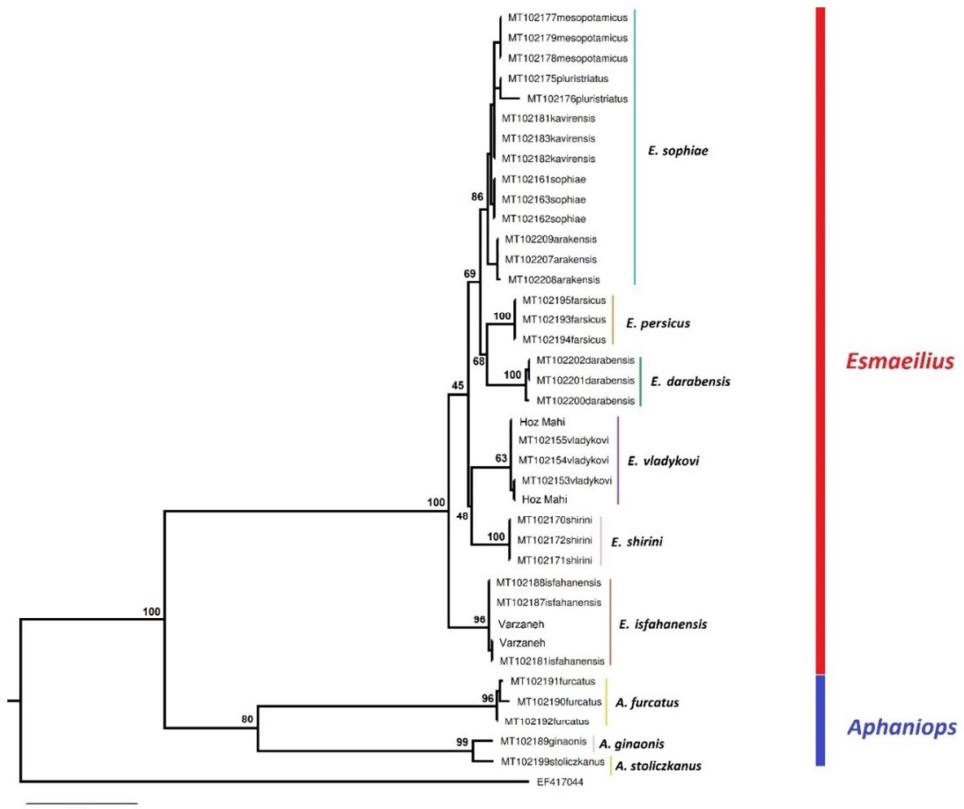
شکل ۱. موقعیت جغرافیایی محل تایپ گونه *E. vladikovi* (۱) و ایستگاه‌های نمونه‌برداری شده (۲: حوض ماهی، ۳: ورزنه)

COI (به ترتیب) فاصله ژنتیکی در ژن *E. vladykovi* داشتند (جدول ۱).

نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی با استفاده از ژن *COI* در نرم‌افزار IQTREE، نمونه‌های بررسی شده را در دو خوش اصلی قرار داد که با میزان بالای UFBoot2 حمایت شدند. در خوش اول گونه‌های جنس *Esmaeilius* قرار گرفتند که شامل *E. darabensis* *E. farsicus* *E. sophiae* *E. isfahanensis* و *E. shirini* *E. vladaykovi* بودند (شکل‌های ۲ تا ۵). خوش دوم نیز مشتمل بر سه گونه *A. ginaonis* *A. furcatus* و *Aphaniops stoliczkanus* بود که ذیل جنس *A. stoliczkanus* دسته‌بندی شدند. نمونه‌های بررسی شده از ایستگاه ورزنه در خوش *E. isfahanensis* و نمونه‌های *E. vladaykovi* حوض ماهی نیز در خوش قرار گرفتند (شکل ۲).

نتائج

براساس نتایج به دست آمده از هم ر دیفی توالی های مورد بررسی ژن *COI* به طول ۶۰۹ جفت باز حاصل شد. ۴۱۱ جایگاه (در حدود ۶۵/۲۹ درصد) تک شکل و ۱۵۷ جایگاه informative parsimony براساس نتایج انتخاب مدل، بهترین مدل تکاملی برای مجموعه داده ها، مدل تکاملی TPM2+F+G4 به دست آمد. همچنین براساس نتایج تجزیه و تحلیل بازه ای آلتی تشکیل دهنده ژن *COI* نمونه های بررسی شده، میزان باز آدنین (A) ۲۶ درصد، باز تیمین (T) ۳۰ درصد، باز سیتوزین (C) ۲۶ درصد و باز گوانین (G) ۱۸ درصد بود. میزان فاصله ژنتیکی uncorrelated میان گونه های مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. لازم به ذکر است نمونه های تعیین توالی شده از ایستگاه ورزنه (۳۲,۴۱۵)، (۵۱,۴۴۲) کمتر از ۵۲,۶۷۷ و حوض ماهی (۳۲,۱۵۱) و ۰/۳ درصد با گونه های *E. isfahanensis*



شکل ۲. درخت تیار شناسی، نمونه های خانواده Aphaniidae در این مطالعه با استفاده از نرم افزار IQTREE

جدول ۲. میانگین فاصله ژنتیکی uncorrelated COI در گونه‌های خانواده Aphaniidae براساس درصد تفاوت در ژن

جنس	گونه معتبر فعلی	گونه اسمی	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
		۱ <i>sophiae</i>												
		<i>sophiae</i>	۱۵/۱	۲										
		<i>pluristriatus</i>												
		۱۵/۱ <i>mesopotamicus</i>	۶۶/۰	۳										
		<i>arakensis</i>	۲۰/۱	۷۰/۱	۸۸/۰	۴								<i>sophiae</i>
		<i>kavirensis</i>	۸۸/۰	۳۳/۰	۸۲/۰	۳۳/۰	۵							
		۱۹/۳ <i>vladykovi</i>	۵۷/۳	۵۱/۳	۰/۱/۴	۱۹/۳	۶							<i>vladykovi</i>
		<i>shirini</i>	۸۴/۳	۲۸/۳	۵۰/۳	۶۱/۳	۱۱/۴	۲۸/۳	۷					<i>shirini</i>
		۹۹/۴ <i>Isfahanensis</i>	۸۹/۴	۰/۱/۴	۰/۶/۴	۰/۱/۴	۸۳/۴	۰/۱/۴	۸					<i>Isfahanensis</i>
		<i>farsicus</i>	۳۲/۵	۹۴/۳	۰/۱/۴	۳۰/۲	۳۵/۲	۶۳/۲	۷۹/۲	۳۰/۲	۹			<i>farsicus</i>
		۴۵/۳ <i>darabensis</i>	۴۸/۵	۲۷/۴	۳۳/۴	۱۲/۳	۳۴/۳	۴۵/۳	۹۴/۳	۱۲/۳	۱۰			<i>darabensis</i>
		۴۱/۱۷ <i>ginaonis</i>	۲۴/۱۷	۶۵/۱۶	۶۹/۱۶	۴۲/۱۶	۴۲/۱۶	۰/۱۷	۷۵/۱۶	۱۱				<i>ginaonis</i>
		۰/۰/۱۵ <i>furcatus</i>	۷۵/۱۶	۱۳/۱۷	۹۸/۱۶	۴۲/۱۶	۱۹/۱۶	۴۸/۱۶	۲۶/۱۶	۰/۸/۱۷	۱۲			<i>furcatus</i>
		۷۲/۱۴ <i>stoliczkanus</i>	۹۷/۱	۹۰/۱۷	۰/۸/۱۷	۸۱/۱۶	۷۵/۱۶	۹۱/۱۶	۵۷/۱۷	۲۴/۱۷	۱۳			<i>stoliczkanus</i>
														<i>Aphaniops</i>

شکل ۳. گورخرماهی اصفهان *Esmaeilius isfahanensis* (بالا: ماده، پایین: نر)؛ زاینده رود، ورزنه، حوضه اصفهان و سیرجانشکل ۴. گورخرماهی ولدیکو *Esmaeilius vladykovi* (بالا: ماده، پایین: نر)؛ چغاخور، بلداجی، حوضه کارون



شکل ۵. گورخرماهی ولدیکو *Esmaeilius vladykovi* (بالا: ماده، پایین: نر); حوض ماهی، مبارکه، حوضه اصفهان و سیرجان



آمورچه ماده، *Pseudorasbora parva*



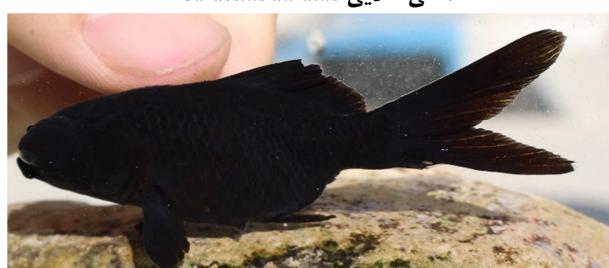
آمورچه نر، *Pseudorasbora parva*



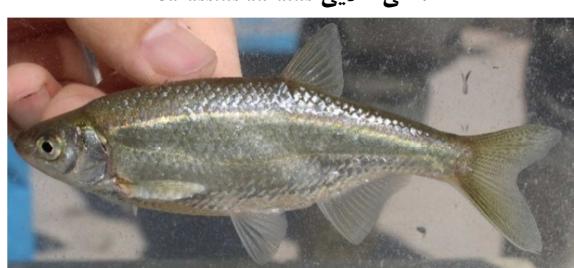
ماهی طلایی، *Carassius auratus*



ماهی طلایی، *Carassius auratus*



ماهی طلایی، *Carassius auratus*



مروارید ماهی، *Alburnus hohenakeri*



سیاه ماهی کد، *Capoeta coadi*



سیاه ماهی درشت پولک، *Capoeta gracilis*

شکل ۶. گونه‌های صیدشده از استخر روتای حوض ماهی، مبارکه؛ حوضه اصفهان و سیرجان



شکل ۷. به ترتیب از بالا به پایین؛ پل ورزنه، نهر خروجی تالاب چغاخور (بلداجی)، حوض ماهی (مبارکه).

A. furcatus E. isfahanensis shirini در آب‌های داخلی ایران قابل تأیید است (شکل ۲). علاوه بر گونه‌های اسمی ذکر شده در بخش مقدمه، Teimori *et al.* (2018) گونه *Aphanius hormuzensis* را از رودخانه مهران (هرمزگان) توصیف نمودند. اما در ادامه (2020) Freyhof & Yoğurtcuoğlu آن‌ها را براساس قوانین International Commission on Zoological Nomenclature (Commission on Zoological Nomenclature) ICZN ندانسته و گونه فوق را دوباره با نام *Aphanius teimorii* توصیف نمودند، اما این جایه‌جایی توسط Catalog of Fishes مورد تأیید قرار نگرفت (Fricke *et al.*, 2021). در مطالعه دیگر

بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که اشاره شد خانواده Aphaniidae از لحاظ آرایه‌شناسی دارای پیچیدگی‌های فراوانی است و همواره در بین محققان بر سر اعتبار و جایگاه اعضای آن اختلاف بوده است (Freyhof & Yoğurtcuoğlu, 2020; Jouladeh-Roudbar *et al.*, 2020; Teimori *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر سعی شد تا علاوه بر شناسایی نمودن گونه‌های این خانواده در حوضه اصفهان برخی از مشکلات آرایه‌شناسی تعدادی از گونه‌های این خانواده نیز بررسی شود.

با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارشناسی در این مطالعه حضور گونه‌های *E. sophiae*, *E. vladaykovi*, *E. darabensis* و *E. farsicus*

شفاف با بستر قلوه‌سنگی بوده، اما نهر چخاخور دارای آب کدر و بستر ماسه‌ای-گلی است، به‌نظر می‌رسد تغییر الگوی رنگی ناشی از تطابق جمعیت‌های این گونه به محیط اطراف خود و یا فصل تولیدمثل باشند. در مطالعات Jouladeh- Freyhof *et al.* (2021) و پیشین نظیر Jouladeh- (2020) اذعان نموده بودند که ویژگی‌های ریختی برای این جنس نمی‌تواند تنها به عنوان عامل تمایزدهنده گونه‌ها باشد، به عنوان مثال *A. pluristriatus*, *A. kavirensis* و *A. mesopotamicus* دارای جمعیت‌هایی با تنوع ریختی بالایی بودند اما از لحاظ ژنتیکی اختلاف قابل توجهی نداشتند (جدول ۱) بنابراین مترادف *A. sophiae* قرار داده شدند. در مطالعه دیگر Freyhof *et al.* (2017) نشان دادند که جمعیت‌های برخی از اعضای این خانواده از لحاظ ریختی بسیار متنوع می‌باشند، به طوری که امکان اختصاص یک فرم ریختی به یک گونه وجود ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای توصیف گونه‌های جدید در این خانواده علاوه بر ویژگی‌های ریختی تمایز ژنتیکی نیز مورد توجه قرار گیرد.

روستای حوض ماهی دارای استخری مستطیلی شکل به مساحتی در حدود ۲۵ مترمربع است که آب قنات این روستا در آن جمع‌آوری می‌شود. در باور عمومی مردم این روستا ماهیان این استخر دارای قدس بوده و برای تقدیم آن‌ها گندم نذر و به آب استخر می‌ریزند. در بررسی اجمالی صورت‌گرفته از این حوض بیش از هفت گونه در آن یافت شد که از این تعداد حداقل چهار گونه *Alburnus parva*, مرواریدماهی *P. auratus* و یک گونه شناسایی نشده از خانواده Poeciliidae دیده شد (شکل ۶)، که احتمالاً توسط مردم محلی به آن مکان منتقل شده بودند. علاوه بر گونه‌های ذکر شده نیز تعدادی نمونه از گونه‌های *C. gracilis* و *C. coadi* در این استخر یافت شد که پیش از این نیز از حوضه اصفهان گزارش شده بودند.

Niz. Aphanius (2020) Jouladeh-Roudbar *et al.* Aphaniops kruppi را *hormuzensis* در نظر گرفتند. با توجه به موارد تشریح شده به‌نظر می‌رسد در حال حاضر امکان اظهار نظر در مورد سه گونه *Aphanius teimorii*, *Aphaniops kruppi* وجود نداشته باشد زیرا در رابطه با اعتبار گونه‌های *Aphanius teimorii* و ICZN *Aphanius hormuzensis* تصمیم بگیرند و در ادامه گونه معتبر باسایر گونه‌ها مقایسه و اعتبار آن سنجیده شود.

با توجه به درخت تبارشناسی به‌دست آمده توالي‌های نمونه‌های ایستگاه حوض ماهی در کنار هاپلوتاپ‌های گونه پل ورزنه در کنار *Esmaeilius vladaykovi* (چخاخور، بلداجی) و نمونه‌های *E. isfahanensis* قرار گرفتند. بنابراین می‌توان اعلام نمود که حداقل دو گونه *E. vladaykovi* و *E. isfahanensis* اصفهان یافت می‌شوند. نکته قابل تأمل وجود اختلاف ریختی قابل توجه (به‌ویژه در جنس نر) بین نمونه‌های ایستگاه حوض ماهی و چخاخور است، حال آن‌که هر دو جمعیت به یک گونه تعلق دارند. در مطالعات متعددی از ویژگی‌های ریختی و الگوی رنگی این خانواده برای توصیف و شناسایی گونه‌های آن استفاده شده است (Coad, 2009; Freyhof & Yoğurtçuoğlu, 2020) نوارهای عمودی روی پهلوهای جنس نر به عنوان یک ویژگی تشخیصی و تمایزدهنده یاد شده است. اما با توجه به نتایج به‌دست آمده از تعیین توالي ژن COI و *E. vladaykovi* اختلاف ژنتیکی بسیار اندک دو جمعیت ساکن حوض ماهی و چخاخور (شکل‌های ۴ و ۵)، به‌نظر می‌رسد اختلاف ریختی میان دو جمعیت تحت تأثیر محیط بوده و احتمالاً در بین جمعیت‌های دیگر این گونه ویژگی‌های ریختی دارای تغییرات فراوانی باشد. با توجه به مکان‌های صید دو جمعیت به‌وضوح می‌توان مشاهده کرد که حوض ماهی دارای آب

زیبا بوده و این امر انگیزه صید آن‌ها را توسط افراد محلی به جهت نگهداری در حوض و یا آکواریوم بیشتر می‌نماید،^۳ فاصله مکان‌هایی که جمعیت طبیعی این گونه در آن یافت می‌شوند (نظیر بهشت‌آباد، چغاخور، گندمان) به روستای حوض‌ماهی (شکل ۷) بسیار نزدیک است و^۴ کوچک‌بودن اندازه بدن امکان حمل اعضای این گونه را به صورت زنده در فواصل کوتاه تا نسبتاً بلند و بین حوضه‌ای امکان‌پذیر می‌سازد.

REFERENCES

- Alavi-Yeganeh, M.S.; Keivany, Y.; Seyfabadi, J.; Kazemi, B.; Wallis, G. P. (2014). Taxonomic validity and phylogenetic relationships of a newly-described tooth-carp, *Aphanius mesopotamicus* Coad, 2009 (Teleostei: Cyprinodontidae). *Zootaxa.*; 3780: 594-600.
- Betancur, R.R.; Wiley, E.O.; Arratia, G.; Acero, A.; Bailly, N.; Miya, M.; Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC evolutionary biology*; 17: 1-40.
- Coad, B. (2009). A new species of tooth-carp, *Aphanius mesopotamicus*, from Iran and Iraq (Actinopterygii, Cyprinodontidae). *Zookeys.*;31:149-157.
- Coad, B.W. (1998). Systematic biodiversity in the freshwater fishes of Iran. *Italian Journal of Zoology.*; 65: 101-108.
- Coad, B.W. (1980). A re-description of *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) from southern Iran (Osteichthyes: Cyprinodontiformes). *Journal of Natural History*; 14: 33-40.
- Coad, B.W. (1991). Fishes of the Tigris-Euphrates Basin: a critical checklist. *Syllogeus*; 68: 1-49.
- Coad, B.W. (1995). Freshwater Fishes of Iran. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae, Brno*, 29 (1): 1-64.
- Coad, B.W. (2005). Endemicity in the freshwater fishes of Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 1 (1): 1-13.
- Coad, B.W. (2010). Freshwater fishes of Iraq. Sofia and Moscow Pensoft.; 1-275.
- Eschmeyer, W.N.; Fricke, R.; van der Laan, R. (2022). Catalog of Fishes: Genera, Species, References. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Catalog of Fishes electronic version. doi:10.11646/zootaxa.3882.1.1
- Freyhof, J.; Yoğurtçuoğlu, B. (2020). A proposal for a new generic structure of the killifish family Aphaniidae, with the description of *Aphaniops teimorii* (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa.*; 4810: 421-451.
- Freyhof, J.; Kaya, C.; Ali, A. (2021). Chapter 35: A critical checklist of the inland fishes native to the Euphrates and Tigris Drainages. In: Jawad, L. A. (ed.): *Tigris and Euphrates Rivers: their environment from headwaters to mouth*, pp. 815-854; Cham (Springer).
- Freyhof, J.; Weissenbacher, A.; Geiger, M. (2017). *Aphanius kruppi*, a new killifish from Oman with comments on the *A. dispar* species group (Cyprinodontiformes: Aphaniidae). *Zootaxa.*; 4338: 557-573.
- Jouladeh-Roudbar, A.; Ghanavi, H.R.; Doadrio, I. (2020). Ichthyofauna from Iranian freshwater: annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment, *Zoological Studies.*; 59: 0d.
- dr مجموع با توجه به نتایج بدست‌آمده گمان می‌رود حضور گونه *Esmaeilius vladykovi* در حوضه اصفهان به صورت طبیعی اتفاق نیفتاده بلکه توسط افراد محلی به این حوضه منتقل شده است. با بررسی‌های صورت‌گرفته و پرسش از افراد محلی به نظر می‌رسد چند عامل توجیه‌کننده انتقال نمونه‌های این گونه به حوضه اصفهان باشد؛ ۱- صید این ماهیان به وسیله تورهای دستی بسیار ساده است، ۲- از لحاظ زیباشناختی دارای ظاهری

- Jouladeh-Roudbar, A.; Vatandoust, S.; Eagderi, S.; Jafari-Kenari, S.; Mousavi-Sabet, H. (2015). Freshwater fishes of Iran.; an updated checklist. AACL Bioflux.; (8): 855-909.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution; 33: 1870-1874.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics; 23: 2947-2948.
- Miller, S.A.; Dykes, D.; Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research.; 16: 1215-1215.
- Nelson, J.; Grande, T.; Wilson, M. (2016). Fishes of the World, Fifth Edition.
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Silvestro, D.; Michalak, I. (2012). RAxMLGUI: a graphical front-end for RAxML. Organisms Diversity & Evolution 12: 335-337.
- Teimori, A.; Esmaeili, H.R.; Hamidan, N.; Reichenbacher, B. (2020). Comment on “A proposal for a new generic structure of the killifish family Aphaniidae, with the description of *Aphaniops teimorii* (Teleostei: Cyprinodontiformes)” by Jörg Freyhof & Baran Yoğurtçuoğlu, Zootaxa (July 2020) 4810 (3): 421-451. FishTaxa.; 17: 15-16.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.; 360: 1847-1857.