مقایسه ساختار ژنتیکی کپور دندان زاگرس (*Aphanius vladykovi*) در تالاب‌های گندمان و شلمزار در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سیده آمنه حسینی[1*]، علی شعبانی[1]، حمیدرضا رضایی[2]

۱ـ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه شیلات، گرگان، ایران

۲ـ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه محیط زیست، گرگان، ایران

مسئول مکاتبات: Ahossaini.9571@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۱

چکیده

کپوردندان زاگرس (*Aphanius vladykovi*) گونه‌ای کوچک و دارای ارزش بیولوژیکی است. این ماهی بومی ایران در استان چهارمحال و بختیاری بوده و در چشمه‌ها و تالاب‌های این استان زندگی می‌کند. در این پژوهش، جهت بررسی تنوع ژنتیکی این گونه، نمونه برداری از دو منطقه تالاب گندمان و شلمزار، ۲۳ عدد از هر منطقه، انجام شد. ۵ جفت آغازگر ریزماهواره جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت که ۱۰۰٪ چندشکلی نشان دادند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر ۰/۹٦۵ محاسبه شد که از میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار (۰/۸٦۷) بیشتر است. میانگین جریان ژنی و ضریب درون آمیزی به ترتیب برابر ۲۳/۳۳ و ۰/۱۱- به دست آمد. نتایج حاصل از Fst (۱٪) و Rst (۱٤٪) تمایز ژنتیکی بسیار پائین و تنوع درون جمعیتی مناسبی را بین دو جمعیت نشان داد. آنالیز واریانس ملکولی ۱٪ تمایز بین جمعیت‌ها و ۹۹٪ تنوع درون جمعیتی نشان داد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۰/۲۳٦ محاسبه شد. در بررسی تعادل هاردی ـ واینبرگ از میان ۱۰ تست جایگاه ژنی، در ۵ تست، پیروی از تعادل مشاهده شد.

کلمات کلیدی: تالاب گندمان، *Aphanius vladykovi*، ریزماهواره، هتروزیگوسیتی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

کپوردندان‌ماهیان، آبزیان تزئینی زیبایی هستند که در تجارت ماهیان آکواریومی مورد استفاده‌اند، همچنین با خوردن تخم و لاور حشرات آبزی همچون پشه آنوفل که میزبان حد واسطی برای بیماری مالاریا است، در مبارزه با بیماری مالاریا از اهمیت بیولوژیکی فوق‌العاده‌ای برخوردار هستند. ماهی گورخری زاگرس (*Aphanius vladykovi*) گونه بومی کشور ایران بوده و زیستگاه آن چشمه‌ها، رودخانه‌ها و تالاب‌های استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد، اغلب میل گوشتخواری دارد و از سخت‌پوستان ریزی که در محیط زیستشان یافت می‌شود تغذیه می‌کند [۱٦] (شکل ۲).

پیشینه‌ی تحقیقاتی بر روی این ماهی شامل مطالعات محدودی در زمینه‌ی ریخت‌شناسی [۳]، مورفولوژی [٤]، بیولوژی [۱٦]، بیماری [۲۳] و کاریولوژی [۱۲] آن انجام شده است. سال‌های اخیر با کاهش شدید جمعیت‌های این ماهی مواجه شده‌ایم، در مطالعات جدید آزمایشگاهی و تجربی علت افزایش موارد انقراض، به کاهش تنوع ژنتیکی نسبت داده شده است. چندشکلی ژنوم، روشی است که امیدهای زیادی را ایجاد نموده و هر ساله تکنیک‌های جدیدی برای این منظور معرفی می‌شوند [۵]. یکی از مهم‌ترین مارکرهای ژنتیکی که برای توصیف ساختار ذخایر ماهیان به‌کار می‌رود، میکروستلایت‌ها (واحدهای تکراری ۲-٤ نوکلئوتیدی) هستند که تفاوت در تعداد واحدهای تکرار شونده‌ی آن‌ها باعث ایجاد تنوع می‌گردد [۷]. میکروستلایت‌ها به علت تنوع پذیری بالایی که دارند به عنوان نشانگرهای مولکولی توانمند، کاربردهای فراوانی در مباحثی چون تعیین تبار ماهیان [۱۱] ژنتیک جمعیت، حفظ منابع طبیعی و مدیریت منابع

بیولوژیکی دارند [۲۸]. بررسی تنوع ژنتیکی چندین گونه از آبزیان با اهمیت و اقتصادی آب‌های دریای خزر مانند ماهی سفید، کلمه، اوزون برون، تاسماهی روسی، گاوماهی خزری، کپور معمولی و همچنین دریای عمان و خلیج فارس مانند قباد، سوکلا و غیره طی سال‌های اخیر با مارکرهای میکروستلایت انجام شده است [۲]. نظر به کاهش سالانه جمعیت‌های این ماهی در استان چهارمحال و بختیاری و با توجه به ارزش بیولوژیکی و زینتی *Aphanius vladykovi* بررسی تنوع ژنتیکی این موجود جهت درک میزان ذخایر و حفاظت از آن امری ضروری به شمار می‌آید چرا که تنوع ژنتیکی گونه‌ها یا جمعیت‌ها، نتیجه‌ی تاریخ تکاملی آن‌ها محسوب می‌شود و کاهش آن ممکن است پتانسیل سازگاری و بازماندگی در شرایط محیطی متغیر را کاهش دهد [۱٤]. جوامع مورد بررسی تحت شرایط نامناسبی به سر می‌برند از آن جمله آلودگی و خشک شدن منابع آبی در سال‌های اخیر و حتی ابتلای شدید به بیماری ایک در هر دو زیستگاه مورد بررسی است. تالاب گندمان که با ارتفاع ۲۲۲۰ متر از سطح دریا به عنوان بلندترین تالاب بین‌المللی کشور، یکی از ۱۰ تالاب برتر در ایران بوده که در دفتر بین المللی تحقیقات پرندگان آبزی لندن به ثبت رسیده بود، این تالاب به علت بهره برداری بیش از حد از منابع آبی و حاشیه تالاب، تأمین نشدن حق‌آبه آن از طریق سد چغاخور و خشکسالی، آسیب‌های زیست‌محیطی زیادی متحمل شده است که طبیعتاً روی جمعیت ماهی *آفانیوس* نیز بسیار تأثیرگذار است چرا که حتی تولیدمثل *آفانیوس* وابسته به گیاهان آبزی است که با کاهش سطح آب و آلودگی، دچار نابودی می‌شوند. در این مطالعه به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آن در دو منطقه، تالاب گندمان و شلمزار پرداخته شده است.

مواد و روش کار

بررسی مناطق و نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از ۲۳ عدد ماهی آفانیوس زاگرس در هر منطقه، تالاب گندمان در ٤ کیلومتری شهرستان گندمان با موقعیت جغرافیایی N ″ ٤٧.٠٤ □٣١°٤٩ و E ″٢٧.٢٦□٥١°٠٤ و تالاب شلمزار که آن را دریاچه شلمزار می‌گویند، در نزدیکی شهرستان شلمزار با موقعیت جغرافیایی N ″٢٢.٦٩□٣٢°٠١ و E ″٢٢.٧٢□٥٠°٤٩ در پاییز سال ۱۳۹۰ صورت گرفت (شکل ۱). باله‌ی پشتی در اتانول مطلق فیکس شده و برای مطالعات ژنتیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید.

شکل ۱ـ مناطق نمونه‌برداری *آفانیوس* در استان چهارمحال و بختیاری، تالاب گندمان و تالاب (دریاچه) شلمزار

درنهایت ژل‌ها به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند [۲٤]. عکس‌برداری از ژل‌ها توسط دستگاه مستندساز ژل (Gel Doc XR, BIO-RAD) انجام شد و از نرم‌افزار Gel-Pro Analyzer 6.0 برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید.

آنالیز آماری: آنالیزهای مربوط به ساختار ذخایر ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل موثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) و تست انحراف از تعادل هاردی ـ واینبرگ توسط نرم‌افزار GenAlex 6.3 [۲۱] محاسبه و با استفاده از ضریب بونفرونی تصحیح شد. مطالعه Fst و Rst نیز با استفاده از آزمون AMOVA در نرم‌افزار GenAlex 6.3 صورت گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم [۱۵] صورت گرفت. DNA استخراجی در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: پنج جفت آغازگر میکروستلایت شامل BA9، AC4، CmD1، [۲۵]، BL2-114 [۱۰] و GGM024 [۱۹] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر یک از آغازگرها انجام شد و دمای بهینه برای هر یک به دست آمد (جدول ۱). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ جداسازی شده و

جدول ۱ـ خصوصیات جایگاه‌های ژنی مورد استفاده در این بررسی

لوکوس	توالی آغازگر	دمای اتصال	وزن
BA9(F)	F:CACGCTCCTTTGGGGAAGCCTA R:GCCGTCTGCCTGTTTGCCTTTATC	۶۲	۲۵۰-۳۶۳
CmD1(F)	F:AATGGATGGTGTGAATGGC R:GGATGGATACAGAGCAGCAC	۵۵	۱۶۸-۲۲۵
AC4(T)	F:CTGCTGCAGTCTGCAC R:TCACCTCCAAGGTTAGTCAT	۴۴	۱۳٤-۱۶۲
BL2-114	F:ATCACTGCCATTTTATTA R:CTGCTCCGCTCTGTTCCA	۵۰	۲۸۸-۳۸۰
GGM024	F:TCCCTCTTTTTGGTCTCAGG R:TAGGTGAACAAATGGCATGG	۵۵	۱٤۰-۱۸۲

نتایج

از پنج جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی در کپوردندان زاگرس، هر پنج جفت پلی‌مورفی را نشان دادند که جزئیات محاسباتی در جدول ۲ آورده شده است. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در تالاب گندمان و شلمزار به ترتیب ۱۲ و ۱۱/۸۰ محاسبه شد. حداکثر تعداد آلل مشاهده شده مربوط به جایگاه ژنی BA9(F) با ۲۱ آلل در جمعیت گندمان و حداقل مربوط به جایگاه GGM024 و AC4 با ۷ آلل در هر دو جمعیت دیده می‌شود. در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۷۸۳ تا ۱، با میانگین ۰/۹٦۵ بود که در این بین

Ho جایگاه AC4 در جمعیت تالاب گندمان و تالاب شلمزار به ترتیب برابر ۰/۹۵۷ و ۰/۷۸۳ در جایگاه BL2 در جمعیت تالاب شلمزار برابر ۰/۹۱۳ محاسبه شد و سایر مقادیر Ho برای دیگر جایگاه‌ها برابر ۱ بود. دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۸۱۳ تا ۰/۹٤۱ با میانگین ۰/۸٦۷ به دست آمد که بیشترین مقدار مربوط به جایگاه ژنی BA9 در جمعیت گندمان و کمترین مقدار مربوط به جایگاه AC4 در جمعیت شلمزار محاسبه شد.

نکته‌ی قابل توجه در این جمعیت‌ها نسبت جنسی نر ماده است، به گونه‌ای که نرها تقریباً ۲۵٪ جمعیت و ماده‌ها ۷۵٪ جمعیت را تشکیل می‌دهند. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای تمام جایگاه‌های ژنی انجام شد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، پس از اعمال ضریب تصحیح بونفرونی، از میان ۱۰ تست جایگاه ژنی، در ۵ تست، پیروی از تعادل مشاهده شد. شاخص درون آمیزی (Fis) برابر ۰/۱۱٤- و میانگین جریان ژنی بر اساس آزمون AMOVA برابر ۲۳/۳۳٤ به دست آمد. تمایز بین مناطق توسط شاخص Fst و Rst بر اساس آنالیز واریانس ملکولی (AMOVA) محاسبه گردید و مقدار Fst برابر ۰/۰۱۰ و Rst برابر ۰/۱٤٥ به دست آمد. همچنین آنالیز واریانس ملکولی طبق شکل ۳ تمایز بین جمعیت‌ها را بر اساس معیار Fst، ۱٪ و درون جمعیت‌ها را ۹۹٪ نشان داد. این نمودار نشان می‌دهد که در بین این دو منطقه تمایز ساختار ژنتیکی بارزی وجود ندارد اما دارای تنوع درون جمعیتی بالایی هستند.

بر اساس Nei (۱۹۷۲) میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین مناطق نیز طبق جدول ٤ به ترتیب ۰/۷۹۰ و ۰/۲۳٦ به دست آمد.

شکل ۲ـ کپور دندان زاگرس (*Aphanius avladykovi*): الف) جنس نر، ب) جنس ماده.

جدول ۲ـ تنوع ژنتیکی ۵ جایگاه ژنی مورد مطالعه در جمعیت‌های کپوردندان زاگرس

		BL2-114	CmD1(F)	BA9(F)	AC4(T)	GGM024
تالاب گندمان	Na	۱۷	۸	۲۱	۷	۷
	Ne	۱۲/۰۲۳	۵/۶۲۸	۱۷/۰۶۵	۵/۵۶۸	۵/۷۵۰
	Ho	۱	۱	۱	۰/۹۵۷	۱
	He	۰/۹۱۷	۰/۸۲۲	۰/۹۴۱	۰/۸۲۰	۰/۸۲۶
	Fis	-۰/۰۹۱	-۰/۲۱۶	-۰/۰۶۲	-۰/۱۶۶	-۰/۲۱۱
	pHw	ns	**	ns	*	ns
تالاب شلمزار	Na	۱۶	۱۴	۱۵	۷	۷
	Ne	۱۰/۳۷۳	۱۰/۰۷۶	۱۰/۵۸۰	۵/۳۴۳	۵/۶۸۸
	Ho	۰/۹۱۳	۱	۱	۰/۷۸۳	۱
	He	۰/۹۰۴	۰/۹۰۱	۰/۹۰۵	۰/۸۱۳	۰/۸۲۴
	Fis	-۰/۰۱۰	-۰/۱۱۰	-۰/۱۰۴	۰/۰۳۷	-۰/۲۱۳
	pHw	ns	***	***	ns	***

Na: تعداد آلل، Ne: تعداد آلل مؤثر، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی مورد انتظار، Fis: ضریب درون آمیزی،تست احتمال هاردی ـ واینبرگ بعد از ضریب تصحیح بونفرونی (ns: عدم معنی داری،۰/۰۵≤ P *، ۰/۰۱≥P **، ۰/۰۰۱≥P ***)

جدول ۳ـ میزان جریان ژنی (Nm) و تمایز (Fst) در جایگاه های ژنی مورد بررسی

لوکوس	BL2-114	CmD1(F)	BA9(F)	AC4(T)	GGM024	میانگین
Nm	۱۸/۵۱۹	۷/۹۲۵	۲۷/۹۱۴	۵۰/۸۲۴	۱۱/۴۸۷	۲۳/۳۳۴
Fst	۰/۰۱۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۲۱	۰/۰۱۶

شکل ۳ـ چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی مشاهده شده تحت معیار Fst

جدول٤ـ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی (عدد بالای قطر مربوط به فاصله ژنتیکی و زیر قطر مربوط به شباهت ژنتیکی است)

منطقه	تالاب گندمان	تالاب شلمزار
تالاب گندمان		۰/۲۳٦
تالاب شلمزار	۰/۷۹۰	

بحث

حفظ تنوع زیستی هدف اصلی زیست شناسان تکاملی و حفاظت است [١٤]. تنوع ژنتیکی، هم تنوع درون نژادی و هم تنوع بین نژادی را شامل می‌شود. تنوع درون نژادی پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است ولی تنوع ژنتیکی بین نژادی را نمی‌توان براحتی بازسازی نمود. هر نژاد یا سویه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است. فشار انتخاب در طی این زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل‌ها و بیماری‌های بومی، تغذیه و معیارهای وضع شده از سوی انسان تغییر می‌کرده است. بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژن‌هاست که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند [٢٦]. در دهه گذشته نشانگرهای ریزماهواره بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند .علت اصلی کاربرد این نشانگر، قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه و تحلیل-های جمعیتی و همچنین مطالعات اکولوژیکی می‌باشد. تنوع زیاد، قابلیت رتبه‌دهی آسان، همبارز بودن و پراکندگی یکنواخت در سراسر ژنوم از دلائل عمده کاربرد وسیع این نشانگرها محسوب می‌شود.

بررسی هتروزیگوسیتی دارای اهمیت است چرا که هتروزیگوت‌ها ناقل آلل‌های متفاوتی هستند که نشان-دهنده تنوع و سازگاری با شرایط متغیر محیطی است [٦ و ٨] میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۹٦۵ برآورد شد که نشان دهنده‌ی سطح بالایی از هتروزیگوسیتی در هر دو جمعیت بود. فراوانی هتروزیگوت‌ها از این جهت اهمیت دارد که هر هتروزیگوت ناقل آلل‌های متفاوتی است و این نشان دهنده وجود تنوع می‌باشد. به همین دلیل معمول‌ترین معیار تنوع ژنی در یک جمعیت میزان هتروزیگوسیتی است [٢٢].

در بررسی حاضر میانگین تعداد آلل مشاهده شده در جمعیت تالاب گندمان و شلمزار به ترتیب برابر ۱۲ و ۱۱/۸۰ به دست آمد، تعداد آلل و هتروزیگوسیتی می‌تواند تحت تأثیر تعداد نمونه و منطقه‌ی هدف نیز باشد [۹] در واقع یکی از مزایای میکروستلایت‌ها این است که اگر تعداد آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای بسیار زیاد باشد (هرچه جایگاه ها چند شکل تر باشند)، با تعداد نمونه کم نیز می‌توان تغییرپذیری ژنتیکی را بررسی نمود. در مجموع تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) از نظر تعداد آلل و هتروزیگوسیتی بین مناطق مورد بررسی مشاهده نشد [۲۰].

بر اساس معیار Wright (۱۹۸۷) مقادیر Fst بین ۰ – ۰/۰۵ نشان‌دهنده‌ی تمایز پایین میان نمونه‌هاست و در جمعیت‌های مورد بررسی، معیار Fst، میزان ۰/۰۱ تمایز بین جمعیت‌ها نشان داد که بسیار اندک است، دلایل مشخصی برای آن یافت نشد اما یکی از دلایل اصلی می-تواند کوچک بودن جمعیت باشد، در جوامع کوچک موجودات، به دلیل خطای نمونه‌برداری رانش سبب کاهش تنوع می‌گردد [۱ و ۲۷]. آلل‌ها به میزان متفاوتی از رانش ژنی و انتخاب طبیعی متأثر می‌شوند و این به اندازه جمعیت بستگی دارد. زمانی که جمعیت‌ها خیلی کوچک

هستند رانش غالب خواهد بود و ممکن است آلل‌های مطلوب را حذف وآلل‌های غیرمطلوب را حفظ کند. اثرات انتخابی ممکن است دیده نشوند، چون تغییرات کوچکی که در فراوانی آلل‌ها به وجود می‌آورند، توسط رانش تحت‌الشعاع قرار می‌گیرد.

رانش ژنتیکی، درون آمیزی و کاهش جریان ژنی می‌تواند تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کوچک و مجزا را کاهش دهد. در واقع زیست‌شناسان حفاظت اهمیت زیادی نسبت به آگاهی از اندازه جمعیت قائل‌ند زیرا جمعیت‌های کوچک می‌توانند با بی‌ثباتی محیط زیست، تغییرات جمعیتی اتفاقی، فقدان زیستگاه مناسب تولیدمثل و فشار درون-آمیزی به طور جدی تحت تأثیر قرار گیرند [١٤]. در جمعیت‌های *آفانیوس* نسبت جنسی نابرابر وجود داشته که سبب کاهش اندازه مؤثر جمعیت می‌شود و کاهش اندازه مؤثر متعاقباً سبب بروز تنگنای ژنتیکی خواهد شد [١٨].

در بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، ۵۰٪ جایگاه‌ها پیروی از تعادل و ۵۰٪ خروج از تعادل را نشان دادند. انحراف از تعادل در این جمعیت‌ها می‌تواند بر اساس کوچکی جمعیت، رانش ژنتیکی و احتمالاً آمیزش غیر تصادفی باشد البته احتمال دارد انتخاب طبیعی در این امر دخیل باشد که ممکن است به دلیل ابتلای شدید این ماهیان به بیماری ایک و در نتیجه انتخاب ماهیان مقاوم به بیماری توسط طبیعت باشد.

نکته قابل توجه در اینجا این است که با اینکه این جمعیت‌ها از نظر جغرافیایی کاملاً از هم جدا هستند اما جریان ژنی زیادی بین آن‌ها برآورد شده است که می‌تواند به دلیل شباهت فضای زیستگاه، محل‌های تخمریزی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی یکسان آب در دو منطقه باشد.

از دیدگاه حفاظت، تشخیص تغییرات چشمگیر اخیر در اندازه‌ی جمعیت (تنگناهای جمعیت) یکی از جنبه‌های مهم هر برنامه نظارت بر جمعیت است [۱۳]، علائم تنگناهای گذشته‌ی جمعیت را می‌توان با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنتیک ملکولی شناسایی کرد، به عنوان مثال یکی از روش‌های معمولی که استفاده می‌شود این است که فرض می‌شود جمعیتی که در اندازه‌ی Ne کاهش داشته، کاهش در هتروزیگوسیتی و تعداد آلل در جایگاه‌های پلی‌مورفی دارد. هر چند که کاهش در تعداد آلل سریعتر از کاهش در هتروزیگوسیتی است بنابراین در تنگناهای ژنتیکی اخیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیش از هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تعادل است در حالی که تعداد آلل مشاهده شده کمتر از مقدار فرض شده برای اندازه‌ی پایدار جمعیت محاسبه می‌شود [۱۷].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، احتمالاً یک جمعیت از ماهی گورخری زاگرس در مناطق مورد بررسی وجود دارد، نتایج به دست آمده از این پژوهش ممکن است به سبب تعداد پرایمر، اختصاصی نبودن پرایمرها و یا رانش ژنتیکی در پی نمونه برداری، محدود باشد، بنابراین داده‌های ژنتیکی و آنالیزهای بیشتری برای تأیید وجود یا عدم وجود تفاوت‌های ژنتیکی بیشتر بین ذخایری که تفاوتی نشان نداده‌اند نیاز است. امید است که موفقیت در انجام تکثیر مصنوعی *آفانیوس* زاگرس و رسیدگی به زیستگاه‌های آن در دامنه‌ی زاگرس و احیای تالاب بین‌المللی گندمان که از جمله زیستگاه‌های اصلی *آفانیوس* است، به حفاظت از این گونه‌ی بومی و ارزشمند کمک کرده و آن را از خطر انقراض نجات دهد.

منابع

۱- امینی، ف. ۱۳۸۸. مبانی ژنتیک، اصلاح نژاد و بیوتکنولوژی ماهیان. انتشارات جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ویرایش دوم، ٤٤٢ صفحه.

۲- حسینی، س. ا. و شعبانی، ع. ۱۳۹۱. روش‌های تعیین تنوع ژنتیکی آبزیان در سطح DNA با تأکید بر مارکر میکروستلایت. اولین همایش ملی شیلات و آبزیان ایران، بندرعباس.

۳- کیوانی، ی. ۱۳۸۲. بررسی استخوان‌های سطحی سر ماهی کپور دندان زاگرس. مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۵(۳): ۲۵-۳۰.

٤- مردانی کرانی، م. شیدایی، م. و پازوکی، ج. ۱۳۸٦. بررسی مورفولوژیک و مریستیک جمعیت‌های محدود ماهی گورخری (*Aphanius vladykovi*, Coad 1988) در استان چهارمحال و بختیاری. مجله زیست شناسی ایران، ۲۰(٤): ٤٤٧-٤٥٧.

٥- هاشم‌زاده سقرلو، ا. ۱۳۸٤. اصول و روش های مطالعات ژنتیکی ماهیان. انتشارات نقش مهر ، تهران، ٤٤٨ صفحه.

6- Beardmore, J.A., G.C Mair, R.I. Lewis (1997), Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Resourse* , 28: 829- 839.

7- Beaumont, A.R., K. Hoare (2003), Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. University of Wales, Bangor, UK. Blackwell Science Ltd, p.p: 158.

8- Ciftci, Y., I. Okumus (2002), Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. *Fisheries and Aquatic Science*, 2: 145-155.

9- Crooijmans, R.P.M.A., V.A.F. Bierbooms, J. Komen, J.J. Van Der Poal, M.A.M. Groenen (1997), Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal genetics*, 28: 129-134.

10- Dubut, V., J. Martin, C. Costedoat, R. Chappaz, A. Gilles (2009), Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the freshwater fishes Telestes souffia and Telestes muticellus (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Resources*, 9 (3): 1001-1005.

11- E-Reith, M.R., T. Jackson, M. Robichaud (2004), Genetic improvement, avoiding genetic bottlenecks in bloodstock selection .*Global aquaculture advocate*: 57-58.

12- Esmaeili, H.R., M. Ebrahimi, A. Teimori, H. Ansari (2009), first karyological analysis of an endemic fish, Zagros Tooth-carp, *Aphunius vladykovi* Coad 1988 (Actinopterygii: Cyprinodntidae) from Iran. *Science and Technology*, 4: 33.

13- Frankham, R. (1995), Effective population size/ adult population size ratios in wildlife: *A Review of Genetical Research,* 66: 95-107

14- Frankham, R., J.D. Ballou, D.A. Briscoe (2004), A primer of conservation genetics, Cambridge University Press, pp: 236.

15- Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S.K. Davis, E.A. Zimmer (1996), Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: Molecular Systematics (eds. Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. K.) Sinauer Associates press, Sunderland, 321-384.

16- Keivany, Y., N.M. Soofiani, (2004), Contribution to the biology of Zagros tooth-carp, *Aphanius vladykovi* (Cyprinodontidae) in central Iran. *Environmental Biology of Fishes,* 71: 165–169.

17- Luikart, G., J.M. Cornuet (1997), Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology,* 12: 228-237.

18- Machado–Schiaffino, G., E. Dopico, E. Garcia–Vazquez (2007), Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture*, 264: 59–65.

19- Matura, R., S. Sharma, A. Barat, V. Pande, P.C. Mahanta (2012), Development and characterization of microsatellite markers in *Gara gutyla* (Family: Cyprinidae, Pisces). *Molecular Ecology Resourses*, 12 (1): 185-189.

20- O'Reilly, P., J.M. Wright (1995), The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Fish Biology*, 47(Suppl. A): 29-55.

21- Peakall, R., P.E. Smouse (2006), Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
22- Plomion, C.H., J. Bousquet, C.H. Kole, (2011), Genetics, Genomics and breeding of Conifers. CRC press, *Science Publishers*, 449: 171-172.
23- Raissy, M., A. Namjoo, M. Ansari (2011), Histopatological changes in the Eyes of *Aphanius vladykovi* (Teleostei: Cyprinodontidae) Infect with *Ornithodiplostomum* sp. *Global Veterinaria*, 7(2): 175-178.
24- Sambrok, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989), Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press, 743-745.
25- Strecker, U. (2006), Genetic difrentation and reproductive isolation in a Cyprinodon fish species Xock from Laguna Chichancanab, Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 865–872.
26- Templeton, A.R. (2004), Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789–809.
27- Wright, S. (1978), Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural population. Chicago; University of Chicago press. pp: 390.
28- Zane, L., L. Borgelloni, T. Patariollo, (2002), Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.