

مقاله پژوهشی

## جایگاه فیلوژنتیکی جنس *Aphanius* Nardo, 1827 بر اساس توالی یابی ژنوم کامل میتوکندریایی (ماهیان استخوانی؛ کپورماهیان دندان دار)

آزاد تیموری<sup>۱\*</sup>، مینا معتمدی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: فروردین ۹۹

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۹

### چکیده

خانواده کپورماهیان دندان دار متعلق به راسته کپورماهی شکلان دندان دار (ماهیان استخوانی عالی) است و ماهیان کوچکی را شامل می‌شود که غالباً ارزش زیباشناسی، کنترل بیولوژیکی و ارزش اکولوژیکی و زیست‌پزشکی دارند. برای مدت زمان طولانی کپورماهی دندان دار *Aphanius* در خانواده Cyprinodontidae قرار داشت. اما بر اساس مطالعات مولکولی، این جنس اخیراً در خانواده‌ای مجزا به نام Aphaniidae قرار گرفته است. به منظور ارزیابی اعتبار فیلوژنتیکی خانواده جدید Aphaniidae بر اساس ژنوم کامل میتوکندریایی، تعداد هفت خانواده از راسته کپورماهی شکلان دندان دار انتخاب و روابط فیلوژنتیکی آنها ترسیم و تجزیه و تحلیل شد. درخت فیلوژنی بر اساس داده‌های بانک ژنی و نیز ژنوم کامل میتوکندریایی گونه کپورماهی دندان دار فارسی (*Aphanius farsicus*) به عنوان نماینده خانواده Aphaniidae رسم شد. نتایج نشان داد که رابطه فیلوژنتیکی نزدیکی بین جنس *Aphanius* (از خانواده Aphaniidae) و جنس *Cyprinodon* از خانواده (Cyprinodontidae) وجود دارد، به طوری که خانواده Aphaniidae با خانواده Cyprinodontidae گروه پارافیلتیک را تشکیل می‌دهند. بنابراین و با توجه به نزدیکی این دو جنس با یکدیگر، قرار دادن جنس *Aphanius* در خانواده‌ای مجزا به نام Aphaniidae نیاز به مطالعه بیشتری دارد که با افزودن توالی‌های بیشتر از اعضای جنس *Aphanius* قابل بررسی است.

واژگان کلیدی: *Aphanius*, *Cyprinodontidae*, *Aphaniidae*. میتوژنوم.

۱- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

\* نویسنده مسئول: [a.teimori@uk.ac.ir](mailto:a.teimori@uk.ac.ir)

## مقدمه

مناطق گسترده‌ای از اوراسیا از جمله ایران پراکنده شده‌اند (Wildekamp, 1993).

راسته کپورماهی شکلان دندان‌دار شامل ۱۱ خانواده (Anablepidae, Aplocheilidae, Aphaniidae, Cyprinodontidae, Fundulidae, Goodeidae, Nothobranchiidae, Poeciliidae, Profundulidae, Rivulidae و Valenciidae)، حدود ۱۰۹ جنس و حداقل ۱۰۰۰ گونه است (Nelson et al., 2016).

از بین این ماهیان، جنس گورخرماهی (*Aphanius*)، تنها عضو از این راسته است که در ناحیه غرب پالئارکتیک شامل حوضه‌های آبریز اطراف دریای مدیترانه، دریای سرخ، خلیج فارس و نیز آب‌های داخلی به ویژه ترکیه و ایران یافت می‌شود (Wildekamp, 1993). تا سال ۲۰۱۷، این جنس در خانواده کپورماهیان دندان‌دار (Cyprinodontidae) قرار داشت (Freyhof et al., 2017). اما نتایج مطالعات مولکولی اخیر (Pohl et al., 2015; Helmstetter et al., 2016; Reznick et al., 2017)، برخی از پژوهشگران را متقاعد کرد که این خانواده به خاطر قرار گرفتن جنس *Aphanius* در آن، یک گروه پارافیلتیک

راسته کپور ماهی شکلان دندان‌دار (Cyprinodontiformes)، شامل ماهیانی با اندازه کوچک، تخم‌گذار و همچنین ماهیان زنده‌زا (Live-bearers) است (Nelson et al., 2016). شناسایی سیستماتیک این راسته به سال ۱۸۲۸ برمی‌گردد که توسط واگنر شناسایی شد و تا به امروز به عنوان راسته کپورماهی شکلان دندان‌دار شناخته شده است. ماهیان این راسته بر اساس چندین ویژگی شناخته می‌شوند که شامل یک باله پشتی معمولاً بدون خار، دهان انتهایی و فوقانی، دندان‌های آرواره‌ای، فاقد سبیلک، سر پهن، اندازه بدن کوچک (کمتر از ۱۵ سانتی‌متر) است و عموماً همه چیزخوار هستند (Wildekamp, 1993; Nelson et al., 2016). تاکنون مطالعات زیادی بر روی اعضای این راسته انجام و متعاقباً چندین بازبینی تاکسونومیکی صورت گرفته است. از سال ۲۰۰۲، کپورماهی شکلان دندان‌دار یک گروه طبیعی تک‌نیا (Monophyletic) در نظر گرفته شده‌اند (Nelson et al., 2016). این راسته دارای تعدادی خانواده است که غالباً در آمریکای جنوبی، مکزیک و آمریکای شمالی و نیز در

2006; Esmaeili et al., 2010, 2014; Teimori et al., 2011, 2014, 2018). علاوه بر این، مطالعات اخیر بر روی گونه کپورماهی دندان‌دار هرمزی (*Aphanius hormuzensis*) در ایران نشان داده است که این ماهیان می‌توانند به عنوان مدلی مناسب در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند (Zeinali and Motamedi, 2017; Iranmanesh and Motamedi, 2018; Motamedi et al., 2021). در مطالعه حاضر، اعتبار فیلوژنتیکی خانواده Aphaniidae بر اساس توالی‌یابی ژنوم کامل میتوکندریایی ارزیابی شده است.

#### مواد و روش‌ها

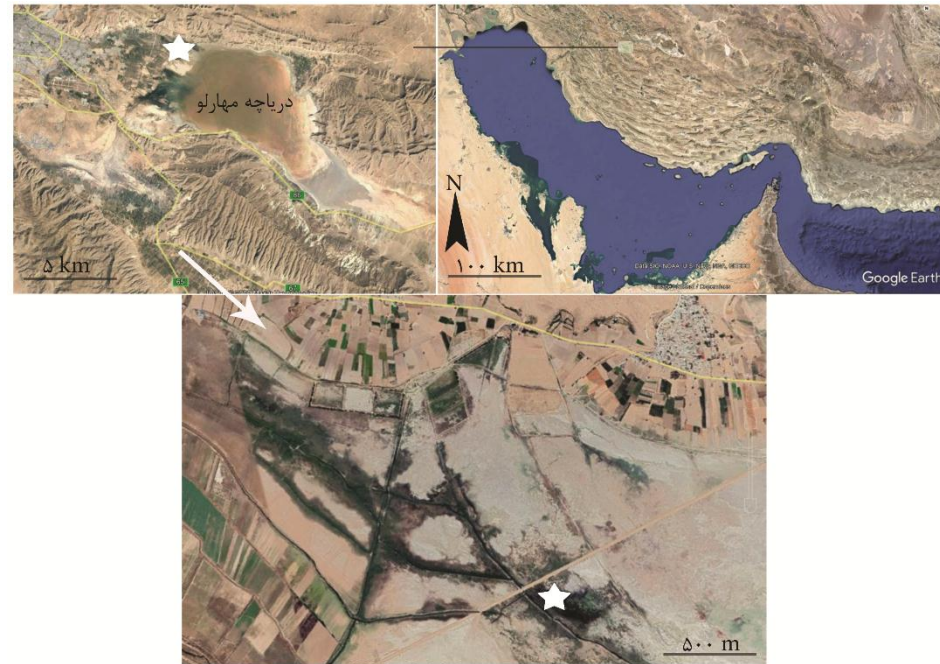
##### جمع‌آوری نمونه

کپورماهی دندان‌دار فارسی (*Aphanius farsicus*) به تعداد ۵ قطعه با استفاده از تور دستی از چشمه‌ای در نزدیکی دریاچه مهارلو واقع در استان فارس (N ۲۷° ۴۲' ۳۲" و E ۵۲° ۴۴' ۵۲/۰۷") جمع‌آوری شد (شکل ۱). با توجه به این که کلید شناسایی ریختی قطعی برای کپورماهیان دندان‌دار ایران در دسترس نیست، بنابراین شناسایی اولیه آن‌ها بیشتر بر اساس رنگ‌بندی خارجی بدن، محل پراکنش آن‌ها و در نهایت داده‌های مولکولی انجام می‌شود. از این رو، در مطالعه حاضر نیز

(Paraphyletic) است. از این رو، جنس *Aphanius* از خانواده Cyprinodontidae جدا و در خانواده جدیدی به نام Aphaniidae (Freyhof et al., 2017) قرار داده شد.

در حال حاضر و با تعریف جدید، خانواده Aphaniidae شامل ماهیان کوچک با طول حداکثر ۷۰ میلی‌متر است. جنس *Aphanius* که معمولاً به عنوان کپورماهی دندان‌دار (و در ایران با نام گورخرماهی) شناخته می‌شود (Wildekamp, 1993)، متعلق به دنیای قدیم است (منطقه غرب پالئارکتیک) و تا به امروز ۴۴ گونه معتبر از این جنس شناسایی شده است (Fricke et al., 2019). بیشترین تنوع گونه‌ای این جنس در منطقه غرب پالئارکتیک مربوط به آب‌های داخلی ترکیه و به ویژه ایران است (Hrbek and Meyer, 2003; Nelson et al., 2016; Teimori et al., 2018). در ایران تاکنون ۱۵ گونه از این جنس توصیف شده است که ۱۳ گونه آن اندمیک (بومزاد) این کشور هستند. در سال‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای توسط پژوهشگران داخلی بر کپورماهیان دندان‌دار ایران انجام شده است. این مطالعات جنبه‌های مختلفی از جمله زیست‌شناسی تولیدمثلی، تاکسونومی و به ویژه روابط و تاریخ تکاملی آن‌ها را دربرمی‌گیرد (Hrbek et al.,

شناسایی اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده با مشاهده رنگبندی آن‌ها و همچنین پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها انجام شد (شکل ۲). بر اساس مطالعات قبلی، پراکنش گونه کپورماهی دندان‌دار فارسی تنها محدود به حوضه مهارلو است (Teimori et al., 2011).



شکل ۱: موقعیت دریاچه مهارلو در نزدیکی شیراز. محل نمونه‌برداری کپورماهی دندان‌دار فارسی (*Aphanius farsicus*) با ستاره مشخص شده است (Google Map)



شکل ۲: تصویر نر (بالا) و ماده (پایین) کپورماهی دندان‌دار فارسی (*Aphanius farsicus*)

کپورماهی دندان‌دار فارسی (*Aphanius farsicus*) به عنوان نماینده خانواده Aphaniidae ترسیم شد.

طراحی آغازگر، تکثیر DNA میتوکندریایی و تعیین توالی

ژنوم میتوکندریایی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بلند (Long-PCR Technique) تکثیر شد (Miya et al., 2001). سپس شش جفت آغازگر (جدول ۱)، بر اساس ترازبندی‌های چندگانه (Multiple

به منظور ارزیابی اعتبار فیلوژنتیکی خانواده جدید Aphaniidae بر اساس توالی‌یابی ژنوم کامل میتوکندریایی، تعدادی از اعضای راسته کپورماهی شکلان دندان‌دار (شامل ۷ خانواده) انتخاب شد و روابط فیلوژنتیک آن‌ها ترسیم و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. درخت فیلوژنی بر اساس داده‌های بانک ژنی از جمله *Orestias oscotanensis* (NC-027582) و *Jordanella floridae* (AP006778) و *Cyprinodon nevadensis amargosae* (KU883631) و نیز ژنوم کامل میتوکندریایی

Alignment) از مناطق حفاظت شده میتوکندریایی میسر شود (جدول ۱). برای (Conserve) از توالی‌های کپورماهیان دندان‌دار دیگر متعلق به راسته کپورماهی‌شکلان دندان‌دار استخراج شده از سایت بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) طراحی شد. سپس تعداد ۲۵ آغازگر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) معمولی طراحی شد که در بخش‌هایی با یکدیگر همپوشانی داشتند تا به این وسیله امکان استخراج تمامی بخش‌های ژنوم

میتوکندریایی میسر شود (جدول ۱). برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/p/rimmer-blast/>) استفاده شد و آغازگرها توسط شرکت دنایست (مشهد، ایران) و پیشگام (تهران، ایران) ساخته شدند. به منظور اطمینان از دقت تعیین توالی، در طراحی آغازگرها برای هر قطعه پشت سر هم به اندازه ۵۰ جفت باز همپوشانی انجام شد.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بلند

آغازگر	توالی نوکلئوتیدها (۵'-۳') و محل آن‌ها	طول محصول (bp)	دمای اتصال (°C)
AF-S1F	176 CTGGTATCAGGCACGCCTTTG 196	۳۵۰۸	۵۷
AF-S1R	3665 CTGTGGCAATAAGGGCGAGG 3684		
AF-S2F	3660 CAACACCTCGCCCTTATTGC 3679	۳۳۱۰	۵۵
AF-S2R	6950CTCCACGTTAGTGGCTGTAA 6970		
AF-S3F	6872 TCCCTAGTAGCCGTAATCATGTTCC 6896	۴۰۲۱	۵۷
AF-S3R	10873 GCTTTGGTATGTCAGGAGGGC 10893		
AF-S4F	10869 TGTAGCCCTCCTGACATACCAAAG 10892	۲۶۶۰	۵۸
AF-S4R	13505 GGAGGTGAGTGAACGAAGTTGTAGG 13529		
AF-S5F	13504 CCCTACAACCTCGTTCACCTC 13528	۱۸۹۶	۵۸
AF-S5R	15379 GGAAGTGTGTTACGGGACGGAA 15400		
AF-S6F	15375 AACCTCCGTCCCGTAACACAG 15396	۱۳۴۱	۵۸
AF-S6R	190 GGTGTTATGGGCTGCAAAGGC 210		

دمایی طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. شش قطعه DNA میتوکندری با بازه طولی ۱/۳kbp (کیلو جفت باز) تا ۴kbp تکثیر و به عنوان DNA الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، مورد استفاده قرار گرفت. در این فرایند از DNA تک پلیمرز 2x Master Mix RED (Ampliqon، دانمارک) استفاده شد. در این مطالعه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی مطابق با روش استاندارد انجام شد. مخلوط واکنش برای به دست آوردن حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس DNA تک پلیمرز، ۱ میکرولیتر از قطعه میتوکندری تکثیر شده (به دست آمده از واکنش بالا)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) (غلظت ۱۰ میکرومولار) و در نهایت آب مقطر استریل بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معمولی شامل یک مرحله واسرشته کردن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشته کردن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴-۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵

به منظور تکثیر ژنوم میتوکندریایی، در ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مسترمیکس (Super PCR MasterMix 2X؛ یکتا تجهیز آزما، ایران) و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ صورت گرفت. این واکنش‌ها در مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Super PCR MasterMix 2X که حاوی DNA تک پلیمرز (Taq DNA Polymerase) بود، ۱ میکروگرم از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود.

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مرحله واسرشته شدن (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت و سپس به دنبال آن ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شامل واسرشته شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها (Annulation) در دمای ۵۵-۵۸ درجه سانتی‌گراد (جزئیات دمایی هر آغازگر در جدول ۱ آمده است) برای ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت. پس از آن به منظور اطمینان از تکثیر تمامی توالی‌ها، یک چرخه

### رسم درخت فیلوژنی

درخت فیلوژنی حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) بر پایه ژنوم کامل میتوکندریایی ۱۶ گونه از جمله کپورماهی دندان‌دار فارسی با استفاده از نرم‌افزار (Stamatakis et al., 2008) RAxML 7.2.8 رسم شد.

### نتایج

ژنوم میتوکندریایی کپورماهی دندان‌دار فارسی *Aphanius farsicus*

بر اساس نتایج، ژنوم کامل میتوکندری کپورماهی دندان‌دار فارسی ۱۶۰۴۸۵ جفت باز و تعداد ۳۸ ژن داشت که شامل ۱۳ ژن کد کننده پروتئین، ۲۲ ژن tRNA، ۲ ژن rRNA و یک ناحیه کنترل بود. ناحیه بدون بیان در بین ژن‌های tRNA-Pro و tRNA-Phe با طول ۸۸۴ جفت باز وجود داشت که دارای میزان بالایی از نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین بود که تحت عنوان ناحیه کنترل قلمداد شد.

ترکیب کلی نوکلئوتید میتوژنوم در کپورماهی دندان‌دار فارسی برای نوکلئوتید آدنین ۲۷/۰۹ درصد، تیمین ۲۷/۸۷ درصد، گوانین ۱۶/۸۹ درصد و سیتوزین ۲۸/۱۴ درصد بود. در توالی میتوژنوم این گونه، مجموع

ثانیه و سپس مرحله طویل شدن که در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. پس از آن یک چرخه دمایی طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. به منظور کنترل آلودگی، در کلیه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز از شاهد‌های منفی استفاده شد. تعیین توالی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از روش تعیین توالی Primer Walking Method (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد.

### ویرایش توالی‌ها و تحلیل داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزارهای SeaView 3.2 (Gouy et al., 2010) و Geneious 11.1.5 (Kearse et al., 2012) توالی‌های به دست آمده ویرایش و سپس هم‌تراز شدند. مکان ۱۳ ژن رمز کننده پروتئین و دو ژن rRNA با توجه به شباهت آن‌ها با میتوژنوم دیگر گونه‌های کپورماهیان دندان‌دار مشخص شد. ژن‌های tRNA با استفاده از برنامه tRNAscan-SE (Lowe and Chan, 2016) مشخص شدند. برخی از ژن‌های tRNA که توسط tRNAscan-SE قابل شناسایی نبودند، توسط ساختار ثانویه و موقعیت آن‌ها در میتوژنوم شناسایی شدند (Zhang et al., 2009).

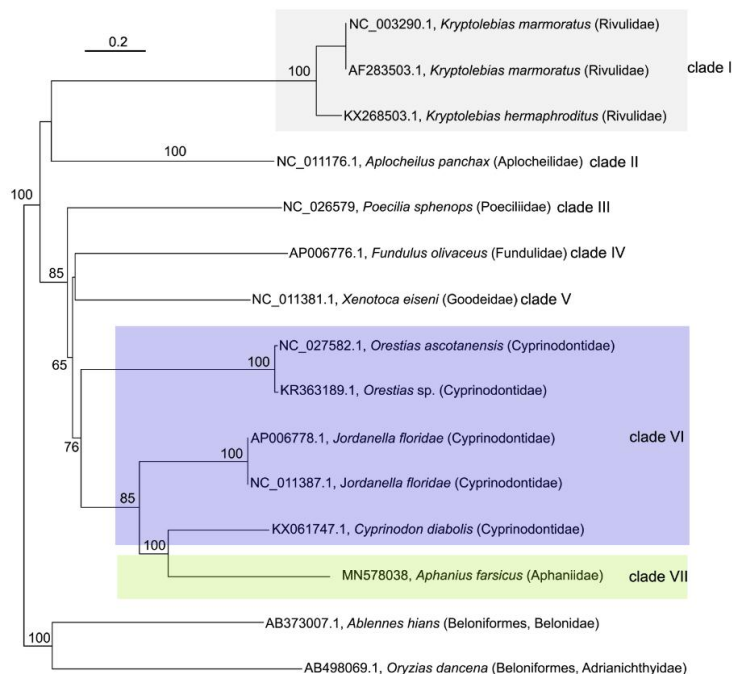


نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین (CG) برابر با ۴۵ درصد و برای آدنین و تیمین (AT) برابر با ۵۵ درصد بود.

در پایه درخت، اعضای دو خانواده *Cyprinodontidae* و *Aphaniidae* قرار دارند. جنس *Aphanius* از خانواده *Aphaniidae* با جنس *Cyprinodon* از خانواده *Cyprinodontidae* گروه خوهری تشکیل داده‌اند. این دو جنس نیز با هم با *Jordanella* (از خانواده *Cyprinodontidae*) گروه خوهری را تشکیل دادند.

### درخت فیلوژنی

در درخت فیلوژنی، هفت گروه اصلی که نشان دهنده خانواده‌های مختلف از راسته کپورماهی شکلان دندان‌دار هستند، مشخص شده است (شکل ۳). این خانواده‌ها شامل *Poeciliidae*, *Aplocheilidae*, *Rivulidae*



شکل ۳: درخت فیلوژنی کپورماهیان دندان‌دار مطالعه شده بر پایه ژنوم کامل میتوکندریایی. اعداد قبل از نام گونه‌ها کد دسترسی نمونه‌ها در بانک ژن است.

## بحث

(تکنیا) هستند. با این حال، موقعیت و ارتباط فیلوژنتیکی گروه VI (خانواده Cyprinodontidae) و گروه VII (خانواده Aphaniidae) در درخت فیلوژنی نیاز به مطالعه بیشتری دارد. مطالعات قبلی انجام شده بر اساس کل میتوژنوم نشان داده است که تنوع بالای درون خانوادگی در خانواده کپورماهیان دندان‌دار متعلق به دنیای جدید (New World Cyprinodontidae) (Cyprinodontids) (Quezada-Romegialli et al.,) وجود دارد (2016). مطالعات نشان داده‌اند که در خانواده کپورماهیان دندان‌دار دنیای جدید، جنس *Orestias* به صورت تک‌نیا است و با جنس‌های *Jordanella* و *Cyprinodon* گروه‌های خواهری را تشکیل می‌دهد. تک‌نیا بودن جنس *Orestias* و روابط فیلوژنتیکی آن با جنس‌های *Jordanella* و *Cyprinodon* با استفاده از درخت تبارزایی ترسیم شده در این مطالعه نیز تایید می‌شود (شکل ۳). هر چند در مطالعه Quezada-Romegialli و همکاران (۲۰۱۶)، گورخرماهی جنس *Aphanius* مورد مطالعه قرار نگرفته است.

بر اساس درخت فیلوژنی ترسیم شده در مطالعه حاضر، مشخص شد که جنس *Cyprinodon* (خانواده Cyprinodontidae)

در مطالعه حاضر، اعتبار فیلوژنتیکی خانواده جدید Aphaniidae بر اساس ژنوم کامل میتوکندریایی ارزیابی شد. برای این منظور کپورماهی دندان‌دار فارسی از خانواده Aphaniidae انتخاب و با گونه‌های دیگر خانواده‌ها مقایسه شد. نتایج نشان داد که ترتیب توالی DNA ژنوم میتوکندری گونه *A. farsicus* مشابه با کپورماهیان دندان‌دار دیگر از جمله گونه‌های *Orestias oscotanensis* (NC-027582) و *Jordanella floridae* (AP006778) *Cyprinodon nevadensis amargosae* (Setiamarga et al.,) است (KU883631) (2009; Quezada-Romegialli et al., 2016). میزان کلی درصد اسیدهای نوکلئیک در گونه مورد مطالعه تقریباً مشابه با گونه‌های دیگر کپورماهیان دندان‌دار از جمله *Orestias cyprinodon diabolis*، *Jordanella floridae* و *ascotanensis* بود. این گونه‌ها از لحاظ فیلوژنتیکی بسیار نزدیک به کپورماهی دندان‌دار فارسی هستند (جزئیات بیشتر در درخت فیلوژنی در شکل ۳ نشان داده شده است). بر اساس درخت فیلوژنی موجود، همه خانواده‌های مورد مطالعه مونوفیلیتیک

گروه خواهری جنس *Aphanius* (خانواده Aphaniidae) است و هر دو با هم با جنس *Jordanella* (از خانواده Cyprinodontidae) گروه خواهری هستند و ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکی دارند. لازم به ذکر است که جنس *Aphanius* قبلاً در خانواده Cyprinodontidae قرار داشته است. اما در یک مطالعه اخیر، Freyhof و همکاران (۲۰۱۷) نام Aphaniidae را به عنوان خانواده معتبر برای اعضای جنس *Aphanius* (کیپورماهیان دندان‌دار منطقه غرب پالئارکتیک یا دنیای قدیم Old World Cyprinodontids) معرفی کردند. همان طور که گفته شد، رابطه فیلوژنتیکی نزدیکی بین جنس‌های *Aphanius* (از خانواده Cyprinodontidae) و *Aphaniidae* (از خانواده Cyprinodontidae) تشخیص داده شد. بنابراین و با توجه به نزدیکی این دو جنس با یکدیگر، قرار دادن جنس *Aphanius* در خانواده‌ای مجزا به نام Aphaniidae نیاز به مطالعه بیشتری دارد که با افزودن توالی‌های بیشتری از اعضای جنس *Aphanius* قابل بررسی است.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) انجام گردید (شماره طرح ۹۶۰۰۰۷۹۸). از خانم اعظم خواجهویی و فائزه زینلی به خاطر همکاری در فعالیت‌های آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌شود.

گروه خواهری جنس *Aphanius* (خانواده Aphaniidae) است و هر دو با هم با جنس *Jordanella* (از خانواده Cyprinodontidae) گروه خواهری هستند و ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکی دارند. لازم به ذکر است که جنس *Aphanius* قبلاً در خانواده Cyprinodontidae قرار داشته است. اما در یک مطالعه اخیر، Freyhof و همکاران (۲۰۱۷) نام Aphaniidae را به عنوان خانواده معتبر برای اعضای جنس *Aphanius* (کیپورماهیان دندان‌دار منطقه غرب پالئارکتیک یا دنیای قدیم Old World Cyprinodontids) معرفی کردند. همان طور که گفته شد، رابطه فیلوژنتیکی نزدیکی بین جنس‌های *Aphanius* (از خانواده Cyprinodontidae) و *Aphaniidae* (از خانواده Cyprinodontidae) تشخیص داده شد. بنابراین و با توجه به نزدیکی این دو جنس با یکدیگر، قرار دادن جنس *Aphanius* در خانواده‌ای مجزا به نام Aphaniidae نیاز به مطالعه بیشتری دارد که با افزودن توالی‌های بیشتری از اعضای جنس *Aphanius* قابل بررسی است.

## منابع

- Esmaili H.R., Coad B.W., Gholamifard A., Nazari N. and Teimori A. 2010.** Annotated checklist of the freshwater fishes of Iran. *Zoosystematica Rossica*, 19: 361–386.
- Esmaili H.R., Teimori A., Gholami Z. and Reichenbacher B. 2014.** Two new species of the tooth-carp *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) and the evolutionary history of the Iranian inland and inland-related *Aphanius* species. *Zootaxa*, 3786: 246–268.
- Freyhof J., Ozulug M. and Sac G. 2017.** Neotype designation of *Aphanius iconii*, first reviser action to stabilize the usage of *A. fontinalis* and *A. meridionalis* and comments on the family group names of fishes placed in Cyprinodontidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa*, 4294(5): 573–585.
- Fricke R., Eschmeyer W.N. and Van Der Laan R. 2019.** Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References. Retrieved April 30, 2019, from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. 2010.** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 221–224.
- Helmstetter A.J., Papadopulos A.S.T., Igea J., Van Dooren T.J.M., Leroi A.M. and Savolainen V. 2016.** Viviparity stimulates diversification in an order of fish. *Natural Communication*, 2016: 1–7 (11271).
- Hrbek T. and Meyer A. 2003.** Losing of the Tethys Sea and the phylogeny of Eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 17–36.
- 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*, 2: 244–255.
- Iranmanesh A. and Motamedi M. 2018.** Histopathological changes of hepatorenal toxicity induced by gentamicin in Killifish, *Aphanius hormuzensis* (Aphaniidae) and its kidney regeneration through nephron neogenesis. *Journal of Ichthyology*, 58: 932–938.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Miya M. and Nishida M. 2012.**

- Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(3): 437–455.
- Lowe T.M. and Chan P.P. 2016.** tRNAscan-SE On-line: Integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44(1): 54–57.
- Miya M., Kawaguchi A. and Nishida M. 2001.** Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 18(11): 1993–2009.
- Motamedi M., Teimori A. and Iranmanesh A. 2021.** Ontogenetic pattern, morphological sexual and side dimorphism in the saccular otolith of a scaleless killifish *Aphanius furcatus* (Teleostei: Aphaniidae). *Acta Zoologica*, 102(1): 38–50.
- Nelson J.S., Grande T.C. and Wilson M.V.H. 2016.** *Fishes of the World*. Wiley, USA. 752P.
- Pohl M., Milvertz F.C., Meyer A. and Vences M. 2015.** Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. *Vertebrate Zoology*, 65(1): 37–44.
- Quezada-Romegialli C., Guerrero C.J., Veliz D. and Vila I. 2016.** The complete mitochondrial genome of the endemic and threatened killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) from the High Andes. *Mitochondrial DNA (A)*, 27(4): 2798–2799.
- Reznick D.N., Furness A.I., Meredith R.W. and Springer M.S. 2017.** The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. *PLoS One*, 12(3): 1–20 (e0172546).
- Setiamarga Zhang X.Y., Yue B.S., Jiang W.X. and Song Z. 2009.** The complete mitochondrial genome of rock carp *Procypris rabaudi* (Cypriniformes: Cyprinidae) and phylogenetic implications. *Molecular Biology Report*, 36(981): 981–991.
- Stamatakis A. 2006.** RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688–2690.
- Teimori A., Esmaili H.R. and Reichenbacher B. 2011.** *Aphanius farsicus*, a replacement name for *A. persicus* (Jenkins, 1910)

- (Teleostei, Cyprinodontidae). *Zootaxa*, 3096(1): 53–58.
- Teimori A., Esmaeili H.R., Erpenbeck D. and Reichenbacher B. 2014.** A new and unique species of the genus *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) from Southern Iran: A case of regressive evolution. *Zoologischer Anzeiger*, 253: 327–337.
- Teimori A., Esmaeili H.R., Hamidan N. and Reichenbacher B. 2018.** Systematics and historical biogeography of the *Aphanius dispar* species group (Teleostei: Aphaniidae) and description of a new species from Southern Iran. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56: 579–598.
- Wildekamp R.H. 1993.** A World of Killies: Atlas of the Oviparous Cyprinodontiform Fishes of the World. American Killifish Association, USA. 311P.
- Zeinali F. and Motamedi M. 2017.** The regeneration capacity of caudal fin in the common tooth-carp, *Aphanius dispar* (Ruppell, 1829) (Teleostei: Cyprinodontidae). *International Journal of Aquatic Biology*, 5: 321–327.
- Zhang X.Y., Yue B.S., Jiang W.X. and Song Z. 2009.** The complete mitochondrial genome of rock carp *Procypris rabaudi* (Cypriniformes: Cyprinidae) and phylogenetic implications. *Molecular Biology Reports*, 36: 981–991.



Research Paper

## Phylogenetic position of the genus *Aphanius* Nardo, 1827 based on the complete mitochondrial genome (Teleostei; Aphaniidae)

Azad Teimori<sup>1\*</sup>, Mina Motamedi<sup>1</sup>

Received: April 2020

Accepted: June 2020

---

### Abstract

The cyprinodontid fishes belong to the order Cyprinodontiformes (Teleostei) and consisting of small fishes, which has aesthetic value, and also are important in biological control and also in ecological and bio-medicine researches. The genus *Aphanius* has already been in the family Cyprinodontidae but it has recently been placed in the family Aphaniidae. To evaluate the phylogenetic validity of the new family Aphaniidae in this study, seven families of the order Cyprinodontiformes were selected and their phylogenetic relationships were analyzed. The phylogenetic tree was estimated based on a data set, including the complete mitochondrial genome genes from the database as well as the complete mitochondrial genome of *Aphanius farsicus* as representative of the family Aphaniidae. The phylogenetic analysis indicates a close relationship between the genera *Aphanius* (Aphaniidae) and *Cyprinodon* (Cyprinodontidae) so that the group containing these two families was paraphyletic. Therefore, by considering the phylogenetic position of the genus *Aphanius* in the tree, the validation of the family Aphaniidae still needs more phylogenetic supports and it should be investigated by accumulating more sequences from the *Aphanius* species.

**Key words:** *Aphaniidae*, *Cyprinodontidae*, *Aphanius*, *Mitogenome*.

---

1- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

\*Corresponding Author: [a.teimori@uk.ac.ir](mailto:a.teimori@uk.ac.ir)

