مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۳، ۲۹۶-۲۹۱

بررسی کروموزومی ماهی کپوردندانی زاگرس (*Aphanius vladykovi*)

فرهاد امینی[1*] آذر همت زاده[2،3]

۱) گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران - ایران.
۳) آدرس فعلی: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد - ایران.

(دریافت مقاله: ۵ بهمن ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۱۱ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: ماهی کپوردندانی زاگرس (*Aphanius vladykovi*) از ماهیان بومی ایران است که در آبگیرهای استان چهارمحال و بختیاری یافت می‌شود. **هدف:** در این مطالعه، تعداد کروموزوم‌ها و کاریوتایپ ماهی کپوردندانی زاگرس مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** برای به‌دست‌آوردن گسترش‌های کروموزومی متافازی *in vivo*، ماهیان ۵/۴g-۲/۱ با کلچی‌سین ۱٪ به میزان ۰/۱۵ mg-۰/۱ به ازای هر گرم از وزن بدن مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفته و پس از نگهداری در مخزن با دمای ^{o}C ۲۳-۲۲ با هوادهی به مدت ۵-۴ ساعت، کشته شدند. بافت‌های خونساز، بیضه یا تخمدان، آبشش، طحال و کبد از ماهیان جدا و پس از هیپوتونیزاسیون در محلول ۰/۰۷۵ مولار کلرید پتاسیم، در محلول کارنوی سرد تثبیت شدند. گسترش‌های کروموزومی به دو روش چکاندن تعلیق سلولی یا مهر زدن از بافت‌های مورد نظر تهیه شدند. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی با گیمسای ۱۰٪ با میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفتند. پلاک‌های متافازی مناسب به‌طور دیجیتالی عکس‌برداری و کروموزوم‌های آنها شمارش و کاریوتایپ‌شدند. **نتایج:** عدد کروموزومی دیپلوییید در دامنه ۴۲ تا ۴۹ قرار داشت و تعداد نمایی (۲n) آنها ۴۸ بود. براساس کاریوتایپ تهیه‌شده، فرمول کروموزومی این گونه ۱۲st+۳۶a/t بود و تعداد بازوهای کروموزومی (FN) ۶۰ محاسبه شد. در این گونه، کروموزوم‌های جنسی هترومورفیک قابل تشخیص نبودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** عدد کروموزومی دیپلوییید در ماهی کپوردندانی زاگرس مشابه دیگر گونه‌های این جنس است که تاکنون بررسی شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: کاریوتایپ، کروموزوم، ماهی کپوردندانی زاگرس، *Aphanius vladykovi*.

مقدمه

ماهی کپوردندانی زاگرس با نام علمی *Aphanius vladykovi* بومی ایران بوده و برای اولین بار توسط Coad در سال ۱۹۸۸ شناسایی و گزارش گردید. این ماهی متعلق به خانواده Cyprinodontidae می‌باشد. اگرچه این خانواده دارای ۹ جنس و بیش از ۱۰۰ گونه است اما تاکنون در ایران فقط ۷ گونه از این خانواده شناسایی شده‌اند که همگی متعلق به جنس *Aphanius* هستند. این گونه‌ها عبارتند از: *A. ginaonis* که پراکنش آن در چشمه‌های آب گرم نزدیک بندرعباس و تنگه هرمز است؛ گونه *A.mento* در رودخانه دجله و حوزه آبریز آن در ایران دیده شده است؛ *A. dispar* در بخش وسیعی از رودخانه‌های منتهی به خلیج فارس و دریای عمان یافت شده و علاوه بر آن در آبهای داخلی بلوچستان نیز مشاهده گردیده است؛ گونه *A. sophiae* پراکنش نسبتاً وسیعی دارد و در حوزه آبریز رودخانه دجله، زهکش رودخانه‌های شمال خلیج فارس و به ویژه حوزه رودخانه کر یافت می‌شود؛ *A. persicus* در دریاچه مهارلو استان فارس مشاهده شده است (۷)؛ گونه *A. isfahanensis* که در حوزه‌های آبی اصفهان مورد شناسایی قرار گرفته (۶) و سرانجام گونه *A. vladykovi* که پراکنش آن در تالاب‌ها و رودخانه‌های استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

اهمیت ماهی *A. vladykovi* نه تنها به عنوان یک گونه بومی از نظر حفظ ذخایر ژنتیکی و تنوع زیستی می‌باشد، بلکه با توجه به قدرت پشه خواری جنس *Aphanius*، Homski و همکاران در سال ۱۹۹۴، این ماهی می‌تواند به عنوان یک گونه نامزد برای مبارزه بیولوژیکی با بیماری مالاریا مطرح باشد. اگرچه در اغلب مناطق دنیا برای کنترل مالاریا از انواع ماهی پشه خوار (*Gambusia* spp.) استفاده گردیده است، اما نشان داده شده که این ماهیان برای گونه‌های بومی دارای مخاطرات محیط زیستی می‌باشند (۱،۸،۱۳). به علاوه با توجه به وضعیت فنوتیپی و دوشکلی بودن جنسی ماهی کپوردندانی زاگرس (تصویر ۱) این ماهی پتانسیل معرفی شدن به صنعت ماهیان زینتی را نیز دارد.

تاکنون اطلاعات کاریولوژیکی در مورد حدود ۱۰٪ از گونه‌های شناخته شده از ماهیان در دسترس می‌باشد (۱۱) و تکمیل این زمینه از دانش نیازمند بررسی یکایک گونه‌ها است. دانستن کاریوتایپ ماهی *A. vladykovi* نه تنها به عنوان پاره اطلاعاتی مفیدی از نظر علوم زیست شناسی و تکامل آن می‌باشد بلکه برای دستکاری‌های کروموزومی به منظور القای پلی پلوییدی، نرزایی و ماده‌زایی نیز ضروری است. در صورتی که از این گونه به منظور کنترل مالاریا در سطحی وسیع استفاده گردد، القای تریپلوییدی می‌تواند به‌طور بالقوه این ماهی را عقیم ساخته و کاربرد آن را بدون دغدغه‌های محیط زیستی میسر سازد. همچنین دانستن وضعیت کروموزومی طبیعی می‌تواند در مواردی از آلودگی‌های محیط

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: famini@ut.ac.ir

زیستی که منجر به ناهنجاری‌های ساختاری یا عددی کروموزوم‌ها می‌شوند، سودمند باشد. افزون بر اینها، اطلاعات کروموزومی در پژوهش‌های دورگه گیری این ماهی با سایر گونه‌ها می‌تواند مفید واقع شود. تا کنون در کشور ما بررسی‌های کروموزومی ماهیان عمدتاً بر روی گونه‌های دارای ارزش اقتصادی متمرکز بوده و از میان ماهیان کپوردندانی ذکر شده در بالا اطلاعات کاریولوژیکی فقط در مورد *A. persicus* و *A. sophiae* منتشر گردیده است (۴). با توجه به فقدان اطلاعات سیتوژنتیکی در مورد ماهی *A. vladykovi* در این تحقیق نسبت به بررسی کاریولوژیک آن اقدام گردید.

مواد وروش کار

حدود ۲۰۰ عدد ماهی نر و ماده *A. vladykovi* از تالاب چغاخور و چشمه مادر و دختر واقع در استان چهارمحال و بختیاری در شهرستان بروجن صید شدند، نمونه‌ها در کیسه‌های نایلونی همراه با اکسیژن به تهران منتقل شده و در آکواریومی که به این منظور حدود دو هفته قبل از انتقال ماهیان آماده شده بود، نگهداری گردیدند. پس از دو روز تغذیه ماهیان با غذای پلیت آغاز گردید و پس از این ماهیان تعداد ۵۰ عدد مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه گسترش‌های کروموزومی از روش *in vivo*، Rivlin و همکاران در سال ۱۹۸۵، با تغییراتی استفاده گردید. بدین منظور پس از توزین انفرادی ماهیان (دامنه ۳/۲-۱/۲ و میانگین ۲/۱g برای نرها و دامنه ۵/۴-۱/۵ و میانگین ۳/۲g برای ماده‌ها)، کلچی سین با دوز ۰/۱۵mg-۰/۱ به ازای هر گرم وزن بدن به طور داخل صفاقی به آنها تزریق شد. ماهیان به مدت ۵-۴ ساعت در مخزن با دمای $22-23^{o}C$ همراه با هوادهی نگهداری شدند.

پس از کشتن هر ماهی با روش انسانی، بافت‌های آبشش، کبد، طحال، بافت خونساز، و بیضه یا تخمدان آن خارج گردید و بخشی به صورت بافت کامل و بقیه به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شد. بافت‌ها در محلول هیپوتونیک (KCl ۰/۰۷۵ M) به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با محلول کارنوی سرد و تازه تهیه شده (به نسبت ۳ متانول: ۱ اسید استیک گلاسیال) نسبت به فیکس کردن آنها اقدام گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه محلول کارنوی جایگزین شده و با گذشت ۱۵ دقیقه این عمل مجدداً تکرار گردید. در این مدت بافت‌ها در یخچال نگهداری شدند، تعدادی از نمونه‌ها برای شب گذرانی در یخچال نگهداری شدند. سپس از بافت‌ها گسترش به روش مهرزدن (Squash method) تهیه شد.

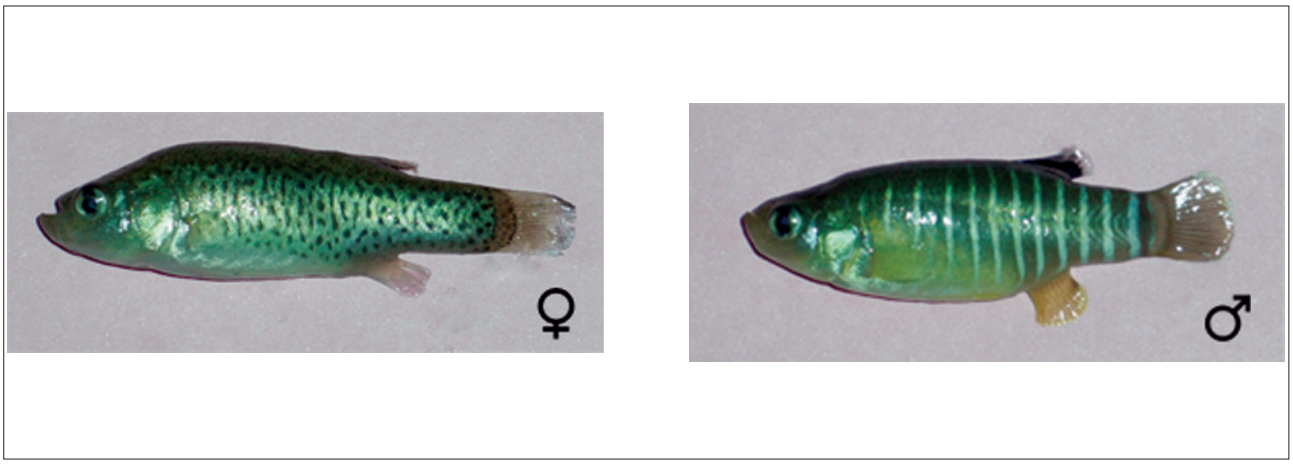
برای تهیه سوسپانسیون سلولی ابتدا بافت‌های مورد نظر با کمک قیچی و اسکالپل به قطعات ریزتر تقسیم شده، سپس در محلول هیپوتونیک قرار داده شدند. سلول‌ها با کمک مایکروپیپت و ورتکس کردن از بافت همبند خود جدا می‌گردیدند و در محلول هیپوتونیک به صورت سوسپانسیون در می‌آمدند. سپس این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شده، و محلول کارنوی جایگزین آن می‌گردید. در طول این مرحله نیز ورتکس نمودن و پیپتینگ ادامه یافت تا بتوان سلول‌های منفرد بیشتری بدست آورد. سپس سلول‌ها همراه محلول کارنوی به مدت ۱۰ دقیقه و با همان دور سابق سانتریفوژ گردیده، سپس محلول کارنوی تعویض شده و این عمل سه بار تکرار گردید. سوسپانسیون سلولی به صورت شب گذرانی در یخچال نگهداری شده و روز بعد از ارتفاع ۴۰-۳۰cm بر روی لام‌های از پیش سرد شده چکانده شد (Splash method) به طوری که تا جای ممکن بین قطرات چکانده شده بر روی لام همپوشانی ایجاد نگردد. پس از تهیه گسترش به دو روش مهرزدن و چکاندن بر روی لام سرد، گسترش‌ها با محلول ۱۰٪ گیمسا به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. بررسی کروموزوم‌ها با میکروسکوپ نوری انجام شد و از گسترش‌های مناسب، فتومیکروگراف دیجیتال تهیه گردید و با کمک نرم افزار Photoshop CS2، کاریوتایپ تهیه شد. فرمول کروموزومی بر اساس نامگذاری Levan و همکاران در سال ۱۹۶۴ بدست آمد.

نتایج

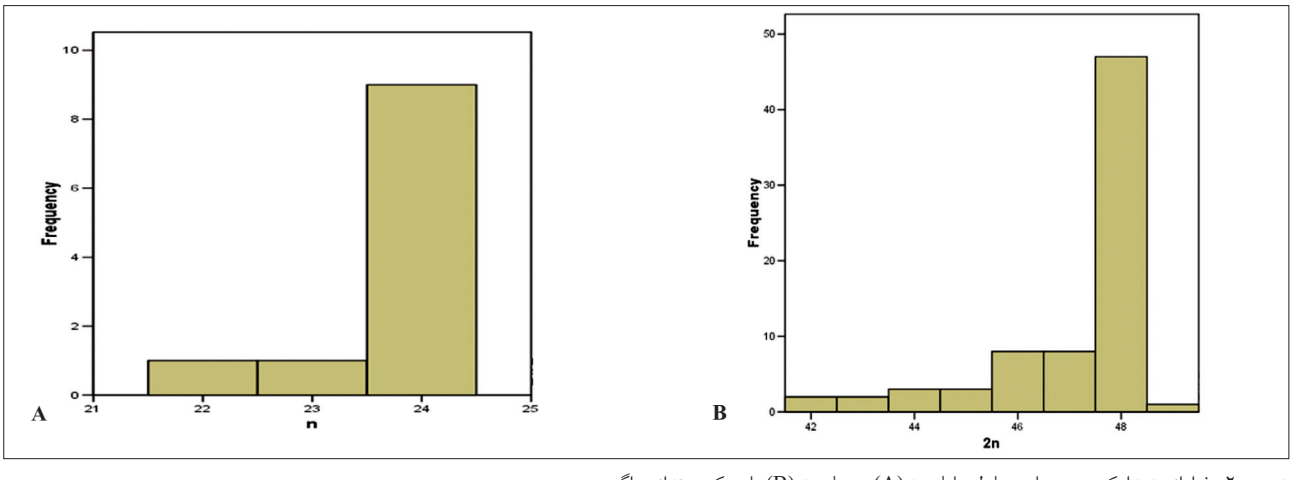
از نظر تکنیکی، دوزهای مورد استفاده از کلچی سین و نیز مدت زمان انکوباسیون ماهیان پس از تزریق تاثیر چندانی در تغییر کیفیت گسترش‌های بدست آمده نداشتند فقط دوز ۰/۱۵mg کلچی سین به ازای هر گرم وزن بدن با مدت ۵ ساعت باعث فشردگی بیشتر کروموزوم‌ها گردید. در مقایسه بین دو روش چکاندن و مهرزدن در تهیه گسترش به نظر می‌رسد که با روش چکاندن گسترش‌های بهتری می‌توان به دست آورد، ولی تراکم سلولی و پلاک‌های متافازی بر روی هر لام در مقایسه با روش مهر زدن کمتر می‌باشد. مقایسه بین گسترش‌هایی که از بافت‌های متفاوت بدست آمده نشان می‌دهد که بافت بیضه نسبت به دیگر بافت‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای تعداد پلاک‌های متافازی بیشتری داشت. از بافت‌های خونساز و آبشش نیز گسترش‌های خوبی به دست آمد که در مقایسه با بافت بیضه باز شدگی بازوهای کروموزوم‌ها بهتر است. از بافت طحال به دلیل شکنندگی آن پس از فیکس شدن سلول‌ها گسترش‌های خوبی به دست نیامد. البته تعداد پلاک‌های متافازی این بافت نیز اندک می‌باشد. بافت کبد به دلیل داشتن چربی زیاد، بافت مناسبی برای این مطالعات نیست. همچنین بافت تخمدان نیز با وجود اینکه دارای سلول‌های در حال تقسیم زیادی می‌باشد ولی به دلیل وجود زرده در سلول‌ها گسترش‌های مناسبی به دست نداد.

در این بررسی مجموعاً ۸۴ گسترش کروموزومی مورد شمارش قرار گرفتند که عدد نمایی تعداد کروموزوم‌ها در ۷۳ سلول دیپلویید شمارش شده ۴۸ = ۲n با فراوانی ۴۷ و عدد نمایی تعداد کروموزوم‌های ۱۱ سلول هاپلویید شمارش شده نیز ۲۴ = n با فراوانی ۹ بود. تصاویر A-۲ و B-۲ به ترتیب فراوانی کروموزوم‌های شمارش شده در سلول‌های هاپلویید و دیپلویید را نشان می‌دهند.

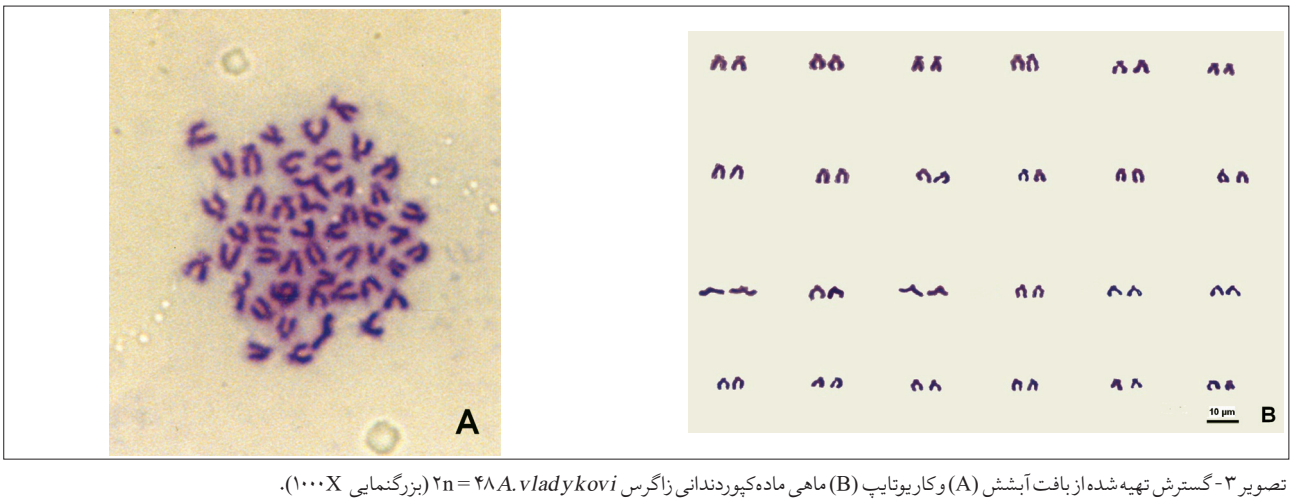
در تصویر ۳A نمونه‌ای از گسترش‌های کروموزومی *A. vladykovi*



تصویر ۱- جنس نر (راست) و جنس ماده (چپ) ماهی کپوردندانی زاگرس، *A. vladykovi* که طی دو هفته آماده بررسی های سیتوژنتیک شدند.



تصویر ۲ ـ فراوانی تعداد کروموزوم‌ها در سلول هاپلویید (A) و دیپلویید (B) ماهی کپوردندانی زاگرس.



تصویر ۳- گسترش تهیه شده از بافت آبشش (A) و کاریوتایپ (B) ماهی ماده کپوردندانی زاگرس *A. vladykovi* ۲n = ۴۸ (بزرگنمایی ۱۰۰۰X).

و در تصویر ۳B کاریوتا یپ حاصل از آن نشان داده شده است. بر اساس کاریوتایپ تهیه شده، از ۲۴ جفت کروموزوم این گونه ۶ جفت ساب تلوسنتریک (st) و ۱۸ جفت اکروسنتریک یا تلوسنتریک (a/t) می‌باشند. بنابراین تعداد بازوهای کروموزومی این گونه FN=۶۰ محاسبه گردید. در مشاهدات انجام شده بر روی گسترش‌های کروموزومی دو جنس نر و ماده، اختلافی از نظر عدد دیپلویید مشاهده نشد و نیز کروموزوم‌های

جنسی هترومورفیک در این گونه قابل تشخیص نبود.

بحث

در این تحقیق ماهی کپوردندانی زاگرس *A. vladykovi* که بومی ایران می‌باشد، مورد بررسی کروموزومی قرار گرفت. اهمیت این ماهی نه تنها از نظر بیولوژیکی و اکولوژیکی می‌باشد بلکه با توجه به قدرت پشه خواری این گونه امکان رهاسازی آن در مناطق مالاریا خیز جهت کنترل این بیماری وجود دارد. به علاوه، با توجه به وضعیت فنوتیپی دو جنس نر و ماده آن، این گونه پتانسیل معرفی شدن به صنعت ماهیان زینتی را نیز دارد. همچنین دانستن وضعیت کاریولوژیک این گونه در ایجاد ذخایر تریپلویید و دورگه از این ماهی کاربرد داشته و از نظر تکاملی نیز دارای اهمیت می‌باشد.

در این بررسی مشخص گردید که ماهی *A. vladykovi* دارای عدد دیپلویید نمایی ۴۸ = ۲n و عدد هاپلویید نمایی ۲۴ = n است که مشابه سایر اعضای جنس *Aphanius* است که پیش از این مورد مطالعه قرار گرفته اند. این گونه‌ها شامل *A. cypris*, *A. aquamatus*, *A. ginaonis*, *A. iberus*, *A. persicus*, *A. sophiae*, *A. dispar*, *A. mento*, و *A. fasciatus* هستند که همگی دارای عدد کروموزومی ۴۸=۲n می‌باشند (۲،۴،۱۴). به نظر می‌رسد عدد کروموزومی در جنس *Aphanius* ثابت بوده و این جنس توانایی ثابت نگاه داشتن تعداد کروموزوم‌های خود را دارد.

مطالعاتی که تاکنون بر روی کروموزوم‌های ماهیان انجام شده نشان می‌دهد که حدود ۱۱/۵ ٪ از ماهیان بررسی شده، تعداد کروموزوم آنها ۴۸ = ۲n می‌باشد. بررسی‌های اخیر بر روی راسته‌های Atheriniformes، Cyprinodontiformes و Beloniformes نشان می‌دهد که این سه راسته جزء یک شاخه تکاملی بوده و ارتباط نزدیکی با Mugiliformes و Perciformes دارند، به طوری که اغلب افراد این دو راسته دارای عدد کروموزومی ۴۸ = ۲n می‌باشند (۱۱).

در تفسیر تکامل کاریوتایپی به نظر می‌رسد که ماهیان اولیه نیز دارای ۴۸ کروموزوم بوده اند، ولی این امر هنوز تأیید نشده است. وضعیت کروموزومی در ماهی *Eptatretus stoutii* از راسته Mixiniformes بررسی شده و نشان داده که دارای ۴۸ کروموزوم نسبتاً بزرگ آکروسنتریک می‌باشد. وجود ۴۸ کروموزوم در ماهیان اصلی بررسی شده به این فرضیه منتهی شد که کاریوتایپ اولیه اجداد مهره داران که از تکامل طنابداران ایجاد شده اند، ۴۸ کروموزومی است. در راسته Cyprinodontiformes خانواده‌های زیر در نواحی نئوتروپیک گسترش دارند: Anablepidae (با ۱۵ گونه)، Cyprinodontidae (با ۵۸ گونه)، Poecilidae (با ۲۱۶ گونه) و Rivulidae (با ۲۳۵ گونه). هرچند که از این میان مطالعات کروموزومی فقط روی حدود ۷۰ گونه انجام پذیرفته اما الگوی کروموزومی بدست آمده برای خانواده‌های این راسته اغلب ۴۸=۲n می‌باشد و در اغلب گونه‌ها همه کروموزوم‌ها تک بازویی هستند. البته تفاوتهای آشکاری را می‌توان در کروموزوم‌های Poecilidae و به ویژه Rivulidae مشاهده نمود، که دامنه تغییرات عدد دیپلویید آنها از ۲۰ تا ۵۴ است. کاهش تعداد کروموزومی در بسیاری از افراد گونه‌ها مشاهده شده به طوری که تعداد کروموزوم کمتر از ۴۸ یک امر غیر عادی نمی‌باشد. کاهش تعداد کروموزومی در گونه‌های خانواده Cyprinodontidae آفریقا و در جنس *Aphyosemion* دیده شده است. از طرف دیگر در همین خانواده همه گونه‌های جنس *Fundulus* در آمریکای شمالی دارای عدد کروموزومی ۴۸ می‌باشند (۱۰). اما این فرضیه نیز وجود دارد که گونه‌هایی از جنس *Aphanius* از قبیل *A. fasciatus* که در معرض تغییرات شدید محیطی همچون شوری، دما، غلظت اکسیژن و غیره قرار دارند مستعد شکستگی‌های کروموزومی و تغییر در ساختار آنها هستند (۱۴).

از نظر تکنیکی، روش‌های استفاده شده در این بررسی جهت تهیه گسترش، یعنی روش‌های مهرزدن و چکاندن، چه از نظر کیفی و چه از نظر کمی گسترش‌های کروموزومی مناسبی را ایجاد کردند. از میان بافت‌های مورد استفاده، بافت‌های آبشش، بیضه و خونساز برای روش مهرزدن و بافت‌های خونساز و بیضه برای روش چکاندن قابل توصیه هستند. مزیت بافت بیضه در این است که هر دو نوع سلول هاپلویید (n) و دیپلویید (۲n) را فراهم می‌آورد. سایر بافت‌ها از جمله تخمدان گسترش‌های خوبی بدست ندادند. به نظر می‌رسد که در اجرای یک پروتکل مشخص، علاوه بر میزان مواد شیمیایی بکار رفته و بافت مورد استفاده یک عامل مهمی که در به دست آوردن پلاک‌های متافازی خوب موثر می‌باشد، شرایط فیزیولوژیکی خود ماهی است. اگر ماهیان در شرایط استرس به سر ببرند و یا پیر باشند به دلیل کم بودن سلول‌های در حال تقسیم برای مطالعات کاریوتایپ مناسب نمی‌باشند.

با توجه به قابلیت ماهیان جنس *Aphanius* بومی ایران به ویژه *A. vladykovi* در مبارزه بیولوژیکی با بیماری مالاریا، برای ورود این ماهیان به دیگر اکوسیستم‌های آبی و جلوگیری از ایجاد تغییر در این منابع، ضروری است که از جمعیت‌های تریپلویید که عقیم می‌باشند استفاده گردد. ایجاد این جمعیت‌ها نیاز به مطالعات بیشتری دارد که در آینده باید صورت پذیرد. همچنین پتانسیل‌های این گونه‌ها برای تجاری شدن در صنعت ماهیان زینتی باید مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر وقدردانی

از آقای مهندس سعید اسداله کارشناس محترم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان که در صید ماهی کمک‌های شایانی نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Alemadi, S.D., Jenkins, D.G. (2008) Behavioral constraints for the spread of the eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki* (Poeciliidae). Biol. Invasions. 10: 59-66.
2. Al-Sabti, K. (1991) Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. J. Stefan Institute. Ljubljana, Former Yugoslavia. 221 pp.
3. Coad, A. (1988) *Aphanius vladykovi*, a new species of tooth-carp from the Zagros Mountains of Iran (Osteichthyes: Cyprinodontidae). Environ. Biol. Fishes. 23: 115-125.
4. Esmaeili, H.R., Piravar, Z., Shiva, A.H. (2007) Karyological analysis of two Endemic Tooth- Carps, *Aphanius persicus* and *Aphanius sophiae* (Pisces: Cyprinodontidae), from southwest Iran. Tork. J. Zool. 31:69-74.
5. Homski, D., Goran, M., Gasith, A. (1994) Comparative evaluation of the larvivorousfish *Gambusia affinis* and *Aphanius dispar* as mosquito control agents. Hydrobiology. 284: 137-146.
6. Hrbek, T., Keivany, Y., 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.
7. Keivany, Y.M., Soofiani, N. (2004) Contribution to the biology of Zagros tooth-carp, *Aphanius vladykovi* (Cyprinodintidae) in central Iran. Environ. Biol. Fishes. 71: 165-169.
8. Laha, M., Mattingly, H. (2007) Ex situ evaluation of impacts of invasive mosquitofish on the imperiled Barrens topminnow. Environ. Biol. Fishes. 78:1-11.
9. Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52: 201-220.
10. Oliveira, C., Foresti, L., Foresti, F.(2007) Karyotypic evolution in neotropical fishes. In:Fish Cytogenetics. Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresi, F., Kapoor, B.G. (eds.) Science Publishers. Enfield, USA. p.165-194.
11. Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresi, F., Kapoor, B.G. (2007) Fish cytogenetics. Science Publishers. Enfield, USA.
12. Rivlin, K., Rachlin. J.W., Dale, G. (1985) A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding, J. Fish Biol. 26: 267-272.
13. Schleier, J.J., Sing, S.E., Peterson, R.K.D. (2008) Regional ecological risk assessment for the introduction of *Gambusia affinis* (western mosquitofish) into Montana watersheds. Biol. Invasions. 10: 1277-1287.
14. Vitturi, R., Colomba, M., Vizzini, S., Libertini, A., Barbieri, R., Mazzola, A. (2005) Chromosomal location polymorphism of major r DNA sites in two populations of killifish *Aphanius fasciatus* (Pices: Cyprinodontidae). Micron. 36: 243-246.

Chromosomal study on Zagros pupfish (*Aphanius vladykovi*)

Amini, F.[1*], Hemmatzadeh, A.[2,3]

[1]*Department of Animal and Poultry Nutrition and Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*MSc graduate of Fisheries, Islamic Azad University, Research and Sciences Branch, Tehran-Iran.*

[3]*Current address: Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.*

(Received 25 January 2012 , Accepted 12 April 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Zagros Pupfish (*Aphanius vladykovi*) is a native fish of Iran which is found in basins of Chahar Mahal & Bakhtiari province. **OBJECTIVES:** In this study, the chromosome number and karyotype of Zagros Pupfish were investigated. **METHODS:** To obtain metaphase chromosome spreads *in vivo*, 1.2-5.4g fish were injected intraperitoneally by 0.1-0.15 mg/g of 1% colchicine and were humanely killed after being incubated in a well-aerated tank for 4-5 hours at 22-23°C. Hematopoietic, testis or ovary, gill, spleen and liver tissues were isolated from the fish and were fixed with cold Carnoy's solution after being hypotonized in 0.075M KCl. Chromosome spreads were prepared by either splashing of cell suspension or stamping of whole tissues onto slides. Slides were then stained by 10% Giemsa followed by microscopic observation. Suitable metaphase plates were digitally microphotographed and chromosomes were counted and karyotyped. **RESULTS:** Diploid chromosome number ranged from 42 to 49 with the modal number (2n) of 48. Based on the prepared karyotype, chromosome formula for this species was 12st+36a/t and the number of chromosome arms (FN) was calculated 60. No heteromorphic sex chromosomes could be recognized in this species. **CONCLUSIONS:** The diploid chromosome number of Zagros Pupfish is similar to other species of the same genus so far investigated.

Key words: *Aphanius vladykovi*,chromosome, karyotype, zagros pupfish.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. Male (right) and female (left) Zagros pupfish, *A. vladykovi*.

Figure 2. Frequencies of the Chromosome numbers in haploid (A) and diploid cells of Zagros pupfish.

Figure 3. A chromosome spread from the gill tissue (A) and the karyotype (B) of Zagros pupfish, *A. vladykovi*.

***Corresponding author's email: famini@ut.ac.ir, Tel: 021-61117160, Fax: 021-66933222**