



شناسایی ماهیان قنات‌های منطقه تفت و مهریز یزد با استفاده از بارکد ژنتیکی

ایرج هاشم‌زاده سقرلو*

گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در این مطالعه ماهیان ۸ رشته قنات در تفت و مهریز استان یزد با استفاده از توالی ژن <i>COI</i> در مقایسه با نمونه‌های متعلق به رودخانه‌های سیروان، کارون، مند، کر، حوضه کرمان و حوضه نمک مورد بررسی قرار گرفتند. گونه‌های <i>Capoeta saadi</i> و <i>Cyprinion sp.</i> در قنات‌های مورد مطالعه مشاهده شدند. تنوع هاپلوتایپی در قنات‌ها صفر بود. هاپلوتایپ ماهیان <i>C. saadi</i> قنات‌های مورد مطالعه با هاپلوتایپ متعلق به حوضه کر یکسان بود. هاپلوتایپ <i>Cyprinion sp.</i> با هاپلوتایپ‌های گونه‌های <i>Cyprinion watsoni</i> و <i>Cyprinion macrostomum</i> حوضه‌های مند و کارون فاصله ژنتیکی قابل توجهی (۱/۶۸-۱/۹۴ درصد) داشت. در بررسی‌های شجره‌شناسی، جنس <i>Capoeta</i> یک گروه تک شجره‌ای را تشکیل داد که جنس‌های <i>Barbus</i> ، <i>Luciobarbus</i> نسبت به آن اجدادی بودند و بر پایه اطلاعات به دست آمده جنس <i>Cyprinion</i> نسبت به سایر جنس‌های مورد مطالعه قدیمی‌تر است که شاید با سطح پلوئیدی آن (دپلوئید) در مقایسه با سایر جنس‌ها قابل توجیه باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۳/۰۵/۱۴ اصلاح: ۹۳/۰۷/۲۰ پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۹	کلمات کلیدی: قنات هاپلوتایپ یزد <i>COI</i>

مقدمه

قنات‌ها از سامانه‌های آبرسانی کهن ایران و یکی از شاخص‌های دانش سنتی و علم مهندسی آب در ایران هستند. این سازه‌ها علاوه بر اهمیت به عنوان شاخص دانش سنتی و منابع پایدار تأمین آب، در مناطق کویری و خشک کشور به عنوان تنها پناهگاه حیات آبریزان نقش ایفا می‌کنند. قنات‌ها در مناطق مختلف کشور به واسطه خشکسالی، برداشت بی‌رویه آب‌های زیرزمینی و احداث چاه‌های عمیق در حال تهدید هستند. در بسیاری از نقاط کشور قنات‌ها در حال تخریب بوده و از دست می‌روند. این تهدید نه تنها سبب نابودی شاخص دانش سنتی کشور و یکی از جاذبه‌های منحصر به فرد کشورمان می‌شود، بلکه تنها پناهگاه پایدار آبریزان را در مناطق خشک کشور که از نظر منابع آب سطحی فقیر هستند، نیز از بین برده و تنوع زیستی مناطق یاد شده را تا حد نابودی پیش می‌برد. علاوه بر این، حیات آبریزان این مناطق می‌تواند به واسطه ورود گونه‌های مهاجم نیز تهدید شود.

استان یزد یکی از استان‌های خشک کشور است. امروزه در این استان رودخانه دائمی برای زیست آبریزان وجود ندارد و تنها پناهگاه دائمی آبریزان و به ویژه ماهیان استان، قنات‌های آن است که جمعیت‌های کوچکی از ماهیان را که بیشتر هم از کپورماهیان هستند تحت پوشش قرار می‌دهد. در استان یزد نیز مشکل خشکسالی، تخریب قنات‌ها و تهدیدهای مرتبط با گونه‌های غیربومی خودنمایی می‌کند. در استان یزد در منطقه بافق گونه غیربومی تیلاپیای نیل پرورش داده می‌شود و ممکن است محدوده پرورش این گونه از منطقه بافق فراتر برود. در صورتی که این گونه به محیط‌های قنات یا منابع آب سطحی راه پیدا کند، می‌تواند اثرات منفی بر جمعیت‌های آبریزان بومی گذاشته و حتی جایگزین آنها شود.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: ihashem@nres.sku.ac.ir

علی‌رغم آنکه در مناطق مختلف کشور تاکنون مطالعاتی در مورد ماهیان قنات انجام شده است (جوهری و همکاران، ۱۳۸۹؛ ابراهیمی، ۱۳۸۶؛ صادقی و همکاران، ۱۳۹۱؛ مشکانی و پورکاسمانی، ۱۳۸۲)، اما تاکنون در مورد جمعیت‌های آبریان قنات‌های استان یزد مطالعه‌ای انجام نشده که بتوان از تنوع زیستی آنها و گونه‌های ساکن قنات‌ها اطلاعاتی به دست آورد تا در مدیریت و حفاظت آنها تمهیدات لازم را اعمال نمود. با وجود خطرات یادشده بیم آن می‌رود که گونه‌های ماهیان استان بدون شناسایی و مطالعه نابود شده و بخشی از ذخایر ژنتیکی کشور برای همیشه از دست برود. برای شناسایی تنوع ماهیان و جمعیت‌های آنها می‌توان از روش‌های مختلفی شامل روش‌های ریخت‌سنجی و روش‌های ژنتیکی استفاده کرد. ویژگی‌های ریختی ماهیان می‌تواند تاحدی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گرفته و بررسی‌ها را با خطا روبه‌رو کند. امروزه با توسعه روش‌های ژنتیکی می‌توان روابط زیستی و شجره‌شناسی موجودات را به دور از اثرات و خطاهای محیطی به صورت واقعی‌تر سنجید. برای مثال می‌توان با استفاده از نشانگرهای جمعیتی مثل ریزماهوره‌ها، به بررسی ساختار جمعیت‌ها، روابط مهاجرتی، سیستم‌های تولید مثلی، اندازه مؤثر جمعیت‌ها، واحدهای مهم مدیریتی و بسیاری از سوالات مرتبط با بوم‌شناسی موجودات پاسخ داد. همچنین برای بررسی روابط رده‌بندی و بحث‌های تکاملی و شناسایی واحدهای مهم تکاملی می‌توان از نشانگرهایی مثل ژن‌های میتوکندریایی از قبیل *COI*، *Cyt b* برای هر دو گروه موجودات دیپلوئید و پلی‌پلوئید و یا ژن‌های هسته‌ای بیشتر برای گروه‌های مختلف رده‌بندی موجودات دیپلوئید استفاده کرد (Hallerman, 2003; Levin et al., 2012). ژنوم میتوکندریایی به دلیل توارث تک‌شجره‌ای، اندازه‌های پلوئید، عدم وجود سیستم ویرایش و عدم وجود نوترکیبی به عنوان یکی از نشانگرهای مفید برای قضاوت‌های رده‌بندی و مباحث شجره‌شناسی قابل استفاده است (Hallerman, 2003). البته در این ژنوم توالی‌هایی مثل توالی ناحیه کنترلی D-Loop به دلیل ضریب جهش بالاتر و عدم تأثیرپذیری از فرآیند انتخاب طبیعی برای بررسی‌های در سطح درون‌گونه‌ای (جمعیتی) مناسب‌تر از ژن‌هایی مثل *Cyt-b* و سایر ژن‌های موزوف هستند (Hallerman, 2003). با توجه به ویژگی‌های ژنوم میتوکندریایی و با توجه به اینکه کپورماهیان که بیشتر ماهیان قنات را تشکیل می‌دهند دارای انواع مختلفی از گروه‌های پلوئیدی هستند، برای دوری از مشکل استفاده از توالی‌های هسته‌ای در تفسیر روابط رده‌بندی، از ژنوم میتوکندریایی برای این مطالعه استفاده شد. علاوه بر این با توجه به اینکه در سال‌های اخیر جنبشی جهانی در تهیه توالی ۶۵۰ جفت نوکلئوتید انتهایی 5' ژن *COI* به عنوان توالی بارکد استاندارد برای شناسایی گونه‌های جانوری آغاز شده است (Hebert et al., 2003; Hubert et al., 2008) و توالی یادشده در بیش از ۹۰ درصد جانوران در شناسایی گونه‌ها موفق بوده است (Hubert et al., 2008) در این مطالعه نیز از ژن *COI* برای شناسایی ماهیان قنات‌های منطقه مورد مطالعه استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از ماهیان مورد استفاده در این مطالعه در سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ با استفاده از تور ساچوک در قنات‌های منطقه تفت و مهریز استان یزد انجام شد (جدول ۱). در زمان نمونه برداری باله سینه‌ای یا شکمی سمت راست ماهیان قطع و در الکل اتانل ۹۶ درصد برای مطالعات ژنتیکی تثبیت شد و تعدادی از ماهیان نمونه برداری شده در فرمالین ۱۰ درصد جهت نگهداری در آرشیو تثبیت شدند.

نمونه‌های DNA با استفاده از روش Chelex100 استخراج شدند (Estoup et al., 1996). برای تکثیر ژن *COI*، آغازگرهای *RCOI20III* (TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG) و *FCOI20* (5'-AACCTCTGTCTTCGGGGCTA-3') قرار گرفتند (Hashemzadeh Segherloo et al., 2012). برای انجام عملیات تعیین توالی ژن *COI*، ابتدا این ژن تکثیر شد. هر واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ ایکس، ۰/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بیوتنگ (۵ واحد در میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر DNA بود (Estoup et al., 1996). شرایط دمایی واکنش زنجیره پلیمرز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۵ چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه)، ۵۵ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) و در نهایت یک چرخه ۱۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. در

نتیجه واکنش PCR، یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز تکثیر شد. برای انجام بررسی های شجره‌شناسی، توالی انتهای 5' ژن *COI* با استفاده از دستگاه ABI 3100 تعیین شد. برای انجام عملیات تعیین توالی از آغازگر پیشرو (*FCOI20*) استفاده شد. توالی های خام به صورت چشمی با استفاده از نرم افزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدند. عملیات انطباق توالی های *COI* با استفاده از نرم افزار ClustalX (1.83) (Thompson *et al.*, 1997) انجام شد. به منظور یافتن توالی های مشابه برای استفاده در بررسی شجره‌شناسی، هاپلوتایپ های به دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن (NCBI) با سایر توالی های موجود برای گونه های کپورماهیان (Cyprinidae) مقایسه شدند (Altschul *et al.*, 1997) و تعدادی از ژن های موجود در بانک ژن نیز در بررسی های رده بندی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پس از انطباق و یکپارچه کردن توالی ها، یک قطعه به طول ۶۳۵ جفت باز انتخاب شد، که در بین ماهیان مورد مطالعه و توالی های موجود در بانک ژن مشترک بود. برای این که شاخصی کمی برای مقایسه مقدار تمایز در بین گونه ها در دست باشد، از فاصله ژنتیکی K2P (Kimura, 1980) محاسبه شده با استفاده از نرم افزار MEGA6 استفاده شد (Tamura *et al.*, 2013). برای ترسیم دارنگاره از روش Maximum Parsimoni و Neighbor-Joining موجود در نرم افزار MEGA6 استفاده شد. از توالی ژن *COI* ماهی *Danio rerio* به عنوان گروه خارجی استفاده شد. برای تأیید اعتبار شاخه های دارنگاره از آزمون بوسترپ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. علاوه بر موارد یادشده برای تعیین حوضه منشأ نمونه های قنات ها از نمونه های متعلق به سایر حوضه ها مثل حوضه کر، نمک و کرمان استفاده شد.

برای ترسیم شبکه هاپلوتایپی و مشاهده روابط هاپلوتایپ های به دست آمده از نرم افزار TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) استفاده شد. برای مشاهده همه هاپلوتایپ ها در یک شبکه هاپلوتایپی، تعداد گام های جهشی در نرم افزار افزایش داده شد.

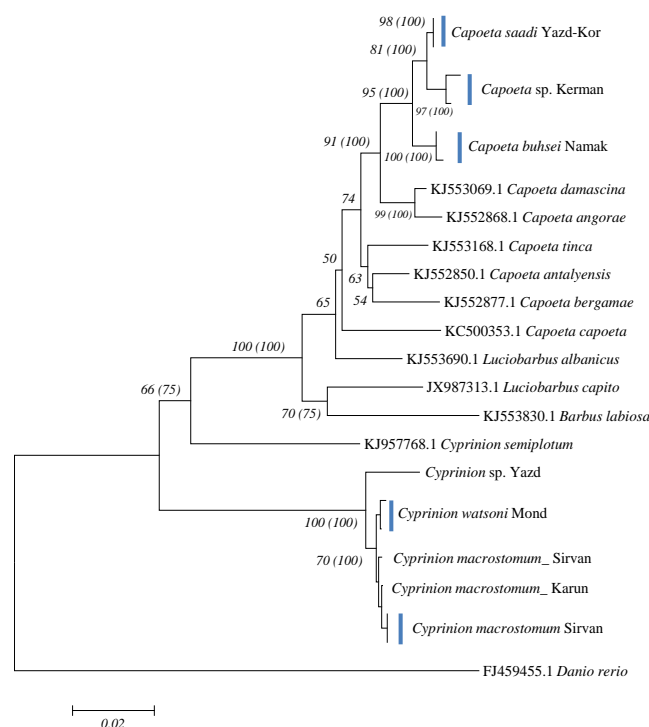
جدول ۱. مشخصات قنات های نمونه برداری شده

منطقه	نام قنات	گونه	تعداد نمونه	N	E
مهریز	بغداد آباد	<i>Cyprinion</i> sp.	۱۰	۳۱° ۳۵' ۲۳"	۵۴° ۲۴' ۸"
بخ	حسن آباد	<i>Capoeta saadi</i>	۳	۳۱° ۱۷' ۹"	۵۴° ۴۴' ۲۷"
مهریز	حسن آباد	<i>C. saadi</i>	۳	۳۱° ۳۳' ۰/۳۳"	۵۴° ۲۵' ۴۳/۷"
مهریز	حسن آباد	<i>C. saadi</i>	۱	۳۱° ۳۳' ۰/۳۳"	۵۴° ۲۵' ۴۳/۷"
تفت	گاریز علیا	<i>C. saadi</i>	۴	۳۱° ۱۸/۲۱۲'	۵۴° ۶/۲۶۹'
مهریز	حسن آباد	<i>C. saadi</i>	۸	-	-
تفت	خوراشه	<i>C. saadi</i>	۲	۳۱° ۴۳' ۴/۹"	۵۴° ۶' ۲"
تفت (گاریزات)	بخ	<i>C. saadi</i>	۴	۳۱° ۲۸' ۳۱"	۵۴° ۷' ۲۶"

نتایج

در مجموع در قنات های مورد بررسی در تفت و مهریز در همه موارد به استثنای یک قنات، گونه های جنس *Capoeta* مشاهده شدند. در تنها مورد متفاوت گونه مشاهده شده از جنس *Cyprinion* بود. در این مطالعه یک قطعه از انتهای 5' ژن *COI* به طول ۷۸۸ جفت باز به دست آمد. در قنات های مورد مطالعه در یزد تنها یک هاپلوتایپ برای هر کدام از جنس های *Capoeta* و *Cyprinion* مشاهده شد. در مجموع ترکیب نوکلئوتیدها در این توالی شامل ۲۸/۴ درصد تیمین، ۲۸ درصد سیتوزین، ۲۵/۸ درصد آدنین و ۱۷/۷ درصد گوانین بود.

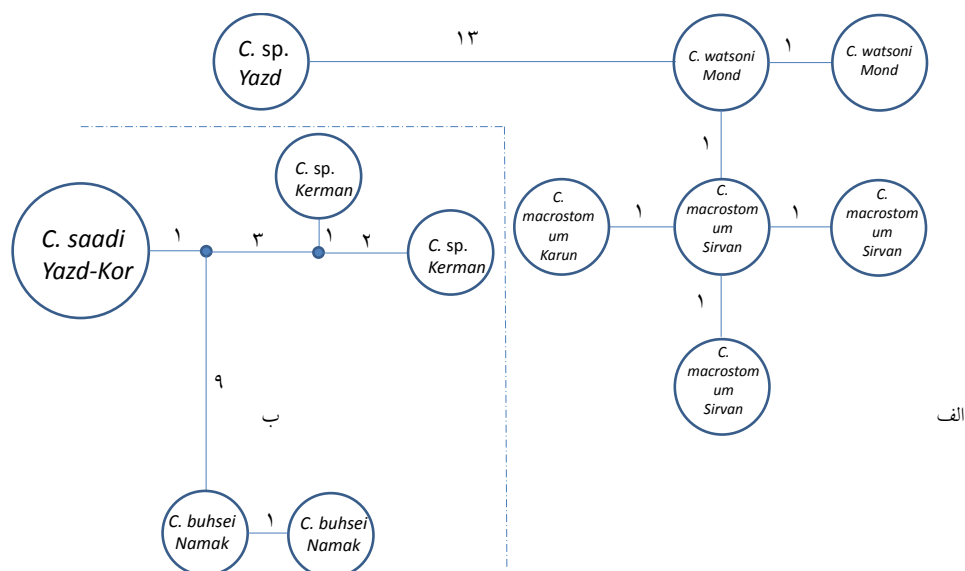
گونه های جنس *Capoeta* یک گروه تک شجره ای را تشکیل دادند و جنس های دیگر مثل *Barbus* و *Luciobarbus* نسبت به آنها دارای جایگاه اجدادی بودند. گونه های *Cyprinion* هم در مقایسه با جنس های یاد شده در یک خوشه پایه ای قرار گرفتند (شکل ۱). فاصله ژنتیکی در بین هاپلوتایپ های *Cyprinion* متعلق به رودخانه های سیروان، کارون و مند بین ۰/۱۳ تا ۰/۳۸ درصد بود، اما هاپلوتایپ نمونه متعلق به یزد دارای فاصله ۱/۶۸ تا ۱/۹۴ درصد نسبت به آنها بود (جدول ۲). در بین هاپلوتایپ های جنس *Capoeta* مقدار فاصله ژنتیکی ۰/۱۳ تا ۱/۶۸ درصد بود که کمترین فاصله در بین هاپلوتایپ های گونه *Capoeta buhsei* Kessler 1877 حوضه نمک مشاهده شد (جدول ۲). هاپلوتایپ مشاهده شده در منطقه یزد با هاپلوتایپ متعلق به حوضه کر یکسان بود (شکل ۲).



شکل ۱. دارنگاره ترسیم شده با روش الحاق همسایگی (NJ) برای توالی های ژن *COI* ماهیان مورد مطالعه و توالی های موجود در بانک ژن (NCBI). اعداد روی خطوط مقادیر ضرایب بوسترپ را نشان می دهند. اعداد داخل پرانتز مربوط به روش ماکزیمم پارسیمونی و اعداد خارج از پرانتز مربوط به روش الحاق همسایگی هستند. اعداد قابل مشاهده در کنار نام های علمی کدهای دسترسی هاپلوتایپ های مورد استفاده از بانک ژن هستند.

جدول ۲. فواصل K2P محاسبه شده با استفاده از نرم افزار MEGA6 (درصد)

شماره	گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	<i>Cyprinion macrostomum</i> - Karun											
۲	<i>C. macrostomum</i> - Karun	۰/۱۳										
۳	<i>C. macrostomum</i> - Sirvan	۰/۲۵	۰/۱۳									
۴	<i>C. macrostomum</i> - Sirvan	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۲۵								
۵	<i>Cyprinion watsoni</i> - Mond	۰/۳۸	۰/۲۵	۰/۳۸	۰/۳۸							
۶	<i>C. watsoni</i> - Mond	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۱۳						
۷	<i>Capoeta buhsei</i> - Namak	۱۱/۷	۱۱/۸	۱۱/۷	۱۱/۷	۱۱/۸	۱۱/۷					
۸	<i>C. buhsei</i> - Namak	۱۱/۸	۱۲	۱۱/۸	۱۱/۸	۱۲	۱۱/۸	۰/۱۳				
۹	<i>Capoeta saadi</i> -Yazd	۱۱/۳	۱۱/۵	۱۱/۳	۱۱/۳	۱۱/۵	۱۱/۳	۱/۰۲	۱/۱۵			
۱۰	<i>Cyprinion sp.</i> -Yazd	۱/۹۴	۱/۸۱	۱/۹۴	۱/۹۴	۱/۸۱	۱/۶۸	۱۲/۸	۱۲/۹	۱۲/۴		
۱۱	<i>Capoeta sp.</i> -Kerman	۱۱/۵	۱۱/۶	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۶	۱۱/۵	۱/۵۴	۱/۶۸	۰/۷۷	۱۲/۶	
۱۲	<i>Capoeta sp.</i> -Kerman	۱۱/۳	۱۱/۵	۱۱/۳	۱۱/۳	۱۱/۵	۱۱/۳	۱/۴۱	۱/۵۴	۰/۶۴	۱۲/۱	۰/۳۸



شکل ۲. شبکه هاپلوتایپی ماهیان قنات های مهریز و نفت یزد. الف: ماهیان جنس *Cyprinion* یزد در مقایسه با هاپلوتایپ های *C. macrostomum* کارون و دجله و *C. watsoni* رودخانه مند، ب: ماهیان جنس *Capoeta* یزد در مقایسه با هاپلوتایپ های متعلق به حوضه های نمک، کرمان و کر. هر کدام از دایره های سفید نشان دهنده یک هاپلوتایپ و دایره های کوچک تیره رنگ نشان دهنده محل جدا شدن مسیرهای جهشی و اعداد موجود در کنار خطوط نشان دهنده تعداد گامهای جهش در بین هاپلوتایپ ها است. خط چین ها مرز دو شکل را مشخص می کنند.

بحث

در بررسی های شجره شناسی ماهیان *Capoeta* یزد و حوضه کر در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۱). هاپلوتایپ های کرمان خوشه خواهری آنها و هاپلوتایپ های حوضه نمک نسبت به آنها یک خوشه اجدادی ایجاد کرد. سایر گونه هایی که از بانک ژن مورد استفاده قرار گرفتند نیز نسبت به نمونه های مورد مطالعه دارای حالت اجدادی بودند و در مجموع گونه های این جنس یک گروه تک شجره ای را تشکیل دادند (شکل ۱) که با نتایج مشاهده شده توسط Levin و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. گونه های جنس *Luciobarbus* و *Barbus* نسبت به جنس *Capoeta* دارای وضعیت اجدادی هستند و در خوشه های پایه ای قرار گرفتند که این مورد نیز با گزارش های عنوان شده در منابعی مثل Levin و همکاران (۲۰۱۲)، Grillo و Venora (۲۰۱۱)، Wang و همکاران (۲۰۱۳) همخوانی دارد. در مورد جنس *Cyprinion* مشاهده شد که این جنس نسبت به جنس های *Barbus*، *Luciobarbus*، *Capoeta* و *Barbus* دارای حالت اجدادی است (شکل ۱). برای توجیه این مشاهده می توان به بررسی وضعیت پلوئیدی جنس های یاد شده پرداخت. ماهیان جنس *Capoeta* هگزا پلوئید ($2n=150$)، ماهیان جنس های *Luciobarbus* و *Barbus* تتراپلوئید ($2n=100$) و ماهیان جنس *Cyprinion* دیپلوئید ($2n=50-52$) هستند (Levin et al., 2012). با فرض اینکه دیپلوئیدی حالت کروموزومی اجدادی بوده و حالت های پلی پلوئید از آن مشتق شده اند می توان حالت اجدادی آن را تأیید کرد.

یکی از ویژگی های ماهیان جنس *Capoeta* وجود حالت تیغ مانند غضروفی در لب پایین این ماهیان است که با استفاده از آن می توانند جلبک های سطح سنگ ها را خراشیده و از آن تغذیه کنند (Levin et al., 2012). این صفت در ماهیان *Cyprinion* و تعدادی از سایر جنس های کپورماهیان هم وجود دارد (Coad, 2014). این شباهت می تواند نشان دهنده تکامل همگرای صفت یاد شده در چند گروه از کپورماهیان در مراحل مختلف تکامل آنها باشد. از سوی دیگر با توجه به اینکه پژوهشگران باور دارند جنس *Capoeta* در پی فرآیند آلپلی پلوئیدی (افزایش تعداد کروموزوم ها در پی دورگ گیری) تکامل پیدا کرده است (Levin et al., 2012)، شاید بتوان این صفت را صفتی دانست که از اجداد شرکت کننده در فرآیند دورگ گیری و پیدایش اولیه آنها به ارث رسیده است.

گونه‌های جنس *Cyprinion* شامل *Cyprinion kais* Heckel 1843 در حوضه کارون و خلیج فارس، گونه *Cyprinion* Heckel 1843 *macrostomum* بیشتر در حوضه کارون، دجله، خلیج فارس و احتمالاً هامون جازموریان، *Cyprinion milesi* (Day 1880) در حوضه‌های مکران، جازموریان، مشکید و هرمز، گونه *Cyprinion tenuiradius* Heckel 1847 در حوضه‌های کر، مند، مهارلو و خلیج فارس و *Cyprinion watsoni* (Day 1872) در دشت لوت، هرمز، جازموریان، سیستان، مشکید و مکران گزارش شده‌اند (عبدلی، ۱۳۷۸؛ Coad, 2014). با توجه به پراکنش جغرافیایی و با فرض منطقی منشأ گرفتن این ماهی از نواحی جغرافیایی و حوضه‌های مجاور می‌توان آن را گونه *C. tenuiradius* دانست اما از نظر ریخت‌شناسی و به ویژه تعداد شعاع‌های باله پشتی این نمونه به *C. watsoni* شباهت بیشتری داشت. برای مشخص شدن جایگاه رده‌بندی این نمونه باید نمونه‌های گونه‌های این جنس را به ویژه از حوضه‌های مجاور تهیه و با آن مقایسه کرد. با مقایسه‌های انجام شده مشخص شد ماهیان قنات‌ها از گونه *Capoeta saadi* هستند که در حوضه کر وجود دارد. در همه قنات‌ها تنها یک هاپلوتایپ مشاهده شد که با هاپلوتایپ مشاهده شده در حوضه کر یکسان بود. این ماهیان با ماهی‌های کرمان در ۴-۶ جفت باز و با ماهیان حوضه نمک در ۱۰-۱۱ جفت باز از مجموع ۸۷۳ جفت باز تفاوت داشتند (شکل ۲). تفاوت آنها با هاپلوتایپ‌های کرمان می‌تواند نشان‌دهنده فاصله جغرافیایی و منشأ متفاوت ماهی‌های کرمان باشد. با توجه به تفاوت اندک ۰/۷۷-۰/۶۴ درصد (جدول ۲) انتظار نمی‌رود نمونه‌های کرمان از گونه متفاوتی باشند، زیرا در مطالعات بارکدینگ ماهیان آب شیرین مقدار میانگین تمایز درون‌گونه‌ای حدود ۰/۳ درصد بیان شده است (Hubert et al., 2008; Lara et al., 2010) و حدود کمینه و بیشینه تمایز درون‌گونه‌ای در مطالعات یاد شده دربرگیرنده مقادیر مشاهده شده در این مطالعه هم هست. می‌توان تمایز مشاهده شده را به فاصله جغرافیایی نیز نسبت داد. زیرا با افزایش فاصله جغرافیایی تمایز هاپلوتایپ‌ها هم افزایش پیدا می‌کند. در مورد ماهیان جنس *Cyprinion* منطقه مورد مطالعه نمی‌توان قضاوت خاصی نمود، زیرا نمونه‌های حوضه‌های نزدیک به منطقه مورد مطالعه به غیر از حوضه مند در اختیار نبود که بتوان مقایسه انجام داد، اما می‌توان عنوان نمود که هاپلوتایپ یزدی نسبت به گونه *C. macrostomum* کارون و سیروان و همچنین نسبت به نمونه‌هایی که در رودخانه مند به عنوان *C. watsoni* شناسایی شدند، تفاوت دارد و این تفاوت ۱/۶۸ تا ۱/۹۸ درصد است که نشان‌دهنده تفاوت گونه‌ای آن است. بر پایه شبکه هاپلوتایپی ترسیم شده (شکل ۲) قدیمی‌ترین هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در این مطالعه مربوط به *C. macrostomum* در رودخانه سیروان و *C. watsoni* رودخانه مند است و سایر هاپلوتایپ‌ها و به ویژه هاپلوتایپ کارون از هاپلوتایپ‌های جدید هستند، زیرا دو هاپلوتایپ سیروان و مند در مسیر جهش قرار داشته و هاپلوتایپ‌های حاشیه‌ای از آنها منشأ گرفته‌اند. برپایه آنچه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، هاپلوتایپ‌های رودخانه مند تفاوت قابل توجهی با هاپلوتایپ‌های رودخانه‌های سیروان و کارون ندارند، این امر نشان می‌دهد که نمونه‌های رودخانه مند نیز حداقل از نظر شجره‌مادری از گونه *C. macrostomum* هستند که احتمالاً از طریق حوضه دجله در زمانی که خلیج فارس تقریباً خشک بوده است (لک و نژادافضلی، ۱۳۹۰) و همه رودخانه‌های حوضه آن با هم ارتباط داشته‌اند، به این نواحی راه یافته‌اند و یا برعکس از شرق به غرب و به دجله نفوذ کرده‌اند. در حال حاضر قدیمی‌ترین فسیل‌های *Cyprinion* در آناتولی کشف شده است (Böhme et al., 2003)، با فرض این موضوع مسیر غرب-شرق قابل پذیرش است اما با توجه به منشأ شرقی کپورماهیان و *Cyprinion* و با توجه به اینکه نمونه‌های یزد دارای تمایز نسبتاً زیادی در مقایسه با نمونه‌های مند و کارون و سیروان هستند، شاید بتوان منشأ نمونه‌های یزد را از مسیرهایی پیگیری کرد که قدمت آنها بسیار بیشتر از قدمت خشکی خلیج فارس باشد.

تنوع هاپلوتایپی در درون و در بین قنات‌های مختلف منطقه مورد بررسی صفر بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تعلق احتمالی آنها به یک جمعیت و انتقال مرحله به مرحله آنها از قناتی به قنات دیگر باشد. به این مفهوم که اولین بار از حوضه رودخانه کر تعداد محدودی ماهی به یکی از قنات‌ها رهاسازی شده است و پس از مدتی توسط انسان به سایر قنات‌های منطقه انتقال یافته‌اند. از سوی دیگر عدم مشاهده تنوع هاپلوتایپی می‌تواند نشان‌دهنده کوچک بودن اندازه جمعیت‌های ماهیان قنات باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است. به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. نگارنده بر خود لازم می‌داند از سرکار خانم مهندس زکیه مباشری‌زاده که در تهیه نمونه‌ها همکاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل آورد.

منابع

- ابراهیمی، م. ۱۳۸۶. ماهیان قنات‌های حوضه آبریز مرکزی و حوضه آبریز سیرجان (استان کرمان). مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم، شماره ۲، صفحات ۱۶۰-۱۵۳.
- جوهری، س. ع.، مظلومی، س.، عبدلی، ا.، خواجوی، ح.، اصغری، ص. ۱۳۸۹. شناسایی و تعیین پراکندگی ماهیان قنات و رودهای دایمی شهرستان قائنات. مجله شیلات. سال چهارم، شماره ۱، صفحات ۱۱۵-۱۲۰.
- صادقی ح.، شجیعی، ه.، شرفی، ش. ۱۳۹۱. شناسایی فون و بررسی پراکنش ماهیان قنات‌های شهرستان شاهرود. مجله زیست‌شناسی جانوری. سال پنجم، شماره ۲، صفحات ۶۳-۷۷.
- عبدلی، الف. ۱۳۷۸. ماهیان آبهای داخلی ایران. موزه طبیعت و حیات وحش. ۳۷۸ ص.
- لک، ر.، نژاد افضل، ک. ۱۳۹۰. بررسی تغییرات زمین‌ریخت‌شناسی (ژئومورفولوژی) و رسوب‌شناسی بخش‌های ساحلی و کم‌ژرفای کشور امارات در اثر ساخت جزایر مصنوعی. مجله علوم زمین. سال بیست و یکم، شماره ۸۱، صفحات ۶۸-۶۱.
- مشکانی، م.، پورکاسمانی، م. ا. ۱۳۸۲. شناسایی ماهیان قنات‌های بخش مرکزی بیرجند. مجله علمی شیلات ایران. سال دوازدهم، شماره ۴، صفحات ۱۷۲-۱۶۳.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- Böhme, M., Reichenbacher, B., Schulz-Mirbach, T., München, L. 2003. Neogene freshwater fishes from Anatolia – a key for understanding the (palaeo-) biogeography of European freshwater fishes. Paper presented at the International Symposium of Fisheries and Zoology, Istanbul.
- Clement, M., Posada, D.C.K.A., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1659.
- Coad, B.W. 2014. Freshwater Fishes of Iran. Available at: www.briancoad.com.
- Estoup, A., Largiader, C., Perrot, E., Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5: 295-298.
- Grillo, O., Venora, G. 2011. Changing diversity in changing environment. 1st edition. InTech. 402 p.
- Hallerman, E.M. 2003. Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. 1st edition. American Fisheries Society Publications. 475 p.
- Hashemzadeh Segherloo, I., Bernatchez, L., Golzarianpour, K., Abdoli, A., Primmer, C.R., Bakhtiary, M. 2012. Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. *Fish Biology*. 81(5): 1747-1753.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 270: S96-S99.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Burrige, M., Watkinson, D., Curry, A., Bentzen, P., Jhang, J., April, J., Bernatchez, L. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*, 3(6): e2490.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Lara, A., Rodríguez, R., Casane, D., CÔTÉ, G., Bernatchez, L., García-Machado, E.R.I.K. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*. 10(3): 421-430.

- Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özuluğ, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B., Doadrio, I. 2012. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 542-549.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Wang, J., Wu, X.Y., Chen, Z., Yue, Z.P., Ma, W., Chen, S.Y., Xiao, H., Murphy, R.W., Zhang, Y.P., Zan, R.G., Luo, J. 2013. Molecular phylogeny of European and African *Barbus* and their West Asian relatives in the Cyprininae (Teleostei: Cypriniformes) and orogenesis of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Chinese Science Bulletin*. 58(31): 3738-3746.