شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

صفحات ۳۵-۲۶

مطالعه جایگاه رده‌بندی سیاه‌ماهی *Capoeta aculeata* در قنوات نائین-اردستان، حوضه نمک و رودخانه‌های حوضه کارون با استفاده از ژن *COI*

اسامه بابایی[۱]، ایرج هاشم زاده سقرلو[۲]، راضیه پوراحمد[۳]، مجتبی پوریا[۴]، اصغر عبدلی[۵]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴. کارشناس اداره شیلات استان کرمانشاه، ایران.

۵. دانشیار گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۱

چکیده

در این مطالعه جمعاً ۱۸ قطعه ماهی از گونه *Capoeta aculeata* (۹ قطعه از قنوات نائین و اردستان در استان اصفهان، ۲ قطعه از قنات حوضه نمک در استان تهران و ۷ قطعه ماهی از رودخانه‌های ماربر، دوپلان و آب‌ونک (حوضه کارون) و چنار خشکه (حوضه کر) در استان لرستان) به‌منظور تهیه توالی بارکد مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه توالی انتهای 5' ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد ۱ (COI) تهیه شد. در مجموع ۵ هاپلوتایپ به‌دست آمد. هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در قنوات اردستان و قنوات استان تهران کاملاً مشابه بودند که این تشابه می‌تواند نشان‌دهنده منشأ یکسان ماهیان قنوات منطقه اردستان و قنوات نمونه‌برداری شده در استان تهران باشد. هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در ماهیان قنوات نائین با هاپلوتایپ‌های سایر نواحی تفاوت داشتند. هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در حوضه کارون با هاپلوتایپ-های حوضه نمک رابطه نزدیکی داشتند که این امر می تواند به نوعی نشان‌دهنده رابطه احتمالی دو حوضه یادشده در گذشته باشد. میزان تمایز توالی بارکد در سطح درون گونه‌ای جمعیت‌های نواحی ذکر شده بر پایه ضریب تمایز K_2P برابر ۰/۲ تا ۰/۷ درصد بود. نتایج نشان داد که گونه *Capoeta* دارای یک گروه تک شجره‌ای بوده و در مقایسه با گونه‌های سایر جنس‌های مورد بررسی به گونه‌های جنس *Luciobarbus* نزدیک‌تر بود. انشقاق این گونه از *C. capoeta* در حدود ۴/۴۲ تا ۵/۱ میلیون سال قبل برمی‌گردد.

واژگان کلیدی: رده‌بندی، قنوات، *Capoeta aculeata*، قنوات، ژن COI، نائین، اردستان، حوضه نمک، حوضه کارون.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۹۱۲۵۴۶۱۱۲۷+ ایمیل: ihashem@nres.sku.ac.ir

۱. مقدمه

کشور ایران از نظر اقلیم در گروه کشورهای خشک-نیمه خشک قرار دارد و قسمت قابل توجهی از آن را مناطق کویری و خشک تشکیل داده است. امروزه پدیده خشکسالی، تغییر اقلیم، برداشت بی‌رویه و غیراصولی از منابع آبی و بحران آب در کشور مطرح است. مشکل کم آبی در نواحی خشک و نیمه‌خشک کشور شامل کویر مرکزی بیش از سایر مناطق خودنمایی می‌کند. در نواحی یادشده به‌علت کمبود بارندگی و فقر آب‌های سطحی، منابع آب زیرزمینی از منابع راه‌بردی محسوب می‌شوند. در این میان قنات‌ها به‌عنوان یکی از شاخص‌های دانش بومی-سنتی که یکی از جاذبه‌های گردشگری کشورمان محسوب می-شوند، در تأمین نیازهای آبی مختلف برای کشاورزی و شرب نقش بسیار مهمی داشته و در مناطق یادشده با توجه به کمبود منابع آب سطحی به‌عنوان پناه‌گاهی برای حیات آبزیان بومی عمل می‌کنند. قنات با ایجاد درجه حرارت نسبتاً ثابت، جریان ملایم آب، ایجاد سایه و محافظت از لارو و تخم ماهی در برابر شکارچی زیستگاه مناسبی را برای ماهی به وجود می‌آورد (Coad, 1996). امروزه قنات‌ها بواسطه حفر چاه‌های عمیق و برداشت بیش از حد منابع آب زیرزمینی در بسیاری از نقاط کشور در حال خشک شدن هستند. با توجه به روند خشک شدن قنات‌ها بیم آن می‌رود که آبزیان بومی مناطق کویری و ذخایر ژنتیکی آن‌ها بدون شناسایی و تلاش برای حفاظت از آنها منقرض شوند. از سایر تهدیدهایی که حیات آبزیان قنات‌ها با آن روبرو است، فعالیت‌هایی است که برای تصفیه و ضدعفونی کردن آب شرب قنات ها انجام می‌شود.

با توجه به موارد یادشده شناخت تنوع زیستی آبزیان قنات ها به‌ویژه در مناطق خشک کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. در مورد ماهیان قنات و شناسایی آنها در ایران پیش‌تر مطالعاتی توسط Coad (۱۹۹۶)، Johari و همکاران (۲۰۱۱)، Meshkani و Pourkasmani (۲۰۰۳)، Bdri Fariman و همکاران (۲۰۱۱) و Ostovari و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده است. مطالعات یاد شده بیشتر با تکیه بر روش های ریخت‌شناسی انجام شده‌اند. ویژگی‌های مورد استفاده در روش‌های ریخت‌شناسی ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گرفته و شناسایی مرتبط با آن‌ها با خطا همراه باشد. به‌همین دلیل شناسایی تنوع زیستی با استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند در ثبت تنوع زیستی که در روش‌های ریخت-شناسی ناشناخته باقی می‌ماند مفید باشد (Freeland, 2003).

برای انجام مطالعات ژنتیکی می‌توان از روش‌ها و ژن‌های مختلفی استفاده کرد که هر کدام از روش‌ها و ژن‌ها بسته به هدف پژوهش می‌تواند مفید باشد. ژنوم میتوکندریایی به‌دلیل هاپلوئید بودن، عدم نوترکیبی و ضریب جهش بالاتر نسبت به ژنوم هسته‌ای می‌تواند تقویم دقیق‌تری را در رابطه با حوادث تکاملی در مقایسه با ژنوم هسته‌ای در اختیار قرار دهد (Hallerman, 2003; Habib *et al*., 2010). همچنین mtDNA تنوع بیشتری در توالی بازهای آلی دارد که در نتیجه تشخیص گونه‌هایی که روابط خویشاوندی کاملاً نزدیکی دارند، را امکان‌پذیر می‌نماید (Zhang *et al*., 2006). از سوی دیگر به‌علت آن‌که در بین ماهیان گروه‌های پلی‌پلوئیدی مثل کپورماهیان، آزادماهیان، گربه‌ماهیان و تاس‌ماهیان وجود دارند، وجود بیش از یک نسخه از هر ژن می‌تواند استفاده از ژنوم هسته‌ای و توالی ژن‌های آن را برای اهداف شجره-شناسی با مشکل همراه سازد. اخیراً استفاده از روش بارکدینگ ژنتیکی به‌عنوان روشی سریع و قابل اعتماد به‌منظور شناسایی گونه‌ها افزایش یافته است (Keskin and Atar, 2013). هدف اولیه از بارکدینگ DNA، شناسایی گونه‌های جدید است. توالی‌های بارکد به‌منظور بهبود شناسایی گونه‌ها از طریق مطالعه الگوهای تمایز توالی با استفاده از بخش کوچکی از DNA، به‌عنوان منطقه استانداردی ژنوم عمل می‌کنند (Kerr *et al*., 2007). ژن *COI* بزرگ‌ترین ژن میتوکندری موجودات پرسلولی (یوکاریوتی) است و از بخش‌های مختلف این ژن جهت مطالعه در گروه‌های مختلف به‌ویژه در سطح گونه‌ها و جمعیت‌ها استفاده می‌شود. در جانوران مطالعات به قطعه‌ای با ۶۴۸ جفت باز از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز ۱ (*COI*) ختم می‌شود، که می‌توان با استفاده از تعداد محدودی آغازگر در گونه‌های مختلف تکثیر کرد (Kerr *et al*., 2007). علی‌رغم کوتاه بودن این ناحیه، تعیین توالی سریع و ارزان آن، اطلاعات کافی را برای شناسایی و

تفکیک گونه‌های نزدیک فراهم می‌آورد. این ژن در جانوران مختلف از جمله مهره‌داران و بی‌مهرگان بررسی شده است که بیش از ۹۴ درصد گونه‌های مورد مطالعه دارای بارکد مشخص و متمایز نسبت به سایر گونه‌های نزدیک، بوده‌اند، گونه‌های ماهیان هم در این گروه قرار می‌گیرند (Hashemzadeh *et al*., 2013). بین نواحی ژنوم میتوکندریایی، ژن *COI* نشانگر قدرتمندی برای شناسایی، در سطح گونه‌ای و درون‌گونه‌ای است (Gajardo *et al*., 2004)، که در این مطالعه نیز از توالی ژن یادشده استفاده شده است.

در قنات‌های ایران فون غالب ماهیان را گونه های متعلق به کپورماهیان تشکیل می دهند (Coad, 1996) و بیشترین نسبت گونه‌های ماهیان قنات متعلق به جنس *Capoeta* است. در بحث رده‌بندی و تنوع زیستی گونه‌های این جنس در قنات‌های ایران مطالعات اندکی صورت گرفته و همان‌طور که پیش‌تر عنوان شد، مطالعات یادشده محدود به بررسی‌های ریخت‌شناسی است. هفت گونه از این جنس در ایران یافت می‌شوند (Coad, 2013)، که گونه سیاه‌ماهی زرده‌پر (*C. aculeata*) در چند حوضه آبریز پراکنش دارد. این پراکنش از طریق رودخانه‌های حوضه‌های مختلف، دریاچه‌های کوچک و آبراهه‌های گسترده در قدیم و تحت رژیم‌های بارانی ایجاد شده است (Abdoli, 2000). اغلب بررسی‌های صورت گرفته توسط محققان از دهه ۱۹۵۰ تاکنون، بر روی جنس سیاه‌ماهی بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی، صفات-شمارشی و تعداد محدودی مطالعات کروموزومی بوده است، اما در سال های اخیر مطالعات رو به افزایشی در رابطه با رده بندی مولکولی ماهیان و به‌ویژه کپورماهیان انجام شده و یا در حال انجام است. تاکنون مطالعات قابل توجهی در رابطه با شجره‌شناسی مولکولی گونه های *Capoeta* و یا سایر گونه‌های نزدیک به این جنس در قنات‌ها در ایران انجام نشده است.

در مطالعه‌ای که بر روی اعضای خانواده کپورماهیان با استفاده از ژن سیتوکروم ب انجام شد، سیاه‌ماهی را خویشاوند نزدیک به باربوس‌های اروپا-مدیترانه (جنس *Luciobarbus*) دانستند (Durand *et al*., 2002; Levin *et al*., 2012). در بررسی دیگری مشخص شد که اعضای خانواده سیاه-ماهی با گونه‌های *Luciobarbus* خویشاوندی نزدیک دارند (Tsigenopoulos *et al*., 2010). بررسی‌هایی بر روی تمایز میان شش جمعیت از گونه *Capoeta capoeta gracilis* با استفاده از نسبت‌های ریخت-شناسی و نشانگرهای ژنتیکی در رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر انجام شد، که در آن تفاوت زیادی بین نتایج مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی مشاهده شد (Samaee *et al*., 2006). Hashemzadeh و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از توالی ژن *COI*، ماهیان جنس سیاه‌ماهی را در سرشاخه‌های کارون و دجله مورد بررسی قرار دادند، که نتایج نشان داد ماهیان جنس *Capoeta* در یک خوشه شجره‌شناسی و به-صورت تک شجره قرار گرفتند و در مقایسه با سایر گونه‌های مورد بررسی به گونه *Barbus barbus* نزدیک‌تر بودند.

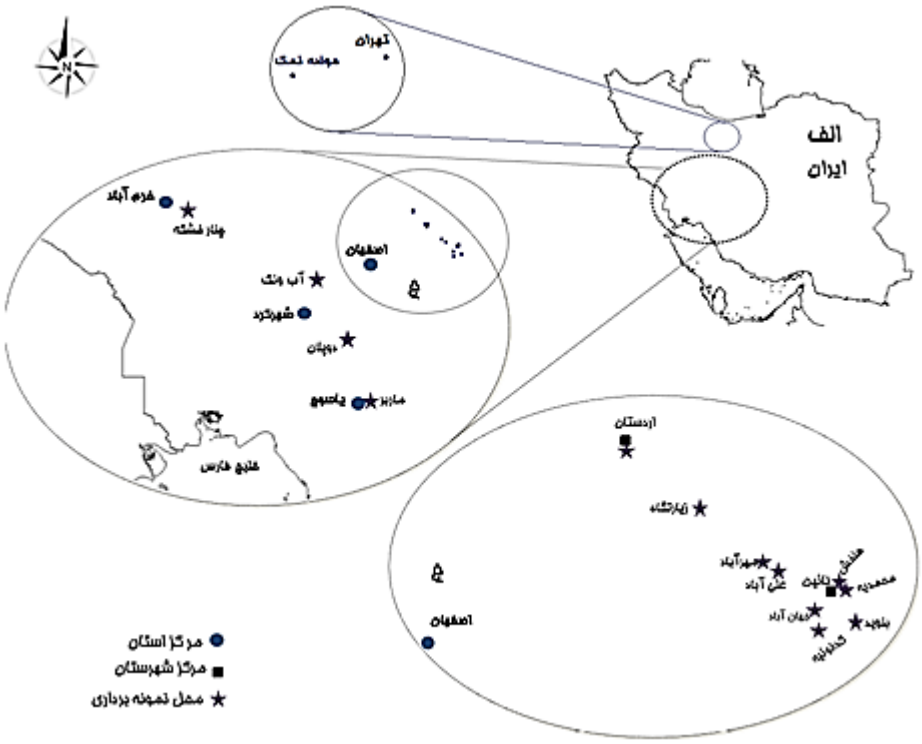
در این پژوهش ماهیان قنات در شهرستان‌های اردستان و نائین در استان اصفهان و قنوات حوضه نمک نسبت به ماهیان مشابه در رودخانه‌های چنارخشکه (کرخه)، دوپلان، ماربر و آب‌ونک (کارون) بررسی شد و جایگاه رده‌بندی این گونه نسبت به دیگر گونه‌های جنس سیاه‌ماهی و همچنین دیگر گونه‌های کپورماهیان با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز ۱ (*COI*) مورد بحث قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از ماهیان مورد استفاده در این مطالعه در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۲، در رودخانه‌های چنارخشکه (حوضه کرخه)، ماربر، دوپلان و آب‌ونک (حوضه کارون) با استفاده از الکتروشوکر و در تعداد ۹ قنات از شهرستان‌های نائین و اردستان در استان اصفهان و یک قنات در حوضه نمک (استان تهران) صورت گرفت (شکل ۱). با توجه به محدود بودن و در معرض خطر بودن جمعیت ماهیان در قنوات، تنها به صید ۱یا ۲ قطعه ماهی در قنات‌ها اکتفا شد. پس از بیهوش کردن ماهی با استفاده از عصاره گل‌میخک، باله سینه‌ای سمت راست ماهی قطع (در نمونه‌های خیلی کوچک، کل ماهی) و در الکل اتانول ۹۶ درصد برای انجام مطالعات ژنتیکی و ماهی کامل در محلول

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر پیشرو (FCOI 120)	پرایمر معکوس (RCOI120)
(5'-AACCTCTGTCTTCGGGGCTA -3')	(5'-TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG -3′)

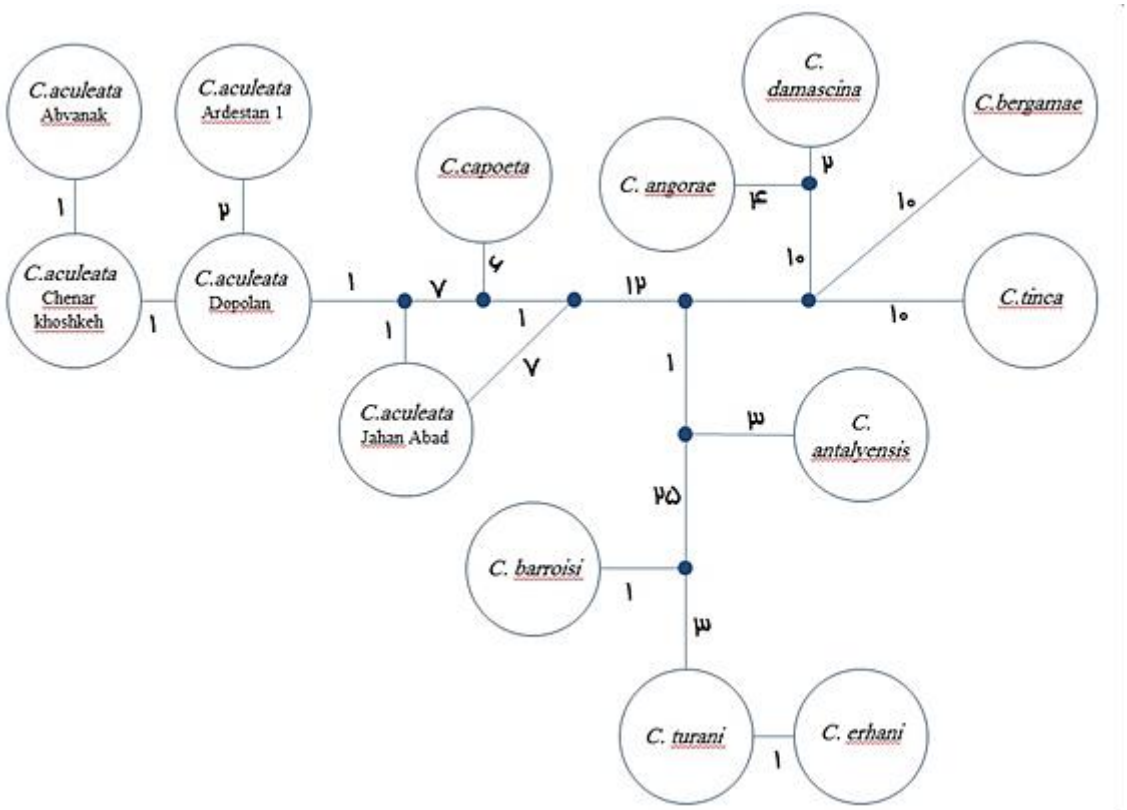


شکل ۱- پراکنش مناطق نمونه‌برداری.

فرمالین ۴ درصد تثبیت شد.

استخراج DNA با استفاده از روش کیلاکس (Chelex 100) صورت گرفت (Estoup *et al.*, 1996). برای ازدیاد قطعه ژن *COI* با روش PCR از یک جفت پرایمر با مشخصات که در جدول ۱ ذکر شده است، استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از ترکیبی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (۵ واحد در میکرولیتر) و دو میکرولیتر DNA استفاده شد (Estoup *et al.*, 1996). واکنش زنجیره ای پلی‌مراز شامل یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای (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، یک قطعه از ژنوم میتوکندریایی به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز تکثیر شد که توالی کامل ژن *COI* را در بر داشت. برای انجام تعیین توالی، نمونه‌ها به خارج از کشور ارسال شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit V 7.2.5 به‌صورت چشمی ویرایش شدند. سپس توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از جست‌وجوی Blast در بانک ژن (NCBI) با دیگر توالی‌های مشابه مربوط به خانواده کپورماهیان مقایسه شد (Altschul *et al.*, 1997). پس از هم‌تراز کردن توالی‌ها با نرم‌افزار ClustalX (2.1) (Thompson *et al.*, 1997)، یک قطعه به طول ۶۱۱ جفت‌باز که در بین ماهیان مورد مطالعه و توالی‌های موجود در بانک ژن یکسان بود، انتخاب گردید. برای مقایسه تمایز در بین گونه‌ها از فاصله ژنتیکی K2P (Kimura, 1980) تعبیه شده در نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد (Tamura *et al.*, 2013). همچنین درخت شجره‌شناسی با استفاده از دو روش الحاق همسایگی (Neighbor-Joining) و روش



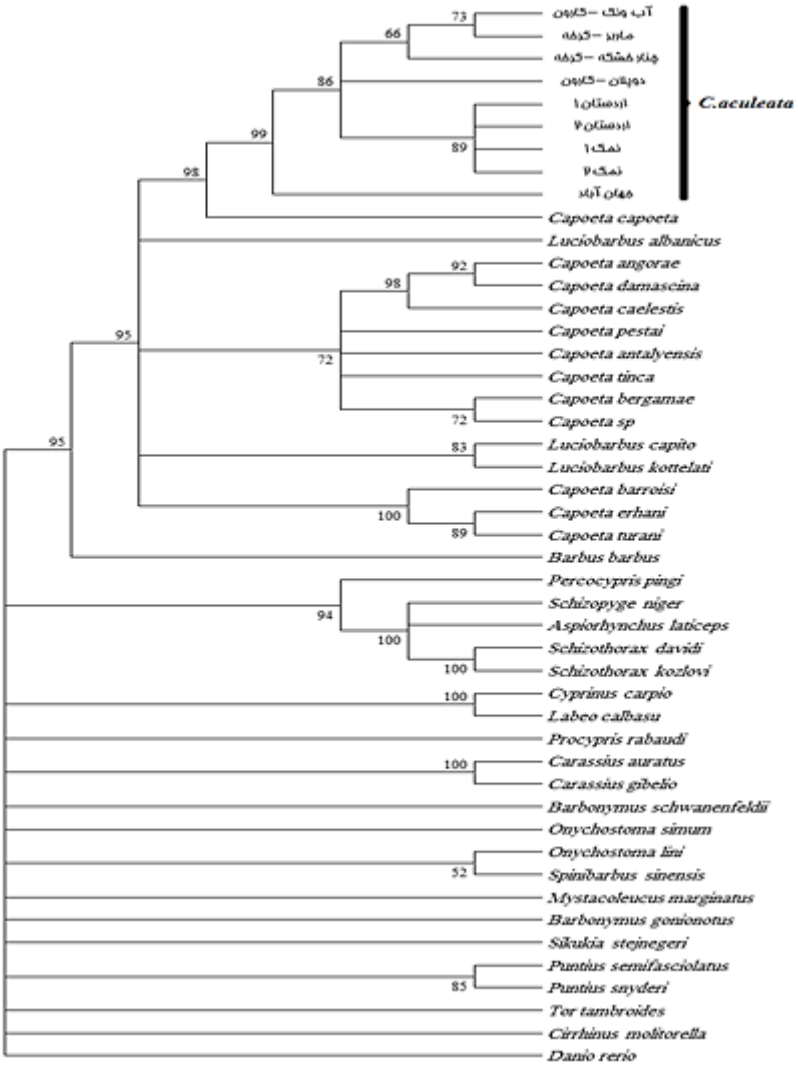
شکل ۲ - شبکه هاپلوتایپی تر سیم شده برای ژن COI ماهیان مورد برر سی. اعدادی که در کنار خطوط قرار دارند، نشان‌دهنده تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت (جهش) در بین هاپلوتایپ‌ها هستند.

حداکثر صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) در نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شد. برای آزمون شجره-شناسی از روش آماری بوتسترپ با ۱۰۰۰ بار تکرار استفاده گردید، که در درخت ترسیم شده شاخه‌های دارای مقادیر بوتسترپ کم‌تر از ۵۰ حذف شدند. از گونه *Danio rerio* به‌عنوان گروه خارجی برای ترسیم دارنگاره استفاده شد. برای رسم شبکه هاپلوتایپی و نمایش روابط هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار TCS 1.21 (Clement *et al*., 2000) استفاده شد و برای مشاهده تمام هاپلوتایپ‌ها در یک شبکه، تعداد گام‌های جهشی (۶۰ جهش) در نرم‌افزار افزایش داده شد. برای محاسبه مدت زمان تمایز در بین هاپلوتایپ ها از ضریب ساعت مولکولی ۰/۵۲ درصد در میلیون سال استفاده شد (Levin *et al*., 2012).

۳. نتایج

در این بررسی در جمعیت‌های قنوات اردستان با جمعیت حوضه نمک یک هاپلوتایپ مشابه، در قنات های منطقه جهان‌آباد نائین یک نوع هاپلوتایپ، در جمعیت‌های آب‌ونک و ماربر یک نوع هاپلوتایپ، و در نمونه‌های چنارخشکه و دوپلان هر کدام یک نوع هاپلوتایپ متفاوت مشاهده شد (شکل ۲). بر اساس دارنگاره ترسیم شده با استفاده از روش NJ، گونه‌های *C. aculeata* در قنوات و رودخانه‌های مورد بررسی با ضریب صحت بالا در یک گروه جای گرفتند (شکل ۳). همچنین درخت رسم شده با روش حداکثر صرفه جویی نتایج مشابهی با روش NJ به‌همراه داشت. گونه-های قنات اردستان با گونه‌های حوضه نمک با ضریب بوتسترپ ۸۹ درصد (روش NJ) و ضریب ۹۶ درصد (روش MP) در یک خوشه خواهری جای گرفتند. نزدیک‌ترین گونه‌ها به جنس سیاه‌ماهی گونه‌های جنس *Luciobarbus* هستند که با ضریب بوتسترپ بالا (۹۵ درصد) در یک خوشه جای گرفتند، همچنین گونه *Barbus barbus* به اعضای این جنس نزدیک بوده و نسبت به آن‌ها خوشه‌ای پایه‌ای را تشکیل می-دهد.

بر اساس فاصله ژنتیکی محاسبه شده با روش K_2P، فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای جمعیت‌های *C. aculeata* مورد مطالعه به مقدار ۰/۲ تا ۰/۷ درصد بود که نشان از رابطه خویشاوندی نزدیک آن‌ها داشت.



شکل ۳ - درخت شجره شناسی ترسیم شده بر اساس روش الحاق همسایگی (NJ) برای توالی‌های به‌دست آمده در این بررسی و توالی‌های گرفته شده از بانک ژن اعدادی که کنار گره‌ها مشاهده می‌شوند، ضریب صحت آزمون بوسترپ با ۱۰۰۰ تکرار هستند.

فاصله ژنتیکی جمعیت‌های *C. aculeata* با گونه‌های *C. capoeta*، *C. tinca* و *C. damascina* در حدود ۲ تا ۵ درصد بود که گونه *C. aculeata* موجود در قنات جهان‌آباد نائین و رودخانه دوپلان حوضه کارون دارای فاصله ژنتیکی ۲/۳ درصد با گونه *C. capoeta* هستند. فاصله ژنتیکی ماهیان رودخانه چنارخشکه در حوضه کرخه نسبت به حوضه کارون اندک (۰/۲ درصد) بود، همچنین اختلاف ماهیان قنوات اردستان و جهان‌آباد با جمعیت‌های کارون ۰/۵ درصد بود.

۴. بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این بررسی گونه *C. aculeata* رابطه خویشاوندی نزدیکی با دیگر گونه‌های جنس سیاه‌ماهی داشته که نزدیک‌ترین گونه به آن جنس *C. capoeta* است که با نتایج مطالعات (Levin *et al.*, 2012) مطابقت دارد. براساس ضریب ساعت مولکولی ۰/۵۲ که برای گونه‌های کپورماهیان در نظر گرفته شده (Levin *et al.*, 2012)، انشقاق این گونه از *C. capoeta* در حدود ۴/۴۲ تا ۵/۱ میلیون سال قبل، همچنین انشقاق آن از *C. barroisi* به ۱۲/۶ تا ۱۴/۲ میلیون سال قبل برمی‌گردد. زمان انشقاق این گونه با سایر گونه‌های جنس سیاه‌ماهی زمانی مابین ۴ تا ۱۴ میلیون سال پیش است. بر اساس مطالعات صورت گرفته قبلی جدا شدن سیاه‌ماهی از جنس *Luciobarbus* در حدود ۱۷ (۶/ ۱۴تا ۲۰/۷) میلیون سال پیش بوده است (Levin *et al.*, 2012)، در این مطالعه زمان انشقاق از *L. albanicus* برای گونه *C. aculeata* (قنات جهان آباد-نائین) حدود ۸/۴ میلیون سال، گونه *C. barroisi* حدود ۱۳/۴ میلیون سال و برای گونه *C. capoeta* حدوداً ۹/۶ میلیون

سال پیش بوده است.

محققان بر پایه مطالعاتی که با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم ب بر روی *Capoeta* انجام داده‌اند، بر این موضوع اتفاق‌نظر پیداکرده‌اند که منشأ سیاه‌ماهی به جنس لوسیوباربوس برمی‌گردد (Tsigenopoulos *et al*., 2010; Levin *et al*., 2012). این جنس خویشاوندی نامشخصی دارد و امکان دارد با باربوس اروپایی یا با گروه *Aulopyge* یا با جنس *Cyprinion* در جنوب و شرق آسیا نسبت نزدیکی داشته باشند (Coad, 2013).

اگرچه برخی از محققان این گونه را جز دسته ماهیان تتراپلوئید می‌دانستند اما کاریوتایپ تمام گونه-های سیاه‌ماهی مشخص کرد که گونه‌های دودمان سیاه‌ماهی هگزاپلوئید (2n=150) هستند (Coad, 2013). حدوداً نیمی از باربوس‌ها و لوسیوباربوس‌ها تتراپلوئید (2n=100) هستند. وضعیت هگزاپلوئیدی سیاه‌ماهی نشان می‌دهد که این گونه در نتیجه یک فرآیند دورگه گیری یا به‌عبارت دیگر بر اثر آلوپلی-پلوئیدی (موجود پلی‌پلویید که کروموزوم‌های آن از دو گونه یا نژاد یا رگه متفاوت سرچشمه گرفته است) به وجود آمده است. گونه‌های سیاه‌ماهی دارای ویژگی‌های ریخت‌شناسی بسیار متمایزی هستند، به‌طور مثال دارا بودن دندان حلقی قاشقی مانند یا غلاف سخت در فک پایین که این ویژگی‌ها در جنس لوسیوباربوس دیده نمی‌شود که حتی از نظر ریخت‌شناسی به گونه سیاه-ماهی تشابه ندارند (Levin *et al*., 2012).

با توجه به این‌که در بین هاپلوتایپ‌های ماهیان نمونه‌برداری شده از ماهیان قنوات منطقه اردستان و ماهیان متعلق به حوضه نمک تفاوت ژنتیکی وجود ندارد، می‌توان ماهیان این ناحیه را از فون ماهیان حوضه نمک دانست، با توجه به نزدیکی جغرافیایی منطقه یادشده قنوات حوضه نمک این موضوع نیز منطقی است. از سوی دیگر ماهیان نمونه‌برداری شده از نائین دارای هاپلوتایپ تا حدی متمایز هستند. این مسئله نشان می‌دهد ماهیان یادشده احتمالاً از منطقه دیگری مثل حوضه زاینده‌رود یا کر بوده و یا هاپلوتایپ متفاوتی از حوضه نمک هستند. با توجه به این‌که قنات‌های یادشده با حوضه کر فاصله جغرافیایی داشته و در قنوات استان یزد در ادامه مسیر از نائین به یزد گونه‌های *C. saadii* و *Cyprinion watsoni* وجود دارند (اطلاعات منتشرنشده)، منشأ گرفتن ماهیان یادشده از ماهیان حوضه کر را می‌توان رد نمود. یکی دیگر از منشأهای احتمالی برای این ماهیان حوضه زاینده‌رود است. با توجه به بررسی‌های انجام‌شده در قنوات منطقه آباده و زاینده‌رود، ماهیان یادشده در هر دو محیط قنات و در رودخانه زاینده‌رود دارای ریخت‌شناسی تا حدی متفاوت هستند. با این اوصاف ماهیان قنوات مورد مطالعه احتمالاً در منطقه نائین نیز از فون ماهیان حوضه نمک منشأ گرفته‌اند و با توجه به اینکه تفاوت‌هایی را از نظر ژنتیکی نسبت به هاپلوتایپ‌های اردستان-تهران نشان می‌دهند می‌توان آن‌ها را بر پایه اطلاعات حاضر از ذخایر متفاوت این ماهی در منطقه دانست. برای حصول اطمینان بیشتر توصیه می‌شود در رابطه با مناطق یادشده و حوضه‌های مجاور مطالعات ژنتیکی بیشتری انجام شود. با توجه به اینکه به‌ویژه در منطقه نائین آب سطحی وجود ندارد، قنات‌ها تنها پناهگاه ماهیان دارای تفاوت ژنتیکی هستند و باید نسبت به حفاظت آن‌ها دقت بیشتری به عمل آید.

از نتایج دیگری که در این مطالعه می‌توان در مورد آن بحث نمود نزدیکی ژنتیکی ماهیان حوضه کارون و حوضه نمک است. مقدار تمایز مشاهده شده در بین هاپلوتایپ‌های نمک و کارون جالب توجه است. با توجه به جدایی کامل این دو حوضه در زمان حاضر، وجود هاپلوتایپ‌های نزدیک به هم می‌تواند تعیین کننده احتمالات مختلفی در مورد این حوضه‌ها باشد. در مورد گونه *C. buhsei* نیز چنین شباهتی در دو حوضه یادشده وجود دارد. این شباهت نشان می‌دهد که حوضه‌های یادشده دارای ارتباط بوده‌اند و احتمالاً ماهیان نمک از حوضه کارون مشتق شده‌اند. این فرض را می‌توان با در نظر گرفتن منطقه آناتولی که در آن قدیمی‌ترین فسیل‌های ماهیان این جنس کشف شده است به‌عنوان منشأ تکامل ماهیان این جنس، تأیید نمود. علاوه بر این بیشترین تنوع گونه‌ای این جنس در منطقه آناتولی وجود دارد. در شبکه هاپلوتایپی ترسیم‌شده نیز با توجه به روابط جهشی هاپلوتایپ‌های مشاهده‌شده می‌توان هاپلوتایپ‌های کارون را از انواع قدیمی یا اجدادی محسوب کرد. زیرا هاپلوتایپ‌های یادشده در لرستان و کارون در مسیر جهش‌هایی قرار دارند که این گروه را به سایر گونه‌ها متصل می‌کنند و

علاوه بر این هاپلوتایپ‌های حوضه نمک-اردستان و نائین از هاپلوتایپ‌های حاشیه‌ای یا جدید محسوب می شوند (Freeland, 2005).

قنات‌ها از چندین راه مختلف فون ماهیان خود را به دست می‌آورند؛ برخی قنات‌ها به رودخانه‌هایی که چندین سال در جریان‌اند، راه پیداکرده‌اند که فون ماهیان رودخانه به قنات راه پیداکرده است و قنات‌های دیگر فون خود را از آب‌های سطحی مجاور می‌یابند. حفر چاه‌های عمیق و ردیف‌های متوالی از قنات‌ها و تغییرات زیست‌محیطی به‌عنوان‌مثال طرح‌های انتقال آب و سدها موجب کم شدن سطح آب قنات خواهند شد(Coad, 1980).

بسیاری از قنوات در مکان‌هایی که آب جاری وجود ندارد، احداث می‌شوند، فون ماهیان در قنات غالباً توسط انسان معرفی می‌شود که دلیل این اقدام اهمیت آب‌های جاری در نزد ایرانیان است و مشاهده ماهیان در آب، خلوص و پاکی آب را مورد تائید قرار می‌دهد، این انگیزه موجب بروز نظریه‌ای شده است که ذخیره ماهیان قنات از نزدیک‌ترین رودخانه یا چشمه نشأت گرفته است (Coad, 1996). با توجه به تضاد این فرضیه‌ها برخی بر این عقیده هستند که ماهی قنات توسط انسان معرفی نشده است (Armantrout, 1980). Abdoli (۲۰۰۰) در بررسی‌های خود بر روی ماهیان آب‌های داخلی ایران اضافه می‌کند که با توجه به سرزمین و اقلیم نسبتاً خشک ایران، گمان نمی‌رود که انسان به‌طور خاص توزیع طبیعی ماهیان را تحت تأثیر قرار داده باشد، حرکت و جابه‌جایی ماهیان احتمالاً درون حوضه آبریز به وقوع پیوسته است و این پدیده‌ای است که کمتر بین حوضه‌های مختلف به وقوع می‌پیوندد.

بارش باران در مناطق خشک ایران در زمان‌هایی از سال بسیار شدید است که اگر این بارش چند روز ادامه داشته باشد موجب سیل یا ایجاد دریاچه‌های فصلی می‌شود که این شرایط دلیلی بر پراکنش ماهیان قنات است (Armantrout, 1980). با این حال این موضوع برای قنات‌هایی که در ارتفاعی بالاتر از سطح دریاچه‌های فصلی هستند، بعید به نظر می‌رسد (Coad, 1996). در حالت کلی، جمعیت ماهیان قنات زیرمجموعه‌ای از جمعیت ماهیان موجود در حوضه‌ای است که قنات در آن تشکیل یافته و از طریق راه‌هایی که در بالا ذکر شد به قنات راه پیدا می‌کنند (Johari *et al.*, 2009). اگرچه گونه *C. aculeata* در حوضه خلیج یافت نمی‌شود اما حضور آن در حوضه رود کر نشان می‌دهد که احتمالاً این‌گونه از طریق رودخانه-های کوهستانی به رود کر راه یافته است (Coad, 2013). توزیع گسترده در قنوات مناطق کویری دلیل دیگری بر جابه‌جایی این گونه از طریق حوضه‌ها است. در مناطق کویری ماهی را مظهری از پاکی و زلالی آب می‌دانند و انسان در توزیع این گونه در بسیاری از قنوات تأثیرگذار بوده است با این حال با توجه به سرزمین و اقلیم نسبتاً خشک و پهناور ایران، انسان نتوانسته به‌طورجدی توزیع طبیعی ماهیان را تحت تأثیر قرار دهد. حرکت و جابه‌جایی ماهیان احتمالاً درون حوضه‌های آبریز صورت گرفته و این پدیده‌ای است که در بین حوضه‌های مختلف به وقوع می‌پیوندد (Abdoli, 2000).

امروزه عواملی نظیر احداث چاه‌های عمیق و نیمه عمیق کشاورزی در مجاورت قنات، تخریب در اثر زمین‌لرزه و سیلاب، صید بی‌رویه و تفریحی آن توسط افراد محلی و کودکان ازجمله عواملی هستند که حیات ماهیان قنات را تحت تأثیر قرار داده است (Abdoli, 2000). در برخی از روستاهای شهرستان اردستان به دلیل عدم آگاهی مردم منطقه و همچنین مدیریت سوء اداره بهداشت شهرستان اردستان با کلرزنی آب قنات موجب نابودی جمعیت ماهیان شده بودند، اگرچه با توجه به جاری بودن آب قنات اقدام به کلرزنی، آب را به‌طور دائم ضدعفونی نمی‌کند پیشنهاد می‌شود برای حفظ ذخایر بومی ماهیان قنات ابتدا به‌وسیله تور ماهیان را در گوشه‌ای جمع نموده و با منحرف کردن آب توسط کانال‌هایی به منبع‌های آب در آنجا اقدام به کلرزنی نمایند و تا حد امکان در نزدیک مادر چاه و مکان‌هایی که جمعیت ماهیان پراکنش دارند اقدام به ضدعفونی با کلر صورت نگیرد.

References

Abdoli, A., 2000. The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. 378 p. (In Farsi)

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Armantrout, N.B., 1980. The freshwater fishes of Iran. Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis, Oregon. 472 p.

Bruford, M., Bradley, D., Luikart, G., 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 3, 900-910.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1660.

Coad, B.W., 1996. Fishes from the *qanats* of Iran. *Publicaciones Especiales Instituto Español de Oceanografía*, 21, 63-79.

Coad, B.W., 1980. Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. Biological Conservation, 19(1):51-80.

Coad, B. W. 2013. Freshwater fishes of Iran. Online version dated 2011. In www.braincoad.com

Durand, J.-D., Tsigenopoulos, C.S., Ünlü, E., Berrebi, P., 2002. Phylogeny and Biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA – evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22, 91-100.

Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., Chourrout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliablePCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 295-298.

Freeland, J.R., 2005. Molecular Ecology. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.

Gajardo, G., Crespo, J., Triantafyllidis, A., Tzika, A., Baxevanis, A., Kappas, I., Abatzopoulos T.J., 2004. Species identification of Chilean Artemia populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography*, 31, 547-555.

Hashemzadeh Sagharlo, I., Rahmati, S., Pourahmad, R., Gholzarianpour, K., Abdoli. A., 2013. Analysis of the systematic status of the blind Iran cave barb, Iranocypris typhlops, compared to the genera Barbus and Garra using COI gene. *Modern Genetic*, 1, 59-66. (In Farsi)

Hashemzadeh Segherloo, I., Abdoli, A., Purahmad, R., Puria, M., Golzarianpour, K., 2014. Genetic barcoding of Capoeta species in Karoon and Tigris tributaries. Modern Genetic, 2(9), 171-178. (In Farsi)

Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Khare, P., Barman, A.S., Singh A., Khan, A.A., 2011. Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Molecular Biology Reports*, 38, 841-846.

Johari, S.A., Coad, B.W., Mazloomi, S., Kheyri, M. Asghari, S., 2009. Biological and morphometric characteristics of *Capoeta fusca*, a cyprinid fish living in the qanats of south Khorasan, Iran (Osteichthyes: Cyprinidae). *Zoology in the Middle East*, 47, 63-70.

Kerr, K.C.R., Stoeckle, M.Y., Dove, C.J., Weigt L.A., Francis, C.M., Hebert P.D.N., 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7, 535-716.

Keskin, E., Atar, H.H., 2013. DNA Barcoding Commercially Important Fish Species of Turkey, Molecular Ecology Resources, 13, 788-797.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 11-120.

Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özulug, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B., Doadrio, I. 2012. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 62(1), 542-549.

Raissy, M., Ansari, M., Jalali, B., 2010. Parasites of three species of *Capoeta* spp. from Beheshtabad River, Iran. *Journal of Veterinary Pathobiology*, 1(1), 38-43. (In Farsi)

Sadeghi, H., Shajiei, H., Sharafi, Sh., 2012. Identification and distribution of fish fauna in qanats of shahrood. Animal Biology, Islamic Azad University, Damghan, 5, 63-78. (In Frasi)

Samaee, S.M., Mojazi-Amiri, B., Hosseini-Mazinani, S.M., 2006. Comparison of *Capoeta Capoeta* gracilis (Cyprinidae, Teleostei) populations in the south Caspian Sea river basin, using morphometric ratios and genetic markers. *Folia Zoologica, Brno*, 55(3), 323-335.

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.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 25-27.

Tsigenopoulos, C.S., Kasapidis, P., Berrebi, P., 2010. Phylogenetic relationships ofhexaploid large-sized barbs (genus *Labeobarbus*, Cyprinidae) based on mtDNA data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 851-856.

Turan, C., 2008. Molecular systematics of the *Capoeta* (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16S rDNA sequence data. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 51A(1-2), 1-14.

Zhang, J., Huang, H., Cai, Z., Huang, L., 2006. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control*, 17(7), 557-563.